



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DEL AURANOFÍN EN LOS PROCESOS REDOX DEL
CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ DE JESÚS MARTÍNEZ GONZÁLEZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno:

Autor.
Apellido paterno: Martínez
Apellido materno: González
Nombre(s): José de Jesús
Teléfono: (044 55) 29 02 60 50
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela: Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
No. de cuenta: 09921658-0

2. Datos del tutor:

Grado: Dra.
Nombre(s): Irene Patricia
Apellido paterno: del Arenal
Apellido materno: Mena

3. Datos del sinodal 1:

Grado: Dra.
Nombre(s): Ana
Apellido paterno: Flisser
Apellido materno: Steinbruch

4. Datos del sinodal 2:

Grado: Dr.
Nombre(s): Héctor
Apellido paterno: Quiroz
Apellido materno: Romero

5. Datos del sinodal 3:

Grado: Dra.
Nombre(s): Luisa Alvarina
Apellido paterno: Alba
Apellido materno: Lois

6. Datos del sinodal 4:

Grado: Quím.
Nombre(s): José Gilberto
Apellido paterno: González
Apellido materno: Villanueva

7. Datos del trabajo escrito:

Título: Efectos del Auranofín en los procesos redox del cisticerco de *Taenia crassiceps*.
Número de páginas: 86 pág.
Año: 2009

AGRADECIMIENTOS

“¿Qué poseemos que no hayamos recibido de otro?”
S. Pablo

*“Cada uno de nosotros no es más que un simple instrumento de Dios.
Llevamos a término nuestra humilde tarea y desaparecemos”*
B. Madre Teresa de Calcuta
Premio Nóbel de la Paz, 1979

A Dios

Por conceder la serenidad para aceptar las cosas que no puedo cambiar, el valor para cambiar aquellas que puedo y la sabiduría para discernir entre ambas. Para que siga siendo su voluntad y no la mía.

A mi madre

Por enseñarme que un sueño puede volverse realidad, si se lucha por ello. Que no importa que tan difícil sea, siempre se puede salir adelante. Que amar es darlo todo, sin reservas y sin esperar nada a cambio. Que en cualquier lugar donde esté tendré su amor y su fe en mí.

A mi padre

Por mostrarme que el camino nunca es fácil. Que la grandeza se manifiesta no en lo acertado de nuestras decisiones sino en la forma en como asumimos la responsabilidad de nuestras acciones. Que no hay que temer a la adversidad, a la soledad o la calumnia. Que amar es perdonar.

A mis hermanos

Por ser la alegría, la luz y la esperanza en la oscuridad de mis temores. Por enseñarme que el amor es algo que se demuestra. Por todas aquellas ocasiones que lloramos juntos y por todas las risas que compartimos. Por recordarme día a día que vale la pena esforzarse un poco más y que el ejemplo es la mejor manera de enseñar.

A mi familia

Por perdonar mis errores y apoyar mis decisiones. Por mostrarme que la unidad es fortaleza. Que una sonrisa sincera, un abrazo o un buen deseo son suficientes para comenzar a derretir un corazón de hielo.

A la Dra. Patricia

Por ser mi guía, maestra y amiga en este camino recién comenzado. Por su paciencia y por creer en mí desde el principio. Por enseñarme a que no solo la mente debe cultivarse. Por devolverme la fe en las personas y en mi mismo.

A mis sinodales

Por regalarme un momento para compartir su experiencia y sabiduría. Por enseñarme a que siempre es importante detenerse un momento a contemplar la obra. Por mostrarme mis yerros y señalarme nuevos caminos.

Al apoyo técnico

Agradezco a la Dra. Georgina Álvarez Fernández por su ayuda en el desarrollo de la técnica de detección de la actividad de la TGR en gel; al estudiante de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica Jesús Renan Vergara Gutiérrez por su apoyo en el análisis estadístico de este trabajo y al Sr. Gabriel Orozco Hoyuela, técnico de la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por su apoyo en la obtención de las imágenes y video de los cisticercos.

A mis amigos del laboratorio

Por hacer más ameno las labores. Por todos los momentos compartidos y el apoyo recibido (moral o experimental). Por la risa cómplice, el momento reflexivo y los momentos solemnes al hacer la unidad.

A mis amigos de la carrera y del Universum

Por el camino andado, por los momentos compartidos; por la despedida incierta y por la promesa de la amistad verdadera.

A la Tuna del Centro Universitario Cultural (CUC).

Por mostrarme que hay tiempo para la solemnidad y tiempo para la picardía. Por tantas aventuras y noches de bohemia. Por enseñarme a reír de la vida y de mi mismo. Por darme la oportunidad de crecer y trascender dentro de esta hermandad... ¡Aupa Tuna!

