

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO POR LA
TIORREDOXINA-GLUTATIÓN REDUCTASA (TGR) DEL
CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

CÉSAR VÁSQUEZ LIMA

Asesor:

Dr. Alberto Guevara Flores



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

Dedico esta tesis y todo el proceso para consumarla a mis padres Guadalupe y Rafael por todo lo que me han brindado, en especial el cariño y la tolerancia que han tenido a mi existencia que sin duda ha sido compleja, así como por sus enseñanzas y buen ejemplo.

A mi hermano Rafa por siempre estar ahí y a mi primer hermano por cederme su espacio en este mundo. A Anita por ser mi hermana de otra madre.

A Becky por ser el mejor modelo de resiliencia que he conocido, por ser mi madrina y tomárselo muy en serio. A Rocío por todo el apoyo, comprensión y momentos compartidos. A Claudia por apoyarme en momentos complicados. A Panchito. A mi tío Raúl.

A mis abuelitos y abuelos.

A mis primos Alonso y Mariana por ser un buen ejemplo.

A mis pocos amigos que han tenido una influencia positiva sobre mí.

A todas mis mascotas, especialmente a mis perros que me inspiran en muchas ocasiones y de quienes he aprendido algo más que a aplicar mis conocimientos.

A mis alumnos.

A Anna.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los ya mencionados en la dedicatoria, pero en especial a los integrantes del laboratorio 8: a mi asesor y amigo Alberto y a Jesús por todo su apoyo, paciencia y enseñanzas y por el tiempo compartido. A Patricia por su apoyo y buenos consejos. Al Dr. Juan Luis.

Al Dr. Salvador Vázquez por la buena amistad y enseñanzas.

A Martha por ayudar pacientemente con su amistad a mi desarrollo académico y personal.

A mis amigos tesistas Iván, Félix, Lucero y Sabrina que hacen que el trabajo parezca divertido.

A la Dra. Gabriela Nava por su paciencia y enseñanzas.

A Gustavo.

A todos mis buenos profesores.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	34
REFERENCIAS	40

FIGURAS

Figura 1. Generación de las ERO mediante la reducción incompleta del O ₂	2
Figura 2. Organelos y enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno	3
Figura 3. Sistemas antioxidantes no proteicos: interacción de la vitamina E (α -TO) y la vitamina C (L-AA) y el GSH	5
Figura 4. Algunos representantes de enzimas de la familia piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasas	7
Figura 5. Reducción de los sustratos fisiológicos de la TGR: GSSG y Trx-S ₂	8
Figura 6. Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	10
Figura 7. Precipitación escalonada de la proteína de la fracción citosólica del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> con sulfato de amonio	18
Figura 8. Proceso de purificación de la TGR utilizando diferentes pasos cromatográficos	20
Figura 9. Actividad de glutatión reductasa asociada a la TGR	21
Figura 10. Actividad de DTNB reductasa de la asociada a la TGR	22
Figura 11. Ensayo de reducción del citocromo <i>c</i> por el anión superóxido	23
Figura 12. Inhibición de la actividad de la GSSG-reductasa asociada a la TGR de <i>T. crassiceps</i> en presencia de moléculas que se unen a residuos de cisteína y/o selenocisteína y moléculas que se unen al FAD	25
Figura 13. Reducción del citocromo <i>c</i> por el sistema xantina-xantina oxidasa	29
Figura 14. Reducción del citocromo <i>c</i> por la <i>Tc</i> TGR utilizando los equivalentes reductores del NADPH	30
Figura 15. Reducción del citocromo <i>c</i> por concentraciones crecientes del FAD-libre reducido por el NADPH	31
Figura 16. Reducción del citocromo <i>c</i> por curcuminoides 50 μ M	32
Figura 17. Mecanismo propuesto para la reducción del citocromo <i>c</i>	33

TABLAS

Tabla 1. Año de introducción de antiparasitarios al mercado y año del primer reporte de resistencia a antiparasitarios en animales de corral	16
Tabla 2. Actividad residual de la TGR de <i>T. crassiceps</i> en presencia de diferentes inhibidores	31
Tabla 3. Reducción del citocromo <i>c</i> por la enzima tiorredoxina-glutatión reductasa en presencia de inhibidores	32
Tabla 4. Enzimas de la familia piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa y su capacidad para reducir al citocromo <i>c</i>	33

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AF	auranofin
AV	ácido vanilínico
CAT	catalasa
COX-2	ciclooxigenasa 2
CTE	cadena de transporte de electrones
CUR	curcumina
Cys	cisteína
DHFR	dihidrofolato reductasa
DPI	difenileneiodonio
DTNB	ácido 5, 5'-dithio bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ERO	especie reactiva de oxígeno
ET	extracto tumérico
FAD	flavin adenina dinucleótido
F-Al	feruloíl aldehído
FNT	factor de necrosis tumoral
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GS•	radical de glutación
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado

HO•	radical hidroxilo
H.I.	hospedero intermediario
H.D.	hospedero definitivo
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
L-AA	ácido ascórbico/vitamina c
LPS	lipopolisacárido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
Na ₂ SO ₃	sulfito de sodio
NEM	n-etilmaleimida
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sodio
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
O ₂ •-	anión superóxido
PGE ₂	prostaglandina E ₂
POC	producto de oxidación de la curcumina
Prx	peroxirredoxina
RL	radical libre
Sec/U	selenocisteína
Se ⁻	selenolato
SeH	selenol
SH	tiol/sulfhidrilo
SOD	superóxido dismutasa
TE	Tris 100 mM (pH 7.8), EDTA 1mM

TGR	tiorredoxina glutatión reductasa
TNB ^{·-}	2-nitro-5-tiobenzoato
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trx	tiorredoxina
TrxR	tiorredoxina reductasa
Trx-S ₂	tiorredoxina oxidada
Trx-(SH) ₂	tiorredoxina reducida
XO	xantina oxidasa
α-TO	alfa tocoferol/vitamina E
α-TO [•]	radical tocoferoxilo
¹ O ₂	oxígeno singlete
4-VG	4-vinilguayacol
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amonio

RESUMEN

VÁSQUEZ LIMA CÉSAR. Generación de anión superóxido por la tiorredoxina- glutatión reductasa (TGR) del cisticerco de *Taenia crassiceps* (bajo la dirección de: Dr. Alberto Guevara Flores)

Los organismos aerobios requieren O_2 para su metabolismo energético, sin embargo, durante el proceso producen especies reactivas de oxígeno (ERO) que desempeñan funciones fisiológicas esenciales, pero en concentraciones elevadas dañan macromoléculas biológicas importantes para la célula. Estas especies son producidas en el hospedero como respuesta inmune contra los organismos parásitos por lo que estos han desarrollado sistemas para contender contra las ERO propias y las vertidas por el hospedero. Los sistemas de tiorredoxina (Trx) y glutatión (GSSG) son fundamentales para detoxificarlas; la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) destaca como única enzima encargada de reducir a ambos sustratos disulfuro en cestodos, esta enzima es considerada un buen blanco para el desarrollo de fármacos antiparasitarios con potencial para unirse a sus sitios redox catalíticos, inhibiendo su actividad. Ha sido reportado que una isoforma de la TrxR inhibida con curcumina (CUR), adquiere la capacidad de producir anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) lo cual es controversial de acuerdo con la literatura existente, además las flavoenzimas tienen la capacidad de producir $O_2^{\bullet-}$ mediante el FAD contenido en su estructura. Por lo anterior, es importante discernir si la TGR, la curcumina y el FAD libre participan en la generación de $O_2^{\bullet-}$. En esta tesis demostramos que la TGR de *Taenia crassiceps* produce $O_2^{\bullet-}$ y en menor medida su contraparte inhibida (con moléculas con afinidad por cisteínas, selenocisteínas y el FAD); los curcuminoides también lo producen especialmente en presencia de NADPH y el FAD libre lo produce aparentemente en concentraciones bajas.

I. INTRODUCCIÓN

a) Antecedentes

Los organismos eucariontes aerobios complejos se desarrollaron a partir de la oxigenación de la superficie terrestre que ocurrió gracias a la fotosíntesis oxigénica [1] dada principalmente por un grupo de organismos conocidos como *cianobacterias* cuya principal característica es utilizar a la energía lumínica para reducir al CO₂ al tomar electrones del agua y consecuentemente generar oxígeno molecular/dioxígeno (O₂) [1]. Hoy en día, los organismos aerobios utilizan eficientemente casi el total del oxígeno (98%) que respiran reduciéndolo completamente a agua y en este proceso generan energía en forma de ATP a nivel mitocondrial [2]. Este proceso de evolución hizo el proceso de respiración más eficiente en términos energéticos [1]. Sin embargo, para llevar a cabo la transferencia de un electrón, que es un paso restrictivo en el oxígeno molecular, fue necesario que entrara energía química, calórica, o lumínica al O₂ (biradical) y cambiar la dirección de un electrón (e⁻) en su orbital spin que contiene 2 e⁻ sin aparear en la misma dirección, entonces, el O₂ puede aceptar un e⁻ de forma univalente formándose el anión superóxido (O₂^{•-}) [3] que es un metabolito de carácter oxidante llamado especie reactiva de oxígeno (ERO) [4]. El O₂^{•-} puede aceptar otro e⁻ y 2 protones (H⁺) y generar al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual, no es un radical libre (RL) pero si es reactivo y es precursor de RL. Si el H₂O₂ acepta otro e⁻ se generan como productos el radical hidroxilo (HO[•]) y anión hidroxilo (HO⁻), la fig. 1 muestra el resumen de las ERO mencionadas. Dentro de los metabolitos, se encuentran los RL, los cuales en su orbital externo tienen al menos un electrón desapareado lo que les confiere su potencial oxidante [5] y por lo tanto pueden fácilmente dañar las estructuras de macromoléculas biológicas como proteínas, lípidos o DNA; dentro de la célula [6]. Algunos ejemplos de RL son el O₂^{•-} y el HO[•] los cuales son identificados por presentar un punto negro en su fórmula química (Fig. 1).

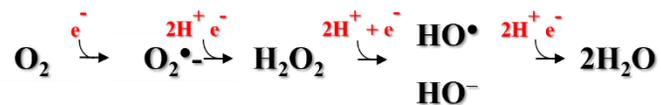


Fig. 1. Generación de las ERO mediante la reducción incompleta del O₂.

Es bien sabido que las ERO son generadas en diferentes compartimentos subcelulares, siendo una de las principales fuentes la mitocondria ya que cerca del 2% del total de O_2 consumido genera $O_2^{\bullet-}$, principalmente a nivel de los complejos respiratorios I y III de la cadena de transporte de electrones (CTE), los peroxisomas cuyo O_2 es utilizado como cosustrato de recciones oxidativas para generar H_2O_2 , en citosol la xantina oxidasa (XO) que es dependiente de O_2 para generar al $O_2^{\bullet-}$ y en la membrana plasmática de las células del sistema inmune a nivel de la NADPH oxidasa que requiere de O_2 para generar $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , el retículo endoplásmico puede producir ERO a través de una CTE, cuya función es el metabolismo de los xenobióticos, y el sistema de citocromo p450; estos son los principales sitios de generación de ERO (Fig. 2) [7].

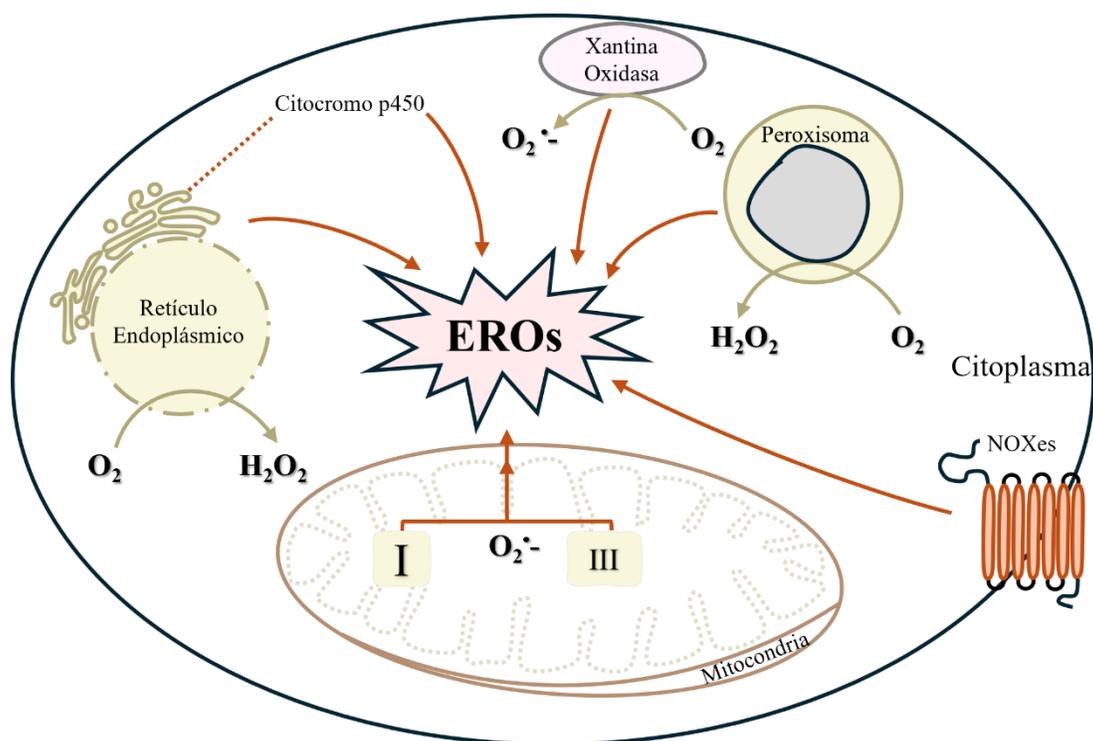


Fig. 2. Organelos y enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno.

Las ERO, en concentraciones adecuadas, pueden desempeñar papeles fisiológicos importantes como de señalización celular y transcripción como es el caso del H_2O_2 que puede favorecer la transcripción de factores metabólicos, además se ha visto su papel importante en la regulación celular al promover la formación de puentes disulfuro entre

residuos de cisteínas (Cys) inactivando a fosfatasas o cinasas [8]. Sin embargo, cuando las ERO se acumulan en concentraciones altas es porque se generan sobremedida, o porque los mecanismos que las eliminan lo hacen ineficientemente, lo que provoca que se altere la homeostasis redox y se presente un fenómeno conocido como “estrés oxidante”, en este punto se consideran dañinas porque promueven la presentación de diversas patologías tanto agudas como crónicas y degenerativas como puede ser cáncer, artritis, envejecimiento prematuro, desórdenes inmunológicos, cardíacos o neurodegenerativos, entre otros [7]. Para evitar estos efectos tóxicos de las ERO los seres vivos cuentan con sistemas antioxidantes tanto de origen no enzimático como enzimático.

Sistemas antioxidantes (no enzimáticos):

En los sistemas antioxidantes no enzimáticos participan de manera importante vitaminas tanto liposolubles como hidrosolubles las cuales tienen la capacidad de neutralizar a los RL ya que pueden regenerar el estado reducido de compuestos o macromoléculas, o bien, servir como cofactores enzimáticos. Un ejemplo de vitamina liposoluble es el alfa-tocoferol (α -TO) o vitamina E que se encuentra embebido dentro de las membranas [9] y cuyo papel principal es la eliminación de los RL y así evitar que reaccione con las membranas celulares evitando la lipoperoxidación; para lograr tal objetivo el α -TO le quita un e^- al RL y genera al radical alfa-tocoferoxilo (α -TO \bullet), este reacciona con la vitamina hidrosoluble ácido ascórbico (L-AA o vitamina C que es un polihidroxi alcohol insaturado que tiene poder reductor) [10] y es regenerado a su forma α -TO generándose el radical ascorbilo (L-AA \bullet). Este último reacciona con el tripéptido GSH (que se encuentra muy representado dentro de las células) y se regenera a L-AA generando el radical tiyl (GS \bullet) el cual es regenerado por más GSH (Fig. 3). Es importante mencionar, que estas vitaminas también pueden reaccionar con el singlete de oxígeno (1O_2) y en menor medida con el $O_2\bullet^-$ [11].

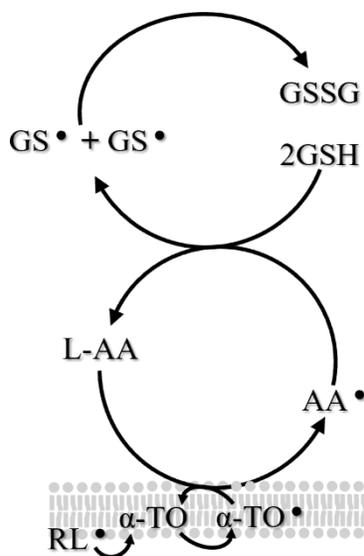


Fig. 3. Sistemas antioxidantes no proteicos: interacción de la vitamina E (α -TO) y la vitamina C (L-AA) y el GSH. *El α -TO neutraliza RL de la membrana tomando un electrón de estos y a su vez es regenerado por el L-AA soluble que ahora forma un radical y es neutralizado al interactuar con el glutatión reducido (GSH) formándose un radical de glutatión o tiyl (GS^\bullet). Cuando dos GS^\bullet interactúan, se forma el glutatión oxidado (GSSG).*

Sistemas antioxidantes (enzimáticos):

El O_2^\bullet - generado puede ser dismutado químicamente como se muestra abajo (reacción 1) o mediante una enzima que se llama superóxido dismutasa (SOD) y puede tener como cofactor Zn (Zn-SOD) la isoforma citosólica y Mn la isoforma mitocondrial (Mn-SOD) y generar H_2O_2 (reacción 2) [12]. Si este H_2O_2 se encuentra en el medio con una molécula que le done un electrón, (Fe^{+2} o el propio O_2^\bullet -) [2] podría generar al HO^\bullet (reacción 3) lo que también se conoce como reacción de Fenton [7]. Dicho oxidante es extremadamente tóxico para la célula, de hecho, es considerado como el más reactivo dentro de las ERO. Para evitar que esta se genere, la célula cuenta con una maquinaria para depurar (eliminar) al H_2O_2 que incluye: la catalasa (CAT), una enzima tetramérica que se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas [13] y es la principal encargada de depurar al H_2O_2 (reacción 4); si no es suficiente también cuenta con la glutatión peroxidasa (GPx) que presenta diferentes isoformas distribuidas en citosol y asociadas con la membrana plasmática [13, 14], utiliza como sustrato reductor al GSH (reacción 5); y por último a las

peroxirredoxinas (Prx) enzimas que se encuentran muy representadas en los diferentes compartimentos subcelulares alcanzando concentraciones micromolares, no usan ni coenzimas ni cofactores para su actividad pero requieren de un sustrato reductor como la tiorredoxina reducida (Trx-(SH)₂) o el GSH [15] (reacción 6).



Sistemas antioxidantes enzimáticos dependientes de tioles

Son varios los aminoácidos presentes en los sistemas biológicos que se ha visto tienen la capacidad de reaccionar con el O₂ como son la histidina, metionina, triptófano, tirosina y cisteína. La Cys destaca por tener como grupo funcional a un tior (SH) que es capaz de oxidarse y reducirse reversiblemente y estar involucrada en reacciones de intercambio ditiol/disulfuro lo cual le confiere importancia en los sistemas biológicos (enzimáticos) que protegen del estrés oxidante y que detoxifican a las ERO. En los mamíferos, de los sistemas antioxidantes enzimáticos dependientes de tioles, existen dos principales que utilizan sustratos disulfuro de bajo peso molecular y al ser reducidos favorecen que la célula se mantenga en un ambiente reducido; estos son el sistema de Trx y el de GSH [16]. Ambas moléculas son capaces de llevar a cabo reacciones de transferencia de e⁻ y por ello son esenciales en el mantenimiento de la homeostasis redox. El GSH es un tripéptido (γ-Glu-Cys-Gly) cuya concentración en la célula de eucariontes se encuentra en 2 – 10 mM [17, 18] y su peso molecular es de 307.33 Da [19]. La Trx es una proteína pequeña de 12 kDa con una secuencia conservada en su sitio redox activo (-W-C-G-P-C-L-) y cuya

concentración en la célula es $\sim 10 \mu\text{M}$. Ambas moléculas están distribuidas en gran variedad de organismos [20] y con ellas participan sus respectivas enzimas reductasas pertenecientes a la familia de la piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas: la glutatión reductasa (GR) y la tiorredoxina reductasa (TrxR) [21]. La GR utiliza como sustrato oxidante al GSSG y lo reduce reversiblemente tomando electrones provenientes del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) quedando en su forma reducida (GSH) y consecuentemente contribuyendo a la detoxificación de peróxidos y ERO [7]. La TrxR cataliza la reducción reversible de la tiorredoxina oxidada (Trx-S_2) utilizando al NADPH como donador de equivalentes reductores [21] y consecuentemente dejarla en su forma reducida (Trx-(SH)_2) [22]. En mamíferos se han identificado diferentes isoformas de la TrxR; la citosólica (TrxR1), la mitocondrial (TrxR2) y una tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) que es tejido-específica localizada en los testículos [23]. Es interesante resaltar que estas reductasas tanto de glutatión como de tiorredoxina son homodímeros obligados, contienen una molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD) en cada monómero [24], y presentan diferentes sitios en común y que están altamente conservados como se muestra en la fig. 4.

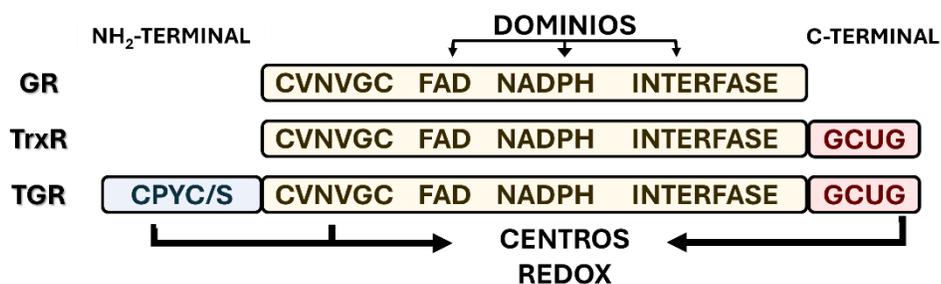


Fig. 4. Algunos representantes de enzimas de la familia piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa

Tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) en los platelmintos parásitos

Asimismo, se ha documentado ampliamente que los *Plathyhelminthes* parásitos de la clase *Trematoda* y *Cestoda* carecen tanto de la TrxR como de la GR (este filo es de alta relevancia veterinaria porque numerosos platelmintos parasitan a gran variedad de

animales). En estos parásitos la reducción de la Trx-S₂ y el GSSG es catalizada sólo por la TGR [21, 23, 25] (Fig. 5), una enzima que tiene tres sitios catalíticos de intercambio ditiol/disulfuro; el primero se encuentra en el extremo N-terminal (-CVNVGC-) y lo comparten todos los miembros de esta familia, el segundo (-GCUG-) se encuentra en el extremo C-terminal, que en lugar de un residuo de Cys tiene uno de selenocisteína (Sec) responsable de la reducción de la Trx-S₂ y el tercero (-CPYC-) se encuentra en el extremo N-terminal (Fig. 4) y es responsable de la reducción del GSSG [5, 26], como se muestra en la fig. 5.

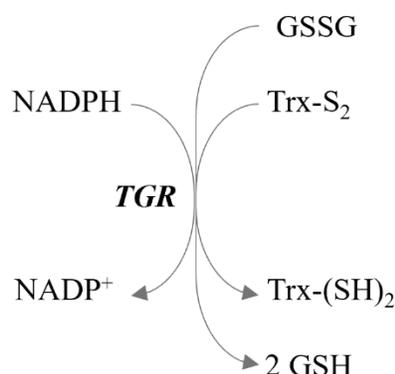


Fig. 5. Reducción de los sustratos fisiológicos de la TGR: GSSG y Trx-S₂

Por lo anterior, esta enzima es fundamental para la viabilidad del parásito [27] y consecuentemente, es una enzima con potencial como blanco para el desarrollo de fármacos alternos a los actualmente utilizados en el tratamiento antihelmíntico puesto que varios parásitos han desarrollado mecanismos de resistencia a estos. Adicionalmente, la actividad de tiorredoxina reductasa puede también ser medida utilizando un sustrato artificial oxidado conocido como ácido 5, 5'-dithio bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), o reactivo de Ellman. El DTNB es un compuesto sintético de bajo peso molecular con disulfuros en su estructura [28], tal actividad es un reflejo de actividad de tiorredoxina reductasa cuando el sustrato tiorredoxina es una limitante.

Cestodos

Dentro de los Cestodos se encuentra el género *Taenia* (*T*) que comprende a varias especies las cuales son patógenas para diversos animales, estas son *T. pisiformis*, *T. hydatigena*, *T. ovis*, *T. krabbei*, *T. polyacantha*, *T. multiceps*, *T. serialis* y *T. crassiceps* [20] así como otras que también son zoonóticas como *T. solium*, *T. asiática* y *T. saginata*, las cuales tienen un ciclo biológico de tipo indirecto que, para completarse, requiere como hospedero intermediario a cerdos o a bovinos [29]. *T. crassiceps* ha mostrado su gran valor como modelo experimental por varios factores siendo los más relevantes, su casi nula patogenicidad hacia los humanos, el gran número de genes ortólogos entre *T. crassiceps* y *T. solium* que permiten extrapolar datos experimentales entre ambas y su facilidad de mantenerse *in vitro* e *in vivo* [30]. Se conocen distintas cepas de *T. crassiceps* que son utilizadas a nivel de laboratorio como la KBS, HYG, WFU y ORF, las tres primeras tienen un escólex que evagina al ser ingerido por un hospedero definitivo (H.D.), sin embargo, la cepa ORF no genera un escólex lo cual se puede deber a que genes importantes durante el desarrollo embrionario antero-posterior se encuentran apagados [31] y consecuentemente su infección de forma natural no parece factible. En cuanto a la cepa WFU, se ha descrito su pérdida de infectividad a ratones BALB/c a menos que los proglótidos grávidos sean cultivados en cánidos.

Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*

El ciclo biológico (Fig. 6) comienza a partir de que un zorro rojo (*Vulpes vulpes*) o un cánido con Teniasis, que es el H.D., elimina las heces fecales junto con los proglótidos grávidos donde están contenidos los huevos con la oncosfera; eventualmente un hospedero intermediario (H.I.), que comúnmente es un roedor, ingiere los proglótidos y por la acción del HCl gástrico y enzimas digestivas intestinales se libera la oncosfera, la cual tiene la capacidad de penetrar la pared intestinal y por vía sanguínea desplazarse a diversos tejidos y se establece en músculo desarrollándose el cisticerco. El ciclo se completa cuando un zorro o cánido ingiere los cisticercos contenidos en el músculo del H.I. y en su intestino se desarrolla la fase adulta de la *Taenia*. Además, en contraste con otras especies de

Taenias, *T. crassiceps* lleva a cabo una reproducción asexual por gemación [30] por lo que, al inocular cisticercos en la cavidad peritoneal de ratones, es posible recuperar una buena proporción de estos en los ratones, varias semanas después.

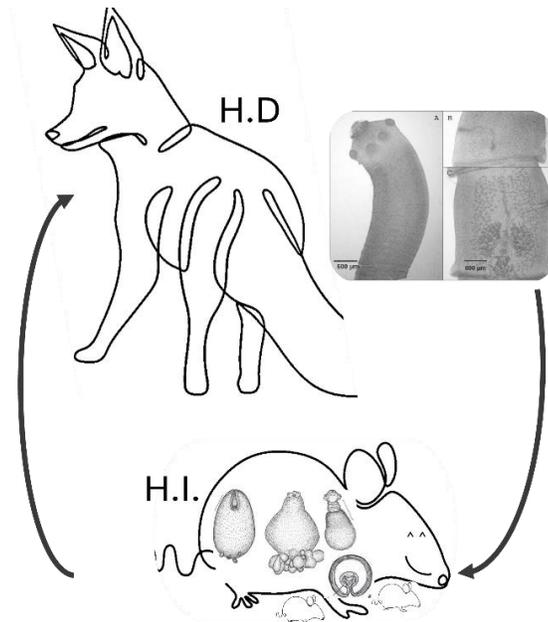


Fig. 6. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*. Hospedero definitivo (H.D) elimina oncosfera que es ingerida por el hospedero intermediario (H.I.). La oncosfera penetra la pared intestinal del H.I. y se desplaza vía sanguínea estableciéndose principalmente en músculo, desarrollándose el cisticerco. Cuando el H.D. lo ingiere, desarrollará una *Taenia* adulta.

Este tipo de reproducción asexual que presenta el cisticerco de *T. crassiceps* permite que se pueda obtener suficiente biomasa en un tiempo relativamente corto. Se ha documentado que hay una preferencia por las hembras sobre los machos ya que en estas se recupera un mayor número de cisticercos (92%) de las que son inoculadas, en machos este valor es un poco menor ya que también se ha visto que los estrógenos, al contrario de los andrógenos, favorecen su potencial de infección [32]. Además, se ha reportado que entre el día 49 y 103 post-inoculación intraperitoneal, cada cisticerco produce un promedio de 2.7 a 3.8 cisticercos por día [30]. Otra ventaja que tiene el cisticerco de *T. crassiceps* es su similitud antigénica con *T. solium* [33] lo cual se ve reflejado también en que se presente inmunogenicidad cruzada [34] y esto favorece que pruebas ELISA con

anticuerpos de alguna de ambas *Taenias* sean lo suficientemente sensibles y específicas (~90%) para reaccionar con antígenos de la otra *Taenia* [35]. Otras similitudes que *T. solium* y *T. crassiceps* comparten, se dan a nivel genómico donde la identidad está incluso por encima del 90% [33, 36]. Las numerosas similitudes que se han descrito entre *T. crassiceps* y *T. solium* indican que resultados de experimentación en *T. crassiceps* pueden ser extrapolados a *T. solium*.

T. crassiceps ha demostrado ser un modelo de laboratorio idóneo en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la cisticercosis ya que los humanos no son infectados por este cestodo, aunque hay reportes aislados de su presencia en humanos inmunocomprometidos [37-41], o inmunocompetentes [42-44]. Estos múltiples factores que presenta *T. crassiceps* respaldan su gran valor como modelo experimental.

b) Problema

Con el creciente problema de resistencia a antiparasitarios, la caracterización del mecanismo de acción de nuevos tratamientos es un paso importante en el desarrollo de nuevas líneas de tratamiento. El fenómeno de resistencia a los antiparasitarios es promovido por malas prácticas de manejo como utilizar antiparasitarios como único medio de control de las parasitosis y además el hecho de que en muchos casos son utilizados sin llevar a cabo técnicas diagnósticas o con fines profilácticos [45]. La resistencia es algo que puede ocurrir en un periodo de pocos años a partir de la introducción de un nuevo fármaco como ha sido en animales de corral en los que se ha reportado resistencia a diversos antiparasitarios algunos años después de su introducción (Tabla 1).

Tabla 1. Año de introducción de antiparasitarios al mercado y año del primer reporte de resistencia a antiparasitarios en animales de corral [Kaplan, 2004]

Antiparasitario	Año de introducción	Primer reporte de resistencia
Tiabendazol	1961	1964
Levamisol	1970	1979
Ivermectina	1981	1988
Moxidectina	1991	1995
Pirantel	1974	1996

Hoy en día la resistencia a antiparasitarios es muy prevalente en áreas hiperendémicas en donde además son usados con alta frecuencia [46]. En algunos lugares de Latinoamérica en donde la prevalencia de infecciones mixtas por platelmintos y nematodos en perros es del 100%, se ha reportado hasta un 38.3% de resistencia al tratamiento con praziquantel y pamoato de pirantel [47]. En España se ha visto la pérdida de efectividad de triclabendazol y de la mezcla de ivermectina con clorsulón en el tratamiento de la fasciolosis [48] además que la resistencia de *Fasciola hepatica* a triclabendazol no es reversible al utilizar un tratamiento distinto [46]. En Australia se ha reportado resistencia a benzimidazoles en >70% de rumiantes en pastoreo infectados con los géneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Ostertagia* [49]. Estos altos índices de resistencia a los fármacos actualmente utilizados hacen evidente la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con un mecanismo de acción distinto a los que actualmente están disponibles [50]. El problema con respecto a la resistencia a antiparasitarios no respecta únicamente a la salud pública, sino también a la economía global ya que en el 2021 la inversión global en salud animal corresponde a una cantidad de 570 billones de pesos y se ha observado un crecimiento de 6% anual en la última década. A partir de este total, la inversión en parasiticidas es de 23% con respecto a la inversión total en producción animal. Además, la medicina veterinaria tiene el rol más importante en la iniciativa de “una salud” porque se encuentra en la línea más inmediata de investigación para el desarrollo de fármacos [51].

Como pasos previos al desarrollo de un nuevo fármaco, se valida un blanco farmacológico durante una fase exploratoria, el cual es una molécula o proteína con una función vital para el parásito. Posteriormente se sigue una estrategia centrada en esta molécula blanco que se pretenda exponer a diversas sustancias químicas que puedan afectar dicha función [51]. Estos blancos vitales para el patógeno en cuestión, podrían ser sistemas enzimáticos como los encargados de detoxificar a las ERO, especialmente si solo están en el organismo invasor de modo que resulten lo más inocuos posibles para el animal tratado. Por eso la caracterización de diversos sistemas enzimáticos vitales de un parásito es un paso importante en entender su mecanismo y relevancia fisiológica que contribuye al diseño de nuevas líneas de tratamiento de enfermedades. Un gran número de fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas actúan sobre enzimas que catalizan reacciones vitales para la supervivencia de un patógeno por lo que, al inhibir a esas enzimas, se interrumpe la reacción y por ende la vida del patógeno. Algunos ejemplos son el clorsulón que antagoniza a las enzimas 8-fosfoglicerato cinasa y fosfogliceromutasa de los tremátodos, la dietilcarbamazina que interviene en el metabolismo del ácido araquidónico en algunas filarias al bloquear la vía de la ciclooxigenasa a nivel de la leucotrieno c4 sintasa [52] impidiendo la síntesis de prostaglandinas E₂ e I₂ en las microfilarias e induciendo una vasoconstricción letal [53], y el trimetoprim que es un inhibidor selectivo de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) en parásitos [54] y bacterias [55] por los cuales tiene mayor afinidad que por la DHFR de mamíferos [56]. El ácido fólico es esencial, por ejemplo, para *Giardia lamblia* ya que favorece su adherencia al epitelio intestinal [57] y también para géneros como *Cryptosporidium*, *Plasmodium* y *Toxoplasma* ya que se han identificado genes que codifican para la expresión de la DHFR [58].

Algunas moléculas con afinidad por tioles o FAD

El auranofin (AF) es una molécula que contiene 29% de oro elemental, muy usado en tratamiento de la artritis [59] por su papel en la inhibición de algunas cinasas involucradas en procesos inflamatorios presentes en esta enfermedad [60]. En el caso de las flavoenzimas como la TrxR, importante en la homeostasis redox celular, cuentan con sitios

activos que contienen residuos de Cys o Sec que suelen formar complejos con el AF (inhibiendo a la enzima) y para ello requieren estar en su forma reducida por su sustrato biológico, el NADPH [59]. La enzima a pH fisiológico contiene en su extremo C-terminal un residuo de Sec en forma de selenolato (Se^-), el cual, presenta una alta afinidad por iones metálicos [25]. El AF es capaz de inhibir a la TGR mitocondrial del cisticerco de *T. crassiceps* en el orden de nanomolar [25].

El N-etilmaleimida (NEM) es una molécula que es un derivado electrofílico de la maleimida que alquila y modifica covalentemente residuos de Cys como en el caso de la peroxirredoxina (Prx) humana 3 [62], uno de los componentes del sistema de Trx; también inhibe a enzimas como la isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente por alquilar un residuo de Cys y en menor proporción a otro residuo de lisina [63]. Tal molécula es capaz de inhibir diferentes enzimas como metiltransferasas, a la hexocinasa tipo IV, la acetil-CoA deshidrogenasa [64], y a la ATPasa de *Saccharomyces cerevisiae* modificando los residuos de Cys [65].

El 4-vinilguayacol (4-VG) es un producto generado de la degradación de la curcumina (CUR) a partir de someterla a temperaturas elevadas [66], este ha demostrado ser capaz de inhibir la producción de mediadores de la inflamación inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) como son el óxido nítrico (NO) ya que inhibe a las isoenzimas de óxido nítrico sintasa (NOS), y a la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) de modo que también inhibe la producción de la prostaglandina E_2 (PGE_2) [67]. El 4-VG es un compuesto que se ha encontrado en diversos vegetales incluyendo preparaciones culinarias con cúrcuma y que a su vez ha demostrado ser inocuo en ensayos con líneas celulares *in vivo* utilizando concentraciones de hasta $40 \mu\text{M}$ [67]. Recientemente, se demostró que es capaz de inhibir a la TGR de *T. crassiceps* [25], aparentemente por su unión al residuo de Sec.

La CUR es obtenida del rizoma de la planta *Curcuma longa* cuyo uso medicinal en la India y China se ha extendido por al menos 5000 años. [68]. La CUR, al administrarse en animales es inocua a elevadas dosis [69], también corrige los niveles de colesterol y no afecta los parámetros sanguíneos hepáticos en ratas a las que se administró hasta 0.5% de CUR en la dieta además de no alterar su microbiota [70]. En humanos también se observó que es inocua incluso a dosis de 8 g por día durante un periodo de 3 meses [71]. En células

mieloides estimuladas con factor de necrosis tumoral (FNT), la administración de CUR inhibió la consecuente activación del factor nuclear kappa β por lo que se le atribuye propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas [72]. La CUR puede inhibir a la TrxR de células HeLa [73]. La CUR es prácticamente insoluble en agua que se descompone fácilmente por diversas vías que son conjugación (glucoronido de curcumina), reducción (hexahidrocurcumina), degradación (vanilina y ácido ferúlico) y autoxidación no enzimática (biciclopentadiona) [74], esta última es la que mayormente ocurre a pH fisiológico y en la que radicales de CUR son generados [75] además que se generan diversos productos que son englobados en el término producto de oxidación de la curcumina (POC).

El difenileneiodonio (DPI) es un producto natural encontrado en el geranio *Ixora coccinea* que, a pesar de poseer cierta toxicidad, ha demostrado tener potencial para el desarrollo de fármacos para la prevención y el tratamiento en enfermedades cuya etiología está asociada a la pérdida de la homeostasis redox como en procesos neurodegenerativos como el Parkinson inducido en ratones, en los cuales a dosis muy bajas no se observó efectos tóxicos y sí una mejora en su capacidad motora [76]. En células troncales cancerosas se ha visto que inhibe su crecimiento en el orden de nanomolar y se ha propuesto que lo hace a partir de afectar la respiración mitocondrial en estas células y consecuentemente afectando la producción de ATP [77]. El DPI inhibe irreversiblemente a varias enzimas como a las óxido-nítrico sintasas, la citocromo p450 oxidoreductasa en el orden de milimolar [78], la NADH oxidasa membranal [79], la colinesterasa [96], la NADPH oxidasa de neutrófilos en el orden de micromolar [80, 81] y de diversas células [76, 82, 83], y de la microglía a concentraciones en el orden de 10^{-14} molar y la XO humana y bovina y a la xantina deshidrogenasa humana [84].

El sulfito de sodio (Na_2SO_3) es un polvo blanco cristalino soluble en agua y alcohol [85] que tiene propiedades reductoras. Menos del 10% de Na_2SO_3 es eliminado por vía renal sin sufrir cambios lo cual indica que la mayoría estaría siendo metabolizado eficientemente, además se ha concluido que no es un agente genotóxico [85]. El sulfito ha demostrado tener la capacidad de interactuar con distintas flavoenzimas como la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* formando complejos sin actividad enzimática además de que

se modifica su absorbancia entre los 270 y 280 nm indicando que el sulfito se está uniendo al FAD [86]. Algunas flavoenzimas oxidasas y reductasas forman complejos FAD-sulfito que pueden ser detectados por cambios en su espectro de absorción. [87, 88]. Se ha propuesto que hay una importante correlación entre la interacción que una flavoenzima tiene con el Na_2SO_3 y su reactividad con el oxígeno [87] ya que el sitio en el que interactúan ambas moléculas con la flavina de la enzima es el mismo o alguno adyacente [88].

En la literatura hay información que se contrapone con respecto a las enzimas que pueden generar $\text{O}_2^{\bullet-}$ como actividad secundaria: a) los grupos de investigadores que han reportado que las flavoenzimas como la flavodoxina, la succinato deshidrogenasa y la fumarato reductasa pueden generar en mayor o menor medida a este oxidante [88, 89] y b) los que consideran que para que esto suceda, las enzimas como la TrxR de células Hela [73] o la TGR de *S. mansoni* [90] tienen que ser inhibidas para generar dicho oxidante.

El propósito de esta tesis es demostrar si la isoforma TGR de *T. crassiceps* tiene la capacidad de generar $\text{O}_2^{\bullet-}$ por el simple hecho de ser una flavoproteína o si la enzima requiere que una molécula inhibidora como el AF, el NEM, el 4-VG, el DPI o el Na_2SO_3 se una a los sitios catalíticos o al FAD de la enzima, y que esta forma modificada de la enzima adquiera la propiedad oxidante (generando $\text{O}_2^{\bullet-}$).

Hipótesis

Si la flavoenzima TGR de *T. crassiceps* participa en la generación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ al translocar electrones al oxígeno molecular, entonces al inhibirla esa generación disminuirá diferencialmente.

c) Objetivo general

Determinar si la inhibición de la TGR está involucrada en su capacidad de generar $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Objetivos particulares.

- Purificar a la TGR de una fracción citosólica del cisticerco de *T. crassiceps* mediante el uso de técnicas cromatográficas.
- Determinar si moléculas con afinidad a cisteínas y selenocisteínas así como al FAD pueden inhibir a la TGR midiendo su actividad por espectrofotometría.
- Determinar si la enzima inhibida tiene la capacidad de reducir al citocromo *c* siguiendo su cambio de absorbancia.
- Determinar si la reducción del citocromo *c* es debida al anión superóxido a través de ensayos que lo generan.
- Corroborar la generación de anión superóxido con otras flavoproteínas mediante el ensayo de reducción de citocromo *c*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

El Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), la GR, la TrxR de *Rattus norvegicus*, el NADPH, el DTNB, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el GSSG, el citocromo *c*, la CUR, el DPI, la xantina, la XO, la CAT, la SOD, el extracto turmérico (ET), el POC, el 4-VG, el feruloil aldehído (F-Al), el ácido vanilínico (AV), el FAD, el NEM, el fosfato de sodio (NaH_2PO_4) y el sulfato de amonio sólido (NH_4)₂SO₄ se obtuvieron de la compañía SIGMA Aldrich. El Na₂SO₃ fue obtenido de la compañía Fisher Scientific. El AF se obtuvo de la compañía INC Biomedicals. Las resinas para cromatografía se obtuvieron de Amersham Pharmacia Biotech.

2. Purificación de la TGR citosólica (TGRc)

Esta se realizó mediante el uso de diferentes resinas cromatográficas a partir de la fracción citosólica de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa HYG que fue donada por la Dra. Patricia Del Arenal Mena.

2.1 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

La fracción citosólica fue saturada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% (fracción 0-30%) el cual fue añadido de manera continua, agitando frecuentemente a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 17, 200 g durante 20 minutos para obtener el precipitado de proteína el cual se recuperó y resuspendió en amortiguador (Tris 100 mM, pH 7.8, EDTA 1mM [TE]). Posteriormente, a la fracción soluble se le agregó nuevamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar una saturación del 70 % (fracción 40-70%) se centrifugó a 17,200g durante 20 minutos para obtener el precipitado de proteína el cual se recuperó y resuspendió en amortiguador TE. La fracción soluble se lleva a una saturación del 90% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fracción 70-90%); los pasos secuenciales de la precipitación de proteína son mostrados en la fig. 7.

Por último, la fracción 40-70% se dializó con una membrana de diálisis de corte 10 kDa durante toda la noche, haciendo un total de 4 cambios del amortiguador.

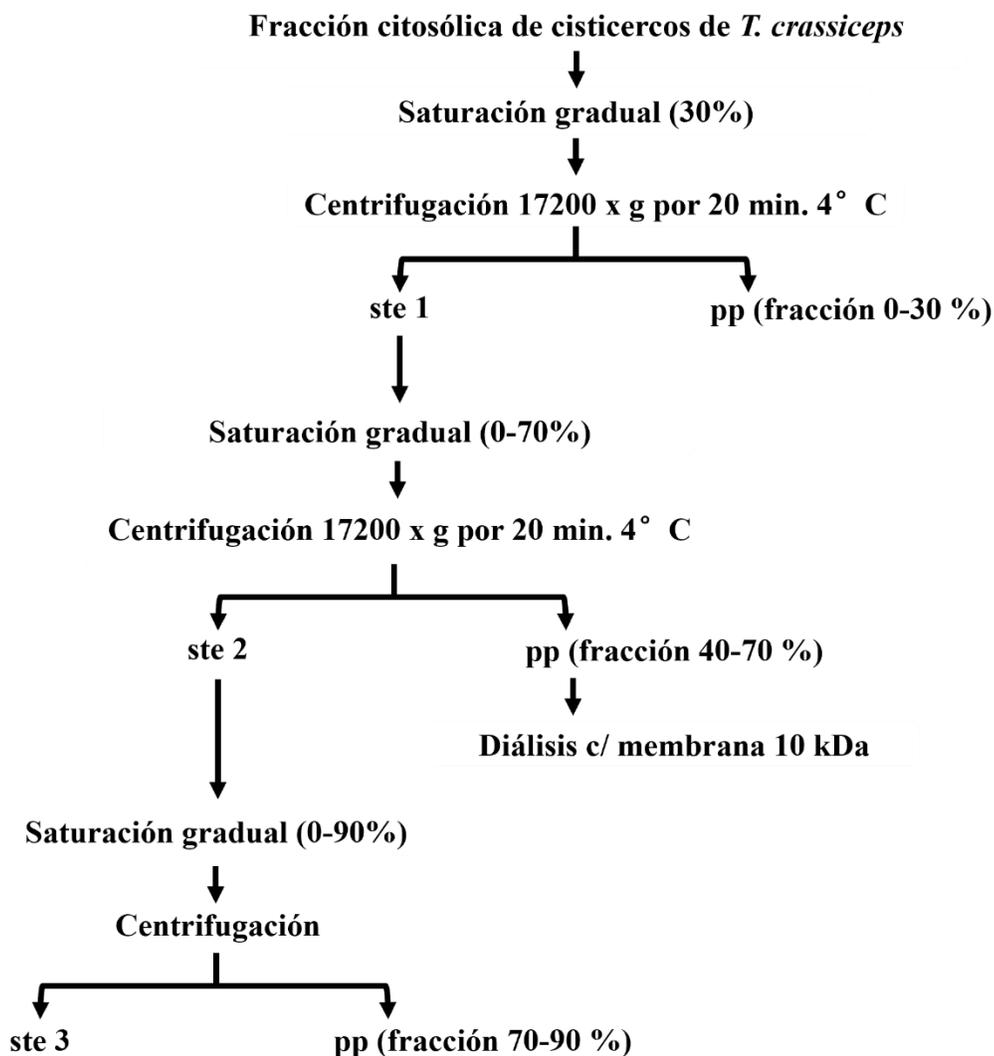


Fig. 7. Precipitación escalonada de la proteína de la fracción citosólica del cisticerco de *Taenia crassiceps* con sulfato de amonio.

2.2 Cromatografía de intercambio iónico (aniónico) DEAE-Sefarosa

Una vez dializada la proteína precipitada (30-70%) se adsorbió en una columna de intercambio iónico DEAE-Sefarosa (2.6 cm x 20 cm), a un flujo de 25 mL/h, la cual previamente fue equilibrada con el mismo amortiguador previamente utilizado en la diálisis. Se colectaron fracciones cada 15 minutos (~6 mL por tubo). Se eluyeron las

proteínas que no se retienen en la resina con amortiguador hasta que la absorbancia a 280 nm se acercó a cero. La proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0.5 M) equivalente a 8 veces el volumen de la columna. En todas las fracciones colectadas, tanto retenidas como no retenidas se determinó la actividad de glutatión reductasa asociada a la TGR de *T. crassiceps*, y las fracciones en donde se encuentre la actividad fueron mezcladas, concentradas (Amicon con corte en 10 kDa y centrifugando a 4,000 rpm) y dializadas contra amortiguador de NaH₂PO₄ (0.005 M, pH de 7.0). Esto último se realizó con cada cromatografía.

2.3 Cromatografía mixta-hidroxiapatita

Una vez que fue dializada la fracción concentrada de DEAE, se adsorbió en una columna de hidroxiapatita (2 cm x 2.8 cm) la cual fue previamente equilibrada con el mismo amortiguador de la diálisis (NaH₂PO₄ 0.005 M, pH de 7.0). Utilizando un volumen de amortiguador equivalente a 8 veces el de la columna. La proteína no retenida se colectó y la proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de NaH₂PO₄ (0.005 – 0.5 M) a un flujo de 25 mL/h y se colectó en fracciones cada 15 minutos (~6 mL por tubo). Se determinó la actividad de glutatión reductasa en todas las fracciones colectadas, posteriormente son mezcladas, concentradas y dializadas contra amortiguador TE, como se menciona arriba.

2.4 Cromatografía Azul de Cibacron (afinidad)

La fracción dializada proveniente de la cromatografía mixta (hidroxiapatita) se adsorbió por una columna de afinidad (Azul de Cibacron 2.6 x 2 cm) que fue previamente equilibrada con amortiguador TE. Nuevamente las proteínas no retenidas fueron colectadas y las proteínas retenidas fueron eluidas con un pulso de NADPH (200 μM). Se determinó la actividad de glutatión reductasa en todas las fracciones colectadas, y en donde se encuentra, se mezclan, se concentran y se dializan. Por último, la proteína es guardada a -20 °C hasta antes de ser utilizada. Los pasos secuenciales de las tres distintas cromatografías utilizadas son resumidos en la fig. 8.

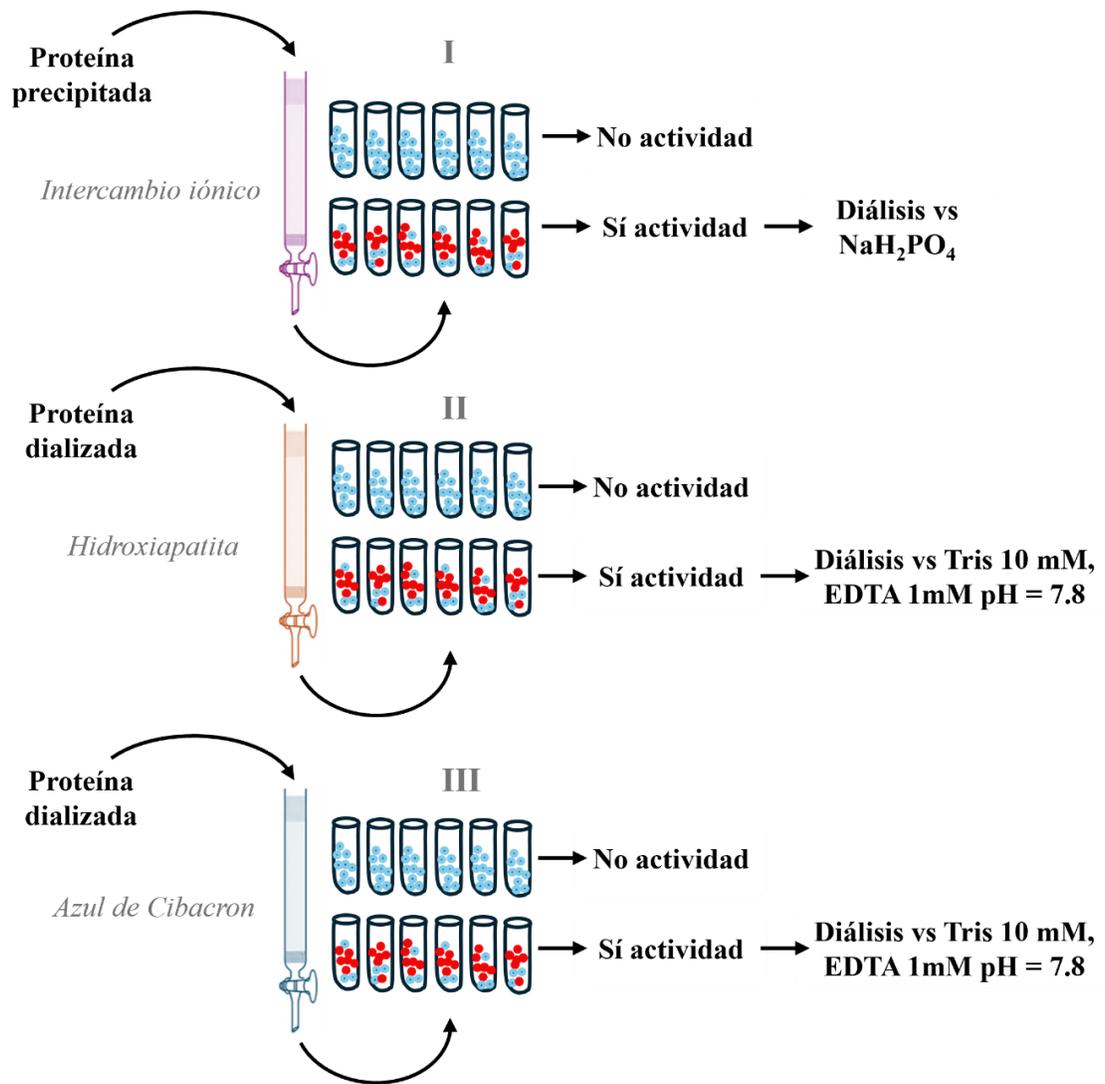


Fig. 8. Proceso de purificación de la TGR utilizando diferentes pasos cromatográficos

2.5 Electroforesis

Para corroborar el grado de pureza de la TGR de *T. crassiceps* se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron 3.8 μg de TGR pura. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie.

3. Ensayos enzimáticos

Todos los ensayos enzimáticos excepto la GR de levadura se realizaron en amortiguador TE, en un volumen final de 600 μ L.

3.1. *Actividad de GSSG-reductasa asociada a la TGR.* La actividad de la TGR se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que corresponde a la oxidación de NADPH (Fig. 9). La enzima se incubó por 2 minutos en presencia de 100 μ M de NADPH que es la molécula que provee de equivalentes reductores a la enzima. La reacción fue iniciada añadiendo GSSG 67 μ M al cual la enzima cede electrones provenientes de NADPH y lo reduce a GSH.

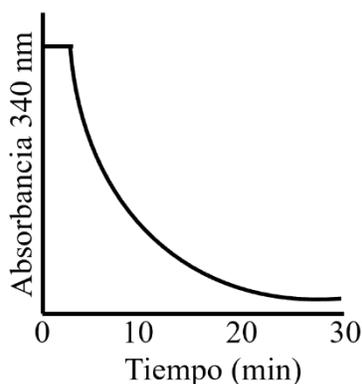


Fig. 9. Actividad de glutatión reductasa asociada a la TGR

3.2. *Actividad de DTNB-reductasa asociada a la TGR.* La actividad de tiorredoxina reductasa se determinó espectrofotométricamente, siguiendo el incremento de la absorbancia a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que corresponde a la reducción del DTNB a 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^-). La enzima se incubó por 2 minutos en presencia de DTNB 490 μ M y la reacción se comenzó al adicionar NADPH 100 μ M (Fig. 10.).

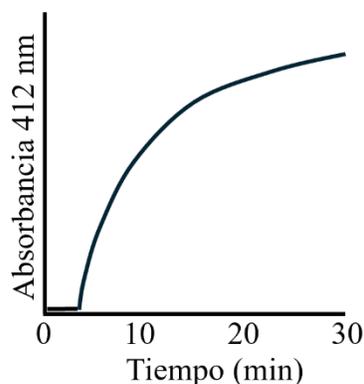


Fig. 10. Actividad de DTNB reductasa de la asociada a la TGR.

3.3. *Actividad de GSSG-reductasa de la GR de levadura.* La actividad de la GR se determinó como en el punto 3.1, con dos pequeños cambios, se utilizó GSSG 333 μM y como amortiguador Fosfatos de sodio 50 mM (pH de 7.0), suplementado con EDTA 1 mM.

3.4. *Inhibición de la TGR.* La TGR se incubó durante 2 min en amortiguador TE en presencia de los distintos inhibidores tanto aquellos con afinidad por los tioles (SH) o selenoles (SeH) como el NEM (33 μM), el AF (0.07 μM), o el 4-VG (100 μM) como por aquellos con afinidad por el FAD como el Na_2SO_3 (500 mM) o con DPI (0.7 mM). La reacción se inició como el en protocolo de la sección 3.1.

3.5. *Reducción del citocromo c por anión superóxido generado por el sistema de xantina.* Se incubó xantina 100 μM y citocromo c 50 μM durante 2 min en amortiguador TE. Se inició la reacción adicionando a la enzima XO 11.6 mU. Se siguió el incremento de la absorbancia a 550 nm (Fig. 11), reflejando la reducción del citocromo c ($\epsilon_{550} = 28$

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) en el espectrofotómetro. En un ensayo paralelo se utilizó SOD 5.4 mU como control negativo.

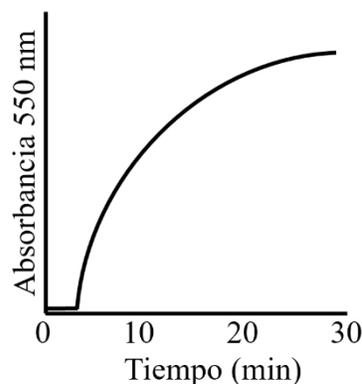


Fig. 11. Ensayo de reducción del citocromo *c* por el anión superóxido

3.6. *Reducción del citocromo *c* por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado por la TGR.* Se incubaron distintas concentraciones de TGR (3.5, 7.0, 14.0, 41.0 y 70.0 nM) en amortiguador TE, en presencia de NADPH 100 μM . Se obtuvo la línea base y se inició la reacción añadiendo citocromo *c* 50 μM . En un ensayo paralelo se utilizó la más alta concentración de TGR en presencia de SOD 5.4 mU (control negativo). Se calculó el total de citocromo *c* reducido utilizando el coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{550} = 28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.7. *Capacidad de la TGR inhibida para reducir al citocromo *c*.* Se incubó a la TGR (11.2 nM) en presencia de cada uno de estos inhibidores (NEM, AF, 4-VG, Na_2SO_3 o DPI) en condiciones reductoras con NADPH 100 μM en amortiguador TE y se obtuvo la medición basal (correspondiente a la enzima inhibida). La reacción se inició añadiendo citocromo *c* (50 μM) como en la sección 3.6.

3.8. *Reducción del citocromo *c* por el FAD libre.* Se incubaron distintas concentraciones de FAD (1.2, 11.5, 27.8, 55.7, 111.5 μM) en amortiguador TE y NADPH 100 μM . Paralelamente se utilizó SOD (como control negativo) y la más alta concentración de FAD, y se sigue el protocolo como en la sección 3.6.

3.9. *Reducción del citocromo *c* por curcuminoides.* Se rastreó la reducción del citocromo *c* con distintos curcuminoides a una concentración de 50 μM : ET, CP, POC, 4-

VG, F-AI o AV, en presencia y ausencia de NADPH 100 μ M. Asimismo se buscó determinar la proporción de su efecto reductor atribuible al anión superóxido (se usó SOD como control negativo).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran como el promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el software *Sigma Plot* versión 12.3. Para determinar si existe diferencia significativa entre la reducción del citocromo *c* (generación de O₂^{•-}) por los distintos curcuminoides, en presencia o ausencia de NADPH y de SOD, se realizó una prueba *t de student* entre todos los tratamientos ($p < 0.05$) (Fig. 16).

III. RESULTADOS

Inhibición de la TGR por moléculas que se unen a tioles o selenoles

Concentraciones crecientes de moléculas como el NEM, el 4-VG o AF (con capacidad para unirse a los sitios de intercambio ditiol/disulfuro) fueron utilizadas hasta lograr la máxima inhibición de la TGR. La fig. 12a muestra un decremento de la absorbancia a 340 nm (curso en el tiempo) reflejo de la actividad de GSSG-reductasa asociada a la TGR de *T. crassiceps* sin inhibidor (control de actividad) y con la presencia de los diferentes inhibidores antes mencionados. Se observa que en el control de actividad (línea negra) el NADPH es oxidado totalmente (100 %) antes de alcanzar 5 min de la reacción. En cambio, en presencia de los inhibidores representado por líneas horizontales de colores: verde, roja y azul, sólo ~2% del NADPH es oxidado, en otras palabras, todavía hay 98 % de NADPH a los 30 min, tiempo total que duró la reacción.

Inhibición de la TGR por moléculas que se unen a FAD.

La TGR es una enzima dimérica, y en cada monómero tiene una molécula de FAD como grupo prostético, el mecanismo de transferencia de electrones en la enzima ocurre como sigue. Como primer paso, el NADPH lleva a cabo transferencia de electrones al FAD de la TGR y lo reduce a FADH₂, posteriormente como segundo paso, sus tres sitios redox de intercambio ditiol/disulfuro se reducen consecutivamente. Se ha reportado que moléculas como el DPI y el Na₂SO₃ tienen la capacidad de unirse al FAD de algunas flavoenzimas [76, 86], lo que provocaría en la TGR que los electrones no reduzcan a los tres sitios redox catalíticos del segundo paso. Para determinar si estas moléculas inhiben a la TGR fueron utilizadas concentraciones crecientes por separado hasta encontrar la máxima inhibición de la enzima, registrando la oxidación del NADPH a 340 nm. La fig. 12b muestra el curso en el tiempo de la actividad glutatión-reductasa asociada a la TGR. La línea negra representa el control de actividad (100 %), se puede observar que el NADPH se consume totalmente antes de alcanzar los 7 min de la reacción. En cambio, en la presencia de los inhibidores de la TGR, líneas semi-horizontales de color azul y roja, el consumo de NADPH disminuye considerablemente; con el DPI se observa un decremento del NADPH alrededor de 24 % y con el Na₂SO₃ alrededor de un 20 %, en todos los casos la reacción total fue en un tiempo de 30 min.

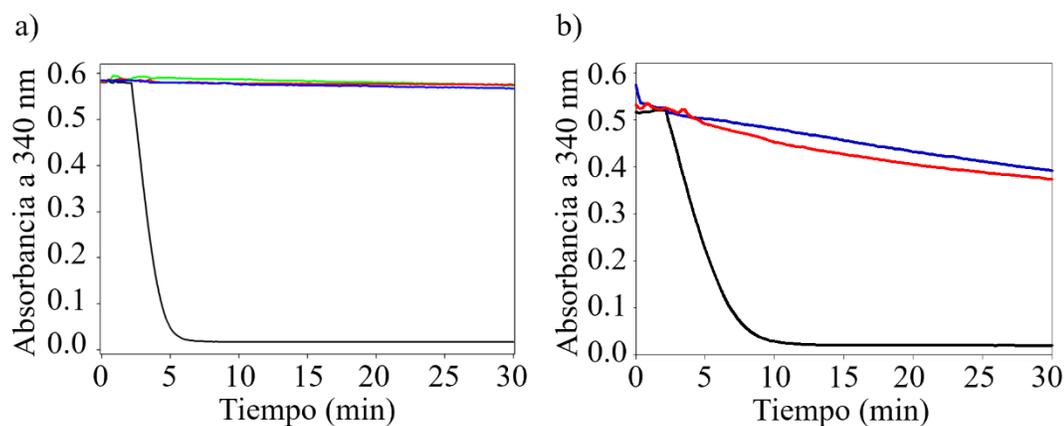


Fig. 12. Inhibición de la actividad de la GSSG-reductasa asociada a la TGR de *T. crassiceps* en presencia de moléculas que se unen a residuos de cisteína y/o selenocisteína y moléculas que se unen al FAD. Inhibición de la actividad, líneas de colores: a) verde: con AF 70 nM; rojo: con NEM 33 μM; azul: con 4-VG 100 μM. b) azul: con Na₂SO₃ 500 μM; rojo con DPI 700 μM. En ambos gráficos la línea negra representa el control de actividad de GSSG-reductasa de la TGR.

Actividad residual de la TGR con los diferentes inhibidores probados

En la **Tabla 2** se observan las concentraciones de inhibidores que fueron utilizadas (desde nanomolar hasta milimolar, dependiendo del inhibidor) para lograr la mayor inhibición de la TGR de *T. crassiceps*. Adicionalmente, muestra que de los inhibidores con capacidad de unión a los sitios redox catalíticos como el AF, el NEM y el 4-VG se requirieron concentraciones menores ($< 100 \mu\text{M}$) para lograr la inhibición máxima de la enzima (prácticamente el 100%), conservando sólo una actividad residual por debajo del 0.25 %. En cambio, con inhibidores como el DPI y el Na_2SO_3 fueron requeridas concentraciones mayores ($> 700 \mu\text{M}$) para lograr la máxima inhibición (~95%) y conservando sólo una actividad residual por debajo del 4.5 %. Cabe señalar que las actividades residuales mostradas en la Tabla 2 fueron calculadas de los ensayos de inhibición obtenidos en la fig. 12a y 12b.

Tabla 2. Actividad residual de la TGR de *T. crassiceps* en presencia de diferentes inhibidores

Enzima	Inhibidor	Concentración (μM)	Actividad residual (%)
<i>TcTGR</i>	Auranofin	0.07	0.20 ± 0.013
<i>TcTGR</i>	N-etilmaleimida	33.0	0.21 ± 0.082
<i>TcTGR</i>	4-VG	100.00	0.25 ± 0.001
<i>TcTGR</i>	Difenileneioduro de cloro	700.00	1.08 ± 0.353
<i>TcTGR</i>	Sulfito de sodio	500, 000.00	4.53 ± 1.630

Nota: Los ensayos se hicieron en 600 μL , pH 7.8, TE, GSSG 67 μM a 25 °C.

Reducción del citocromo *c* por la TGR inhibida por diferentes moléculas

La TGR de *T. crassiceps* inhibida con los diferentes inhibidores como el AF, NEM, 4-VG, DPI y Na_2SO_3 mostró que esta forma modificada de la enzima puede reducir 0.5 μM de citocromo *c* en un período de 25 min (tiempo de la reacción). Los datos de la tabla 3 muestran que la enzima inhibida tanto a nivel de sitios redox catalíticos como a nivel

del FAD puede reducir al citocromo *c*, un poco semejante a lo reportado por el grupo de Holmgren [73].

Tabla 3. Reducción del citocromo *c* por la enzima tiorredoxina-glutatión reductasa en presencia de inhibidores

Enzima	Inhibidor	Concentración (μM)	Reducción del citocromo <i>c</i> (μM)
<i>TcTGR</i>	Auranofin	00.07	0.50 ± 0.027
<i>TcTGR</i>	N-etilmaleimida	33.00	0.26 ± 0.014
<i>TcTGR</i>	4-VG	100.00	0.27 ± 0.021
<i>TcTGR</i>	Difenileneioduro de cloro	700.0	0.38 ± 0.039
<i>TcTGR</i>	Sulfito de sodio	500, 000.00000	0.34 ± 0.018

Nota: Los ensayos se hicieron en 600 μL , pH 7.8, TE, NADPH 100 μM a 25 °C y se registró el cambio en la absorbancia a 550 nm.

La **Tabla 4** muestra que la TGR activa puede transferir los electrones provenientes del NADPH al citocromo *c* y lo reduce entre 5 y 10 veces mejor que su contraparte inhibida (dependiendo del inhibidor utilizado) con AF, NEM, 4-VG, DPI y Na_2SO_3 . Además de la TGR de *T. crassiceps*, también fue utilizada la TrxR de *Rattus norvegicus* y la GR de *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de inhibidores (porque sólo se quiere ver el efecto de la presencia del FAD) y se determinó que también pueden reducir al citocromo *c* ($<1.2 \mu\text{M}$) en 25 min de reacción; estas enzimas son también representantes de la familia piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa que contienen FAD.

Tabla 4. Enzimas de la familia de piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa y su capacidad para reducir al citocromo c

Enzima	Actividad (%)	Reducción de citocromo c ^{&} (μM)
<i>Tc</i> TGR	100	2.70 ± 0.180
<i>Rn</i> TrxR*	100	1.20 ± 0.175
<i>Sc</i> GR**	100	0.70 ± 0.196

Los ensayos se realizaron en un volumen final de 600 μL a 25 °C.

**Rn*TrxR: tiorredoxina reductasa de *Rattus norvegicus*

***Sc*GR: glutatión reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*

&La reducción del citocromo c se realizó por un periodo de 25 min.

Reducción del citocromo c por el anión superóxido generado por el sistema xantina- xantina oxidasa (X/XO).

La XO es una enzima homodimérica [91]. Contiene FAD, molibdeno y cuatro enlaces hierro-azufre [92]. Cataliza la producción de O₂^{•-} principalmente a partir de oxidar xantina [93]. Es bien sabido que el O₂^{•-} es capaz de transferir electrones al citocromo c y reducirlo en una vía univalente (Reacción 1) [94]. Además, el O₂^{•-} puede llevar a cabo una reacción de dismutación que puede ser química o enzimática como ya se mencionó en la introducción, [94] en ambos casos se genera H₂O₂ [95]. La reducción de citocromo c generada por la XO en presencia de xantina (Fig. 13a) puede observarse que alcanza una reducción máxima (reflejada como un incremento en la absorbancia) antes de los 8 min del tiempo de la reacción y posteriormente comienza a descender la absorbancia (lo que indicaría una oxidación) a 550 nm, mostrada en la fig. 13a, que se debe al H₂O₂ generado por la dismutación. El H₂O₂ al ser un oxidante fuerte puede quitarle electrones al citocromo c (Fig. 13a), tal oxidación del citocromo c se puede evitar con la adición de CAT en el ensayo (Fig. 13b). Asimismo, la reducción de citocromo c generada por el sistema de xantina se puede evitar utilizando a la SOD desde el inicio de la reacción [94], la fig. 13c muestra que el citocromo c no fue reducido con la adición de una alícuota de SOD.

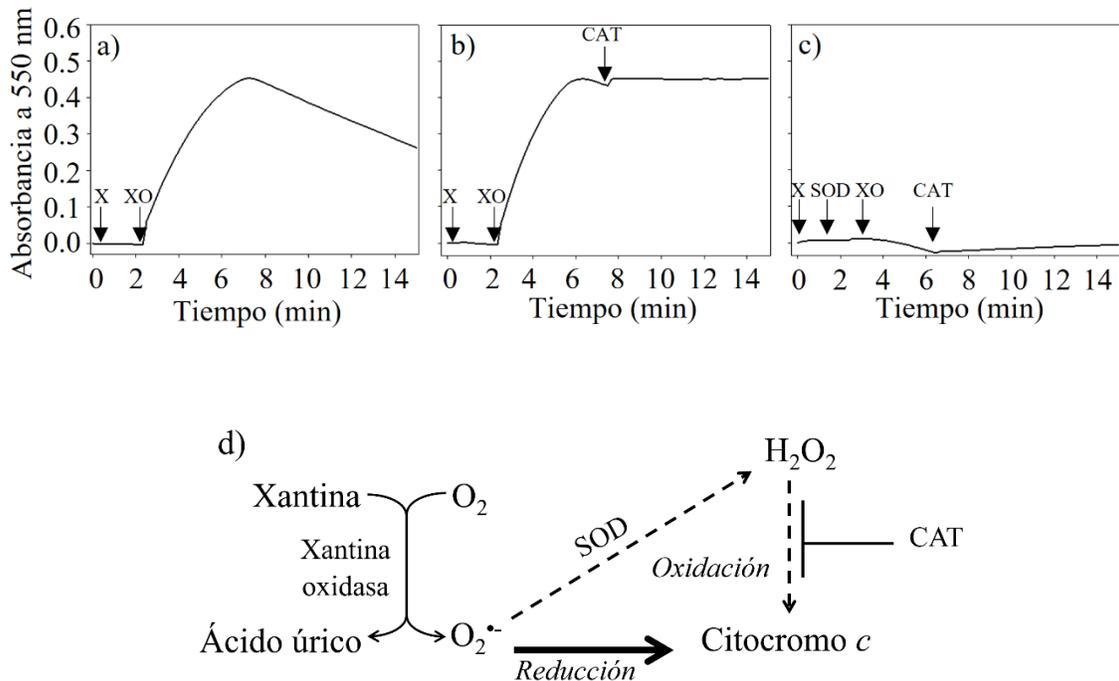


Fig. 13. Reducción del citocromo *c* por el sistema xantina-xantina oxidasa. Registro del cambio en la absorbancia a 550 nm durante 15 minutos. *a)* Reducción del citocromo *c* por el sistema xantina-xantina oxidasa. *b)* La reoxidación del citocromo *c* se evitó añadiendo CAT al ensayo. *c)* La SOD evita la reducción del citocromo *c*. *d)* Representación esquemática de la producción de $O_2^{\bullet-}$ por el sistema Xantina-Xantina Oxidasa, el $O_2^{\bullet-}$ puede reducir al citocromo *c* o dismutarse a H_2O_2 y este último reoxidar al citocromo *c*.

Generación de anión superóxido por la tiorredoxina glutatión reductasa

La fig. 14 muestra los cursos en el tiempo de la reducción del citocromo *c*, las pendientes de los trazos representan la respuesta a distintas concentraciones de TGR (líneas negras). A un duplicado de la concentración más alta de TGR utilizada se le adicionó una alícuota de SOD (línea roja) siguiendo la absorbancia a 550 nm y claramente se observó que la reducción del citocromo *c* disminuyó por debajo de todas las concentraciones de TGR utilizadas. El inserto muestra que no se conserva una proporcionalidad en la concentración de enzima con respecto a la reducción del citocromo *c*.

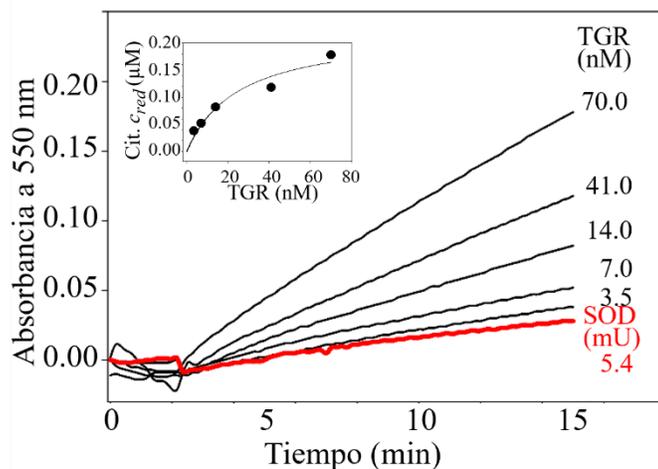


Fig. 14. Reducción del citocromo *c* por la TcTGR utilizando los equivalentes reductores del NADPH. Líneas negras: Concentraciones crecientes de TcTGR (3.5, 7.0, 14.0, 41.0 y 70 nM) y citocromo *c* 50 µM. Roja: TcTGR 70 nM y SOD 5.4 mU.

Reducción del citocromo *c* por el FAD libre

En la fig. 15 se muestran los ensayos con concentraciones crecientes de FAD libre (líneas negras) siguiendo el incremento en la absorbancia a 550 nm durante 15 minutos. El incremento en la concentración de FAD incrementó la reducción del citocromo *c* de forma directamente proporcional (ver inserto). A un duplicado con la mayor concentración de FAD utilizada se le adicionó una alícuota de SOD (línea roja), y se puede observar menor reducción del citocromo *c*.

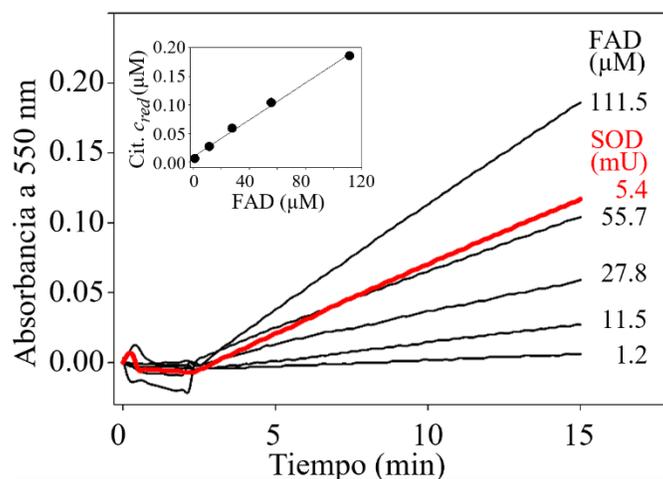


Fig. 15. Reducción del citocromo *c* por concentraciones crecientes del FAD-libre reducido por el NADPH. Líneas negras: Concentraciones crecientes de FAD (1.2, 11.5, 27.8, 55.7 y 111.5 μM) y citocromo *c* 50 μM . Roja: FAD libre 111.5 μM y 5.4 mU de SOD.

Reducción del citocromo *c* por ET, CUR, POC y distintos curcuminoides

La fig. 16, muestra que el ET, la CUR, el POC y otros curcuminoides pueden reducir al citocromo *c* y que esa reducción se potencia con la presencia del NADPH. La adición de SOD al ensayo disminuyó un poco tal reducción. Se siguió el cambio en la absorbancia a 550 nm y la concentración fue calculada a partir del coeficiente de extinción molar del citocromo *c*. En todos los casos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con excepción de aquel donde se utilizó 4-VG y este en presencia de NADPH y SOD ($p > 0.05$).

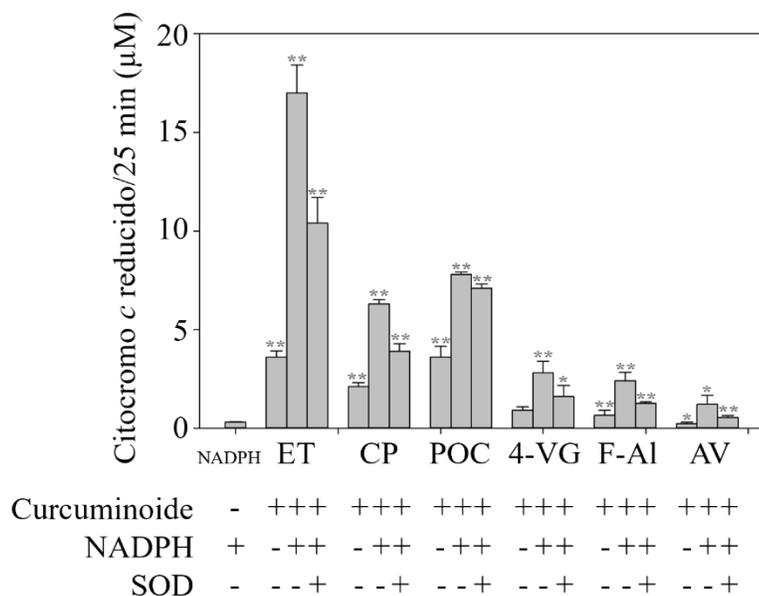


Fig. 16. Reducción del citocromo c por curcuminoides 50 µM: extracto turmérico (ET) curcumina pura (CP), productos de la oxidación de la curcumina (POC), 4-vinylguayacol (4VG), feruloil-aldehído (F-Al) y ácido vanilínico (AV), más NADPH 100 µM y/o SOD 5.4 mU. Cada ensayo se hizo por triplicado. Los datos corresponden a la media ± desviación estándar. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Resumen de la reducción del citocromo c por el anión superóxido generado por diversas moléculas.

La fig. 17 muestra una representación esquemática de los resultados obtenidos en este trabajo, en orden de importancia: las reacciones que reducen al citocromo c principalmente por la generación de $O_2^{\bullet-}$, y después por la diferencia en el potencial redox de las moléculas involucradas en la reacción. El sistema X/XO fue el más eficiente generador de $O_2^{\bullet-}$, y consecuentemente el que más redujo al citocromo c, y eso se corroboró porque fue abatida tal reducción en presencia de SOD; esta última, al dismutar al $O_2^{\bullet-}$, genera H_2O_2 que subsecuentemente puede oxidar al citocromo c, lo que se pudo prevenir con la adición de CAT y de esta forma eliminar este oxidante. En segundo lugar, el ET, la CUR, y los diversos curcuminoides redujeron al citocromo c directamente y tal reducción se potenció en presencia de NADPH; por el contrario, al incluir SOD, la reducción fue levemente menor, pero sin llegar a abatirse. En tercer lugar, las flavoenzimas como la TGR, la GR y la TrxR, por el simple hecho de contener FAD,

redujeron al citocromo *c* por la generación de anión superóxido, ya que tal reducción se abatió de manera importante al añadir SOD. En cambio, la contraparte de la enzima inhibida presentó una menor reducción. En cuarto lugar, la molécula de FAD-libre también redujo al citocromo *c* en menor proporción. Al agregar SOD su reducción solo disminuyó un tercio.

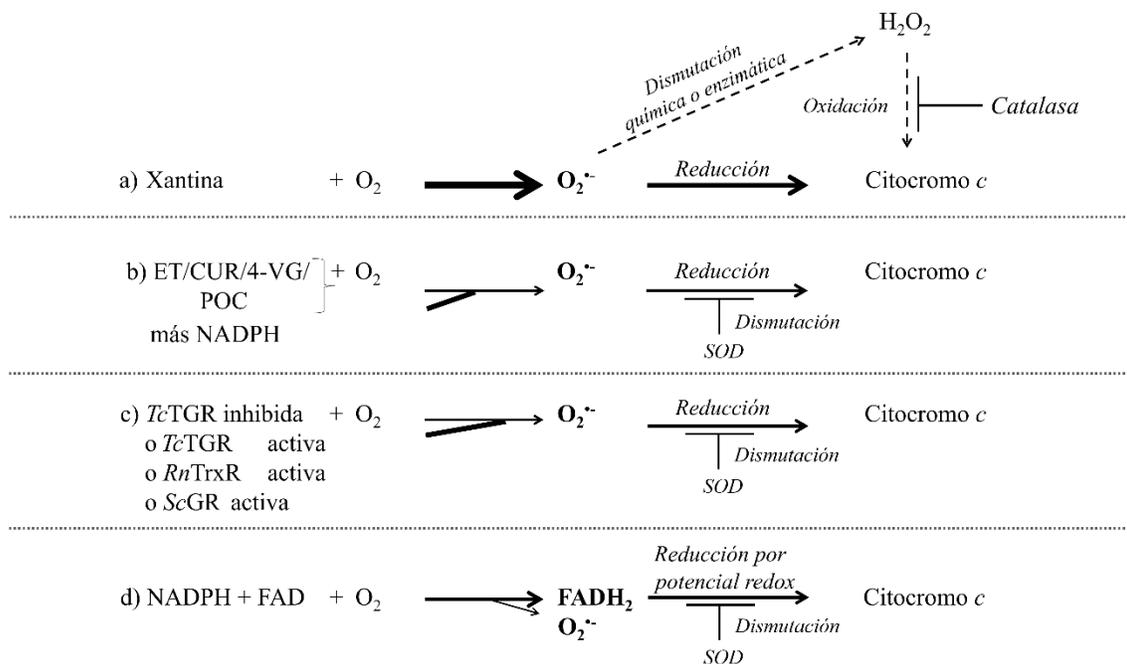


Fig. 17. Mecanismo propuesto para la reducción del citocromo *c* por a) el sistema xantina-xantina oxidasa es el principal generador de O₂^{•-}- responsable de la reducción del citocromo *c* (control positivo) b) le siguen los curcuminoides que son potenciados por el sustrato NADPH. c) posteriormente le siguen, las flavoenzimas TcTGR, TrxR y GR reducidas con NADPH y después la TcTGR inhibida (AF o NEM o CUR o DPI o Na₂SO₃) d) por último, la molécula de FAD reducida con NADPH reduce al citocromo *c*.

IV. DISCUSIÓN

En la literatura se ha documentado que diversas enzimas han sido propuestas como blanco farmacológico gracias a que se han caracterizado bioquímicamente y su papel fisiológico ha sido dilucidado; se han descubierto y desarrollado fármacos con el objetivo

de inhibir la actividad de una enzima en específico y entonces ejercer un papel benéfico, por ejemplo: el ibuprofeno es un inhibidor de la prostaglandina endoperoxidase sintasa y esto reduce la inflamación y el dolor en los seres humanos. Es interesante mencionar que la TGR del metacétodo (cisticerco) de *T. crassiceps* es una enzima esencial en el mantenimiento de la homeostasis redox puesto que puede reducir tanto a la Trx como al GSSG, como ya se mencionó en la introducción. Debido a esta gran importancia dentro de la *Taenia*, la enzima en este trabajo fue inhibida *in vitro* utilizando diferentes moléculas. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos que se unen tanto a SH como a SeH (AF, NEM, 4-VG), y los que se unen al FAD (DPI y Na₂SO₃) que están presentes en la enzima, demostraron una gran capacidad para inhibir la actividad glutatión reductasa de la TGR, siendo esta inhibición mayor a nivel de los sitios redox catalíticos en donde están presentes los SH y SeH, y eso se ve reflejado en la actividad residual fue cercana a cero (esto puede deberse a que quizá la afinidad de los compuestos por estos grupos funcionales es más alta). En el caso de la TGR, su actividad depende de un residuo de Sec que se localiza en su extremo C-terminal que es muy susceptible de ser inhibida con concentraciones nanomolares de AF [25], un compuesto que tiene una alta afinidad por el Se⁻ que es generado al disociarse el SeH de la Sec a pH fisiológico y una menor afinidad por los SH de la Cys que suelen ser menos reactivos. Asimismo, se ha reportado una IC₅₀ de 20 nM para la TrxR humana la cual contiene Sec. En contraste, se determinó una IC₅₀ para la GR y GPx de humano y fueron de 40 y > 100 μM, la primera contiene residuos de Cys catalíticos y la segunda un residuo catalítico de Sec [98], aparentemente la GPx que contiene Sec no lo tiene expuesto, por tal razón requiere una mayor concentración de AF para ser inhibida. Un efecto similar se observa con el AF, el NEM y el 4-VG que demostraron inhibir de forma eficaz la actividad glutatión-reductasa de la TGR, aparentemente en gran medida por el residuo de Sec que la enzima contiene, se concluye esto porque paralelamente fue utilizada una GR de *Saccharomyces cerevisiae* y no fue inhibida con concentraciones micromolares de los tres inhibidores. Estos datos respaldan la idea de que este compuesto se une con mayor preferencia al residuo de Sec que está presente en la TGR, pero ausente en la GR.

En las TGRs, la Sec se encuentra en su extremo C-terminal, y es parte del segundo sitio redox catalítico lo que lo hace importante para la catálisis de la enzima, igualmente es

importante el FAD que se encuentra ubicado hacia su extremo N-terminal, ya que es el primer sitio de la enzima en aceptar electrones del NADPH y los transfiere al primer centro redox de intercambio ditiol/disulfuro en la enzima [23]. Sin embargo, los inhibidores con capacidad para unirse al FAD mostraron baja afinidad por lo que se requirieron concentraciones micromolares de DPI para inhibir a la TGR (99%), cuya actividad remanente fue de aproximadamente el 1%. Para el caso del Na₂SO₃ fueron requeridas concentraciones milimolares para inhibir a la enzima (95%), cuya actividad remanente fue de aproximadamente el 5%.

Si bien, las moléculas con capacidad para unirse al FAD mostraron inhibir eficazmente la actividad de glutatión reductasa de la TGR, fueron requeridas concentraciones mayores, en comparación con lo encontrado para las moléculas que se unen a las Cys y/o Sec cuya inhibición fue también eficaz, pero requiriendo concentraciones menores.

Tanto la TGR activa como su contraparte inhibida tienen la capacidad de reducir al citocromo *c*, no obstante, se observó que la enzima activa puede reducir hasta 8.7 veces mejor que su contraparte inhibida. Estos resultados contrastan con lo que había sido reportado para la TrxR de células HeLa en donde se ha mencionado que la enzima inhibida con CUR adquiere una actividad de NADPH oxidasa y esto le confiere una capacidad mayor para reducir al citocromo *c* [73], sin embargo, en su trabajo omitieron quitar el exceso de CUR de sus ensayos enzimáticos y esto pudo sobreestimar la cantidad de citocromo *c* reducido por la enzima inhibida (ver abajo). Por otro lado, ha sido documentado que algunas flavoenzimas tienen la capacidad de reducir al citocromo *c* (en mayor o en menor medida) de forma directa o a compuestos similares como el ferricianuro [87].

La TGR inhibida tiene capacidad para reducir al citocromo *c*. La **tabla 3** muestra que <0.5 μM de citocromo *c* es reducido durante 25 minutos. Asimismo, la Tabla 4 muestra cómo enzimas como la TGR, TrxR y la GR activas pueden por sí solas reducir al citocromo *c*; siendo la TGR la más eficiente.

La XO se encuentra ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos [77], es una flavoenzima cuyo FAD es responsable de generar O₂^{•-} al transferir electrones de la xantina

al $O_2^{\bullet-}$ [57, 59]. El electrón desapareado del $O_2^{\bullet-}$ se puede transferir directamente al citocromo *c* sin necesidad de intermediarios [12, 93, 99]. Como se esperaba, el ensayo generador de $O_2^{\bullet-}$ mediado por el sistema xantina-xantina oxidasa (X/XO) (Fig. 13a) probó ser muy eficiente, puesto que en pocos minutos se alcanzó la reducción máxima de 50 μ M de citocromo *c*. En la fig. 13b, hay una re-oxidación del citocromo *c* debido a la presencia de H_2O_2 como ya se mencionó. En la fig. 13c, contrario a lo esperado, se observó una ligera oxidación <7 min que puede deberse a que una pequeña fracción del citocromo *c* estaba reducida y esa fue sensible a oxidación y al agregar CAT ~ 7 min, comienza a observarse una ligera reducción del citocromo *c* que puede deberse a que algunas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ se le escapan a la SOD [100].

La molécula que provee de electrones a los sistemas de GSH y Trx es principalmente el NADPH cuyo potencial redox es de -400 mV, tal reductor se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria al igual que ambos sistemas [101]. Las reductasas involucradas transfieren electrones desde el NADPH a la Trx-S₂ o al GSSG y los reducen a Trx-(SH)₂ y GSH respectivamente [102].

Los resultados de este trabajo indican que la reducción del citocromo *c* está principalmente mediada por la generación de $O_2^{\bullet-}$ ya sea por el sistema de xantina, curcuminoides o flavoproteínas como la TGR, ya que la adición de SOD elimina al $O_2^{\bullet-}$ por dismutación, abatiendo la reducción prácticamente en su totalidad, en algunos casos. Esto contrasta con lo reportado, ya que las deshidrogenasas reaccionan más favorablemente con citocromo *c* o ferricianuro de manera directa y no con O_2 [87]. También ha sido reportado paralelamente que enzimas que tienen como grupo prostético al FAD pueden generar $O_2^{\bullet-}$ [89]. De forma similar algunas flavoenzimas pueden llevar a cabo un proceso de autooxidación a nivel de FAD y a partir de esta generar $O_2^{\bullet-}$ [88, 103] como la flavodoxina que genera $0.055 O_2^{\bullet-} \text{ min}^{-1}$, la glutatión reductasa 0.830 , la dihidrolipoil deshidrogenasa 2.4 , la ferredoxina:NADP⁺ reductasa 3.3 , la NADPH-deshidrogenasa 4.9 [104], la succinato deshidrogenasa 13 [105], la NADH-deshidrogenasa II 15 [103], la xantina oxidasa 290 [94], la fumarato reductasa de *E. coli* 1600 [105] o la NADPH-oxidasa de neutrófilos 3900 [106]. Cabe destacar que algunas deshidrogenasas presentan niveles de reactividad con el oxígeno muy distintos a nivel de

FAD, aunque su mecanismo sea idéntico [107]. En estas enzimas la flavina reducida tiene una reactividad intrínseca con el dióxígeno [108] que es directamente proporcional a la concentración de este último [96]. Además, la flavina unida a una proteína puede tener un potencial redox muy variable (-400 – +150 mV) [106]. La reactividad de las flavoenzimas con el dióxígeno parece ser favorecida por canales dinámicos que pueden permitir que el dióxígeno entre en contacto con el FAD de manera preferencial [108].

Se ha sugerido que el potencial redox de las deshidrogenasas puede ser más negativo que el de las oxigenasas [109]. El potencial redox para algunas flavinas, en su estado más reducido, puede termodinámicamente favorecer a los sistemas redox. Como ya se ha mencionado, las flavoenzimas han demostrado ser capaces de reducir al citocromo *c* a diferencia de aquellas sin FAD [110]. Este cofactor en las flavoenzimas puede encontrarse unido covalentemente, en cuyo caso, su potencial redox es mayor que cuando se une de manera no covalente [111]. Las flavinas libres reducidas pueden generar radicales de flavina y $O_2^{\bullet-}$ especialmente si el O_2 se encuentra disponible como único aceptor de electrones. Asimismo, se ve favorecida por la diferencia de potenciales redox entre la flavina libre ($E_m = -313$ mV) y el O_2/H_2O_2 ($E_{mz} = +270$ mV) [89]; el potencial redox del citocromo *c* reducido ($E^{\circ'} = 230 - 350$ mV) [100] también le permitiría ser reducido por la flavina y el $O_2^{\bullet-}$. La fig. 15 muestra la concentración de citocromo *c* reducido con concentraciones crecientes de FAD y la poca disminución de la misma reducción utilizando la concentración más elevada de SOD lo que sugiere que el FAD reduce directamente al citocromo *c* principalmente por su diferencia de potenciales redox y en menor medida por la generación del $O_2^{\bullet-}$.

La CUR es un polifenol que se utiliza para tratar numerosas patologías humanas. Se encuentra en los rizomas de la planta *Curcuma longa* junto con otras moléculas similares conocidas como curcuminoides [97]. Ha sido reportado que la TrxR de células HeLa es inhibida con concentraciones micromolares de CUR y esta forma modificada de la enzima adquiere una nueva actividad de NADPH oxidasa que es capaz de producir $O_2^{\bullet-}$ que al tener un electrón desapareado tiene la capacidad de reducir al citocromo *c* [73]. Concentraciones de CUR en el orden de micromolar inhiben la proliferación de células cancerosas de la glándula mamaria [112]. En células HeLa, se determinó una

concentración media inhibitoria de 15 μM de curcumina para inhibir a la enzima TrxR siendo 50 μM la mayor concentración utilizada [79].

En lo que concierne al ensayo de reducción de citocromo *c* por distintos curcuminoides se pudo determinar que estos también pueden generar $\text{O}_2^{\bullet-}$, ya que al utilizar SOD se revierte parte de esa reducción, consideramos que la parte que no se revierte está dada por la generación de otros radicales de curcuminoides que no son reconocidos por la SOD. Los resultados concuerdan con lo reportado, ya que se menciona que la CUR puede generar otros radicales, al sufrir un proceso de autooxidación, como es el radical fenólico a partir de la disociación del hidrógeno de su grupo fenol [113] los cuales no serían reconocidos por la SOD debido a su alta especificidad y por eso en los ensayos donde esta enzima fue incluida, la reducción del citocromo *c* disminuyó ligeramente pero no fue igual a cero. Sin embargo, es claro observar que la reducción del citocromo *c* se dio principalmente por la diferencia en el potencial redox entre los curcuminoides y el citocromo *c*, aunque para el caso de los curcuminoides no han sido reportados, los resultados sugieren que la contribución de otros radicales en la reducción del citocromo *c* fue mínima, dado que las vitaminas como el L-AA y el α -TO no evitaron tal reducción en presencia de curcuminoides. También, se observó que los curcuminoides en presencia de NADPH potencian su capacidad de reducción del citocromo *c*. Considerando que el NADPH es una molécula que provee de equivalentes reductores a reacciones de transferencia de electrones, se concluyó que el citocromo *c* es reducido como resultado de que el NADPH transfiere electrones al curcuminoide y este a su vez al citocromo *c*. El potencial redox del NADPH es de unos -400 mV y el del citocromo *c* es de ~ 260 mV [114], lo que sugiere que el potencial redox de los distintos curcuminoides se encuentra en un punto medio entre ambos valores. Es relevante resaltar que la concentración de citocromo *c* reducida por la CUR coincide con un reporte previo en el cual se concluyó que la TrxR de células HeLa, inhibida con CUR 50 μM redujo ~ 6.1 μM al citocromo *c*. De manera puntual, en los experimentos que fueron realizados para efecto de esta tesis, la reducción de citocromo *c* en presencia de NADPH 100 μM y CUR 50 μM fue de 6.3 μM , además de que la reducción del citocromo *c* en presencia de la TGR inhibida fue ~ 5 veces menor al reportado.

REFERENCIAS

1. Balsera M, Buchanan BB. Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2019;140:28-35. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.003
2. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978;201(4359):875-880. doi:10.1126/science.210504.
3. Martinez-Sanchez G. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm,* 2005 Dic; 39(3).
4. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul;21(7):363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32231263.
5. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology & medicine.* 5th ed. Oxford (United Kingdom): Oxford University Press; 2015.
6. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002 Oct;18(10):872-9. doi: 10.1016/s0899-9007(02)00916-4. PMID: 12361782.
7. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.
8. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE.* 2000;2000(53):pe1. Published 2000 Oct 10. doi:10.1126/stke.2000.53.pe1.
9. Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* 1979;278(5706):737-738. doi:10.1038/278737a0.
10. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(10):1993. Published 2022 Oct 7. doi:10.3390/antiox11101993.
11. Blé-Castillo JL, Díaz-Zagoya JC, Méndez JD. Suplementación con vitamina E, benéfica o dañina? [Is vitamin-E supplementation beneficial or harmful?]. *Gac Med Mex.* 2008;144(2):147-154.

12. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
13. Marin-García J. Oxidative Stress and Cell Death in Cardiovascular Disease: A Post-Genomic Appraisal. *Post-Genomic Cardiology*. 2nd ed. NJ, USA. Academic Press; 2014. P. 471-498.
14. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redox regulation. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 2;14:1147414. doi: 10.3389/fphar.2023.1147414. PMID: 36937839; PMCID: PMC10017475.
15. Molavian H, Madani Tonekaboni A, Kohandel M, Sivaloganathan S. The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H₂O₂. *Sci Rep*. 2015 Sep 1;5:13620. doi: 10.1038/srep13620. PMCID: PMC4555031.
16. Guevara-Flores A, Martínez-González JJ, Rendón JL, Del Arenal IP. The Architecture of Thiol Antioxidant Systems among Invertebrate Parasites. *Molecules*. 2017 Feb 10;22(2):259. doi: 10.3390/molecules22020259. PMID: 28208651; PMCID: PMC6155587.
17. Silva-Adaya D, Gonsebatt ME, Guevara J. Thioredoxin system regulation in the central nervous system: experimental models and clinical evidence. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:590808. doi:10.1155/2014/590808.
18. Uhlig S, Wendel A. The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci*. 1992;51(14):1083-1094. doi:10.1016/0024-3205(92)90509-n.
19. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 124886, Glutathione. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutathione>. Accessed June 30, 2023.
20. Prast-Nielsen S, Huang HH, Williams DL. Thioredoxin glutathione reductase: its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(12):1262-1271. doi:10.1016/j.bbagen.2011.06.024.

21. 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.* 2010;2010:719856. doi: 10.1155/2010/719856.
22. Guevara-Flores A., CARACTERIZACION PARCIAL DEL SISTEMA DE GLUTATIÓN Y DE TIORREDOXINA EN EL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*. [tesis de maestría]. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
23. Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S, Gladyshev VN. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):3673-8. doi: 10.1073/pnas.051454398.
24. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 2000;346 Pt 1(Pt 1):1-8.
25. Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Rendón JL, Sosa-Peinado A, Del Arenal Mena IP. Purification and characterization of *Taenia crassiceps* cysticerci thioredoxin: insight into thioredoxin-glutathione-reductase (TGR) substrate recognition. *Parasitol Int.* 2015 Apr;64(2):194-201. doi: 10.1016/j.parint.2014.12.004. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25523293.
26. Williams DL, Bonilla M, Gladyshev VN, Salinas G. Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Sep 1;19(7):735-45. doi: 10.1089/ars.2012.4670. Epub 2012 Oct 3. PMID: 22909029; PMCID: PMC3739949.
27. Rendón JL, del Arenal IP, Guevara-Flores A, Uribe A, Plancarte A, Mendoza-Hernández G. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Jan;133(1):61-9.
28. Rigobello MP, Bindoli A. Mitochondrial thioredoxin reductase purification, inhibitor studies, and role in cell signaling. *Methods Enzymol.* 2010;474:109-122. doi:10.1016/S0076-6879(10)74007-6.
29. Keeseon SE, Han-Jong R, Hyeong-Kyu J. Historical overview of taeniasis and cysticercosis with molecular characterization. *Advance in Parasitology* [Internet].

- 2020 [citado 23 junio 2023];108. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X1930082X/pdf>.
30. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. 2010 Mar;137(3):335-46. doi: 10.1017/S0031182009991442. Epub 2009 Oct 19. PMID: 19835660.
 31. Bobes RJ, Estrada K, Rios-Valencia DG, Calderón-Gallegos A, de la Torre P, Carrero JC, Sanchez-Flores A, Laclette JP. The Genomes of Two Strains of *Taenia crassiceps* the Animal Model for the Study of Human Cysticercosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 10;12:876839. doi: 10.3389/fcimb.2022.876839. PMID: 35619649; PMCID: PMC9128525.
 32. Escobedo G, Larralde C, Chavarria A, Cerbón MA, Morales-Montor J. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J Parasitol*. 2004 Dec;90(6):1235-44. doi: 10.1645/GE-297R. PMID: 15715212.
 33. Landa A, Navarro L, Ochoa-Sánchez A, Jiménez L. *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*: miRNomes of the larvae and effects of miR-10-5p and let-7-5p on murine peritoneal macrophages [published correction appears in *Biosci Rep*. 2021 Jul 30;41(7):]. *Biosci Rep*. 2019;39(11):BSR20190152. doi:10.1042/BSR20190152.
 34. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun*. 2001;69(3):1766-1773. doi:10.1128/IAI.69.3.1766-1773.2001.
 35. Suzuki LA, Arruda GC, Quagliato EM, Rossi QL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):152-155. doi:10.1590/s0037-86822007000200002.
 36. Vaca-Paniagua F, Parra-Unda R, Landa A. Characterization of one typical 2-Cys peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res*. 2009;105(3):781-787. doi:10.1007/s00436-009-1461-6.

37. Heldwein K, Biedermann HG, Hamperl WD, et al. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(1):108-11. → Freeman RS. STUDIES ON THE BIOLOGY OF *TAENIA CRASSICEPS*. *Can. J. Zool.* 1962;40:970-990.
38. Goesseringer N, Lindenblatt N, Mihic-Probst D, Grimm F, Giovanoli P. *Taenia crassiceps* upper limb fasciitis in a patient with untreated acquired immunodeficiency syndrome and chronic hepatitis C infection--the role of surgical debridement. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64(7):e174-e176. doi:10.1016/j.bjps.2011.02.011.
39. Chermette R, Bussi eras J, Marionneau J, et al. Cysticercose envahissante   *Taenia crassiceps* chez un patient atteint de sida [Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient]. *Bull Acad Natl Med.*
40. Klinker H, Tintelnot K, Joeres R, et al. *Taenia crassiceps*-Infektion bei AIDS [Taenia crassiceps infection in AIDS]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1992;117(4):133-138. doi:10.1055/s-2008-1062291.
41. Fran ois A, Favennec L, Cambon-Michot C, et al. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome?. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(4):488-492. doi:10.1097/00000478-199804000-00015.
42. Flo  N, Dolff S, Junker A, et al. Cerebral *Taenia crassiceps* larvae infection in a 71-year-old immunocompetent male. *Infection.* 2023;51(1):277-281. doi:10.1007/s15010-022-01912-w.
43. Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, C elierier P. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS.* 1998 Aug 20;12(12):1551-2. doi: 10.1097/00002030-199812000-00019. PMID: 9727578.
44. Roesel C, Welter S, Stamatis G, Theegarten D, Tappe D. Management of a chest-wall soft-tissue tumor caused by an infection with the larval tapeworm pathogen *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):541-543. doi:10.4269/ajtmh.14-0185.
45. Phillippi-Taylor A. Antiparasitic Resistance: Challenges, Awareness, Change. Center for Veterinary Medicine Office of New Animal Drug Evaluation: U.S. Food

- and Drug Administration. 2020. https://rr-asia.woah.org/wp-content/uploads/2020/01/7-2_antiparasitic_resistance_challenges__awareness_and_.pdf.
46. Borgsteede FH, Moll L, Vellema P, Gaasenbeek CP. Lack of reversion in triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet Rec.* 2005;156(11):350-351. doi:10.1136/vr.156.11.350.
 47. Imacaña MA. Determinación de la efectividad de un antihelmíntico (prazicuantel + pamoato pirantel) en parásitos gastrointestinales de caninos mediante la prueba de reducción de recuento de huevos fecales [tesis de licenciatura]. Cuenca (EC): Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca; 2022.
 48. Alvarez-Sánchez MA, Mainar-Jaime RC, Pérez-García J, Rojo-Vázquez FA. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec.* 2006;159(13):424-425. doi:10.1136/vr.159.13.424.
 49. Lacey E, Gill JH. Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Trop.* 1994;56(2-3):245-262. doi:10.1016/0001-706x(94)90066-3.
 50. Food and Drug Administration. New Antiparasitic Drugs Needed for Sheep and Goats. United States: FDA; 2023 [actualizado 2023 Apr 24] <https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/new-antiparasitic-drugs-needed-sheep-and-goats>.
 51. Selzer PM, Epe C. Antiparasitics in Animal Health: Quo Vadis?. *Trends Parasitol.* 2021;37(1):77-89. doi:10.1016/j.pt.2020.09.004.
 52. Weller PF, Longworth DL, Jaffe JJ. Leukotriene C4 synthesis catalyzed by *Dirofilaria immitis* glutathione S-transferase. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(2):171-175. doi:10.4269/ajtmh.1989.40.171.
 53. Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J.* 1997;154(1):11-34. doi:10.1016/s1090-0233(05)80005-x.
 54. Scholar E. Trimethoprim. En: Enna SJ, Bylund DB, editors. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA: Elsevier; 2008. p. [1-6].
 55. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for

- CID 5578, Trimethoprim; [cited 2023 Aug. 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>.
56. TRIMETHOPRIM TABLETS, USP 2158. U.S. Food and Drug Administration. U.S. department of health and human services; 2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/018679s0441b1.pdf.
 57. Khademi R, Ghaffarifar F, Dalimi Asl H. In Vitro Effect of Folic Acid and Cobalamin (Vitamin B12) on Adhesion and Growth of Giardia lamblia. Iranian J Parasitol. 2006;1(1):47-52.
 58. Brophy VH, Vasquez J, Nelson RG, Forney JR, Rosowsky A, Sibley CH. Identification of Cryptosporidium parvum dihydrofolate reductase inhibitors by complementation in Saccharomyces cerevisiae. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(4):1019-1028. doi:10.1128/AAC.44.4.1019-1028.2000.
 59. Minigh J, Auranofin. In: Enna SJ and Bylund DB, editors. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Manchester, USA: Elsevier; 2008. p. 1-6.
 60. Kim NH, Lee MY, Park SJ, Choi JS, Oh MK, Kim IS. Auranofin blocks interleukin-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3. Immunology. 2007 Dec;122(4):607-14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02679.x. Epub 2007 Jul 20. PMID: 17645497; PMCID: PMC2266044.
 61. Gasdaska JR, Kirkpatrick DL, Montfort W, Kuperus M, Hill SR, Berggren M, Powis G. Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys73-->Ser mutation. Biochem Pharmacol. 1996 Dec 13;52(11):1741-7. doi: 10.1016/s0006-2952(96)00595-3. PMID: 8986137.
 62. Cox AG, Peskin AV, Paton LN, Winterbourn CC, Hampton MB. Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. Biochemistry. 2009 Jul 14;48(27):6495-501. doi: 10.1021/bi900558g. Erratum in: Biochemistry. 2010 Nov 9;49(44):9677. PMID: 19462976.
 63. Santa Cruz Animal Health. N-Ethylmaleimide (CAS 128-53-0). Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 2023. https://www.scbt.com/es/p/n-ethylmaleimide-128-53-0?productCanUrl=n-ethylmaleimide-128-53-0&_requestid=171366

64. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 4362, N-ethylmaleimide; [cited 2023 Dec. 13].
65. Hermawan A, Chirico WJ. N-Ethylmaleimide-modified Hsp70 inhibits protein folding. *Arch Biochem Biophys.* 1999 Sep 1;369(1):157-62. doi: 10.1006/abbi.1999.1354. PMID: 10462452.
66. Esatbeyoglu T, Ulbrich K, Rehberg C, Rohn S, Rimbach G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Funct.* 2015;6(3):887-893. doi:10.1039/c4fo00790e.
67. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. Anti-inflammatory effect of 2-methoxy-4-vinylphenol via the suppression of NF- κ B and MAPK activation, and acetylation of histone H3. *Arch Pharm Res.* 2011 Dec;34(12):2109-16. doi: 10.1007/s12272-011-1214-9. Epub 2011 Dec 31. PMID: 22210037.
68. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:1-75.
69. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J Exp Biol.* 1980 Jan;18(1):73-5.
70. Rao DS, Sekhara NC, Satyanarayana MN, Srinivasan M. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *J Nutr.* 1970 Nov;100(11):1307-15. doi: 10.1093/jn/100.11.1307. PMID: 5476433.
71. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med.* 2003 Feb;9(1):161-8.
72. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem.* 1995 Oct 20;270(42):24995-5000.
73. Fang J, Lu J, Holmgren A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):25284-90.

74. Schneider C, Gordon ON, Edwards RL, Luis PB. Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. *J Agric Food Chem*. 2015;63(35):7606-7614. doi:10.1021/acs.jafc.5b00244.
75. Griesser M, Pistis V, Suzuki T, Tejera N, Pratt DA, Schneider C. Autoxidative and cyclooxygenase-2 catalyzed transformation of the dietary chemopreventive agent curcumin. *J Biol Chem*. 2011;286(2):1114-1124. doi:10.1074/jbc.M110.178806.
76. Wang Q, Qian L, Chen SH, et al. Post-treatment with an ultra-low dose of NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium attenuates disease progression in multiple Parkinson's disease models. *Brain*. 2015;138(5):1247-1262. doi:10.1093/brain/awv034.
77. Monzur S, Hassan G, Afify SM, et al. Diphenyleneiodonium efficiently inhibits the characteristics of a cancer stem cell model derived from induced pluripotent stem cells. *Cell Biochem Funct*. 2022;40(3):310-320. doi:10.1002/cbf.3696.
78. Tew DG. Inhibition of cytochrome P450 reductase by the diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications. *Biochemistry*. 1993 Sep 28;32(38):10209-15.
79. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 3101, Diphenyleneiodonium; [cited 2022 Dec. 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diphenyleneiodonium>.
80. Park SE, Song JD, Kim KM, Park YM, Kim ND, Yoo YH, Park YC. Diphenyleneiodonium induces ROS-independent p53 expression and apoptosis in human RPE cells. *FEBS Lett*. 2007 Jan 23;581(2):180-6. doi: 10.1016/j.febslet.2006.12.006. Epub 2006 Dec 13. PMID: 17184774.
81. Cross AR, Jones OT. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J*. 1986 Jul 1;237(1):111-6. doi: 10.1042/bj2370111. PMID: 3800872; PMCID: PMC1146954.
82. Zavadskis S, Weidinger A, Hanetseder D, Banerjee A, Schneider C, Wolbank S, Marolt Presen D, Kozlov AV. Effect of Diphenyleneiodonium Chloride on Intracellular Reactive Oxygen Species Metabolism with Emphasis on NADPH

- Oxidase and Mitochondria in Two Therapeutically Relevant Human Cell Types. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 23;13(1):10.
83. Kouki A, Ferjani W, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attia M, Dang PM, Souli A, El-Benna J. The NADPH Oxidase Inhibitors Apocynin and Diphenyleneiodonium Protect Rats from LPS-Induced Pulmonary Inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Mar 21;12(3):770. doi: 10.3390/antiox12030770. PMID: 36979018; PMCID: PMC10045801.
84. Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur J Biochem*. 1997 May 1;245(3):541-8.
85. Nair B, Elmore AR; Cosmetic Ingredients Review Expert Panel. Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite. *Int J Toxicol*. 2003;22 Suppl 2:63-88. doi:10.1080/10915810305077x.
86. Swoboda BE, Massey V. On the reaction of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* with bisulfite. *J Biol Chem*. 1966 Jul 25;241(14):3409-16. PMID: 5913131.
87. Massey V, Müller F, Feldberg R, Schuman M, Sullivan PA, Howell LG, Mayhew SG, Matthews RG, Foust GP. The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity. *J Biol Chem*. 1969 Aug 10;244(15):3999-4006. PMID: 4389773.
88. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42563-71. doi: 10.1074/jbc.M204958200. Epub 2002 Aug 27. PMID: 12200425.
89. Massey V. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem*. 1994 Sep 9;269(36):22459-62.
90. Silvestri I, Lyu H, Fata F, Banta PR, Mattei B, Ippoliti R, Bellelli A, Pitari G, Ardini M, Petukhova V, Thatcher GRJ, Petukhov PA, Williams DL, Angelucci F. Ectopic suicide inhibition of thioredoxin glutathione reductase. *Free Radic Biol*

- Med. 2020 Feb 1;147:200-211. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.019. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31870799; PMCID: PMC7583042.
91. Bachmann K. Chapter 8 - Drug metabolism. In: M. Hacker, W. Messer, K.B.T.-P. Bachmann, editors. *Pharmacology Principles and Practice*. San Diego: Academic Press; 2017. p. 131-173.
 92. Aziz N, Jamil RT. Biochemistry, Xanthine Oxidase. [Updated 2023 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545245/>.
 93. Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, Wakatsuki J, Aoki T, Kobayashi C, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res*. 2009 Dec 11;1305:158-67.
 94. Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1970 Aug 25;245(16):4053-7.
 95. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1968 Nov 10;243(21):5753-60.
 96. Mattevi A. To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem Sci*. 2006 May;31(5):276-83.
 97. Guevara-Flores A, Martínez-González JJ, Herrera-Juárez ÁM, Rendón JL, González-Andrade M, Torres Durán PV, Enríquez-Habib RG, Del Arenal Mena IP. Effect of curcuminoids and curcumin derivate products on thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps cysticerci*. Evidence suggesting a curcumin oxidation product as a suitable inhibitor. *PLoS One*. 2019 Jul 22;14(7)
 98. Gromer S, Arscott LD, Williams CH Jr, Schirmer RH, Becker K. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20096-101. doi: 10.1074/jbc.273.32.20096.
 99. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem*. 1970 Mar 25;245(6):1374-7. PMID: 5462997.

100. Battistuzzi G, Borsari M, Cowan JA, Ranieri A, Sola M. Control of cytochrome C redox potential: axial ligation and protein environment effects. *J Am Chem Soc.* 2002 May 15;124(19):5315-24.
101. Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev.* 2010 Apr;31(2):194-223. doi: 10.1210/er.2009-0026. Epub 2009 Dec 9. PMID: 20007326; PMCID: PMC2852209.
102. Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2018 Jan 20;28(3):251-272. doi: 10.1089/ars.2017.7216.
103. Messner KR, Imlay JA. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1999 Apr 9;274(15):10119-28. doi: 10.1074/jbc.274.15.10119. PMID: 10187794.
104. Massey V, Strickland S, Mayhew SG, Howell LG, Engel PC, Matthews RG, Schuman M, Sullivan PA. The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Sep 10;36(6):891-7. doi: 10.1016/0006-291x(69)90287-3. PMID: 5388670.
105. Imlay JA. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1995 Aug 25;270(34):19767-77. PMID: 7649986.
106. Miki T, Yoshida LS, Kakinuma K. Reconstitution of superoxide-forming NADPH oxidase activity with cytochrome b558 purified from porcine neutrophils. Requirement of a membrane-bound flavin enzyme for reconstitution of activity. *J Biol Chem.* 1992 Sep 15;267(26):18695-701. PMID: 1326533.
107. Massey V, The reactivity of oxygen with flavoproteins. International Congress Series 1233; Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, 2002: 3-11.

108. Romero E, Gómez Castellanos JR, Gadda G, Fraaije MW, Mattevi A. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chem Rev.* 2018 Feb 28;118(4):1742-1769.
109. Schachinger F, Ma S, Ludwig R, Redox potential of FAD-dependent glucose dehydrogenase 2023; 146.
110. Morton M. Weber, Howard M. Lenhoff, Nathan O. Kaplan, THE REDUCTION OF INORGANIC IRON AND CYTOCHROME c BY FLAVIN ENZYMES, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 220, Issue 1, 1956, Pages 93-104, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65335-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65335-9)
111. Martin C, Binda C, Fraaije MW, Mattevi A, The multipurpose family of flavoprotein oxidases. In: Pimchai C, Tamanoi F, editors. *The Enzymes*. Academic Press, 2020:63– 86. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2020.05.002>
112. Hong RL, Spohn WH, Hung MC. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clin Cancer Res.* 1999 Jul;5(7):1884-91.
113. Zhu, Julia, Curcumin and Its Oxidative Degradation Products: Their Comparative Effects on Inflammation. [tesis de maestría]. USA Massachusetts.: University of Massachusetts Amherst; 2016. <https://doi.org/10.7275/8433277> https://scholarworks.umass.edu/masters_theses_2/387.
114. Battistuzzi G, Borsari M, Sola M. Redox properties of cytochrome c. *Antioxid Redox Signal.* 2001 Apr;3(2):279-91. doi: 10.1089/152308601300185232. PMID: 11396482.