Al Consejo General de Huelga y a todos a aquéllos que lucharon (y luchan) por un ideal... por una oportunidad para todos

Por aquéllos que arriesgan su vida y su libertad por un mundo en donde ninguna voz sea censurada. Por los que combaten la ignorancia y la opresión con cultura y educación. A todos lo que ya no están. La verdadera revolución comienza desde nuestro interior.

Este trabajo se realizó con el apoyo otorgado por DGAPA/ UNAM IN207308-2

PENSAMIENTO

-Líbrame, Señor:

Del deseo de ser estimado.

Del deseo de ser lisonjero.

Del deseo de ser alabado.

Del deseo de ser honrado:

Líbrame, Señor.

-Líbrame, Señor:

Del deseo de ser aplaudido.

Del deseo de ser preferido a otros.

Del deseo de ser consultado.

Del deseo de tener aceptación:

Líbrame, Señor.

-Líbrame, Señor:

Del temor de ser humillado.

Del temor de ser despreciado.

Del temor de ser reprendido.

Del temor de ser calumniado:

Líbrame, Señor.

-Líbrame, Señor:

Del temor de ser olvidado.

Del temor de ser puesto en ridículo.

Del temor de ser injuriado.

Del temor de ser juzgado con malicia:

Líbrame, Señor.

Que otros sean más amados que yo.

Que otros sean más estimados que yo.

Que otros crezcan en la opinión del mundo y yo me eclipse.

Que otros sean alabados y de mí no se haga caso:

Señor, concédeme la gracia de desearlo.

Que otros sean empleados en cargos y a mi se me juzgue inútil.

Que otros sean preferidos a mí en todo.

Que todos los demás sean más santos que yo, con tal de que yo sea todo lo santo que pueda.

Señor, concédeme la gracia de desearlo.

Amén.

C. Rafael Merry de Val.
(1865-1930)

YO TE NOMBRO

Por el pájaro enjaulado,
por el pez en la pecera,
por mi amigo que está preso,
porque ha dicho lo que piensa.

Por la idea perseguida,
por los golpes recibidos,
por aquel que no resiste,
por aquellos que se esconden.

Por la flores arrancadas,
por la hierba pisoteada,
por los árboles podados,
por los cuerpos torturados:

Por el miedo que te tienen,
por tus pasos que vigilan,
por la forma en que te atacan,
por los hijos que te matan:

Por los dientes apretados,
por la rabia contenida,
por el nudo en la garganta,
por las bocas que no cantan.

Por las tierras invadidas,
por los pueblos conquistados,
por la gente sometida,
por los hombres explotados.

Por el beso clandestino,
por el verso censurado,
por el joven exilado,
por los nombres prohibidos

Por los muertos en la hoguera,
por el justo ajusticiado,
por el héroe asesinado,
por los fuegos apagados:

Te nombro en nombre de todos
por tu nombre verdadero.
Te nombro cuando oscurece,
cuando nadie me ve:
escribo tu nombre
en las paredes de mi ciudad.
Tu nombre verdadero,
Tu nombre y otros nombres
Que no nombro por temor.

...Libertad

Gian Franco Pagliaro

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
PENSAMIENTOS	5
ÍNDICE	7
RESUMEN	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	12
1. <i>Homeostasis redox</i>	12
1.1 Definición de homeostasis redox	12
1.2 Definición de Especie Reactiva de Oxígeno (ERO)	14
Radical superóxido	16
Peróxido de Hidrógeno	16
Radical hidroxilo	16
Ácido hipocloroso	17
Oxígeno en singulete	17
1.3 Definición de Especie Reactiva de Nitrógeno (ERN)	17
Óxido nítrico	17
Peroxinitrito	19
Otras	19
1.4 Procesos fisiológicos de generación de especies reactivas	19
Respiración	19
Estallido respiratorio	20
Mecanismos de transducción de señales redox-dependientes	20
Otros procesos fisiológicos y/o patológicos	20
1.5 Mecanismos antioxidantes	21
Primer Nivel: superóxido dismutasa	22
Segundo Nivel: catalasa y otras peroxidasas	22
Tercer Nivel: antioxidantes no enzimáticos: compuestos vitamínicos y no vitamínicos	24
Cuarto Nivel: regeneración o recambio de proteínas	26
2. <i>Sistemas dependientes del glutatión y la tiorredoxina</i>	27
2.1 Sistema dependiente del Glutatión	27
Glutatión (GSSG/GSH)	27
Glutatión Peroxidasa (GPx)	29
Glutatión Reductasa (GR)	30
Glutarredoxina	31
2.2 Sistema dependiente de la Tiorredoxina	32
Tiorredoxina (Trx-(S ₂)/Trx-(SH) ₂)	32
Tiorredoxina Peroxidasa (TPx) o Peroxirredoxinas (Prx)	34
Tiorredoxina Reductasa (TrxR)	34
2.3 Tiorredoxina Glutatión Reductasa	36
Características y mecanismo de acción	36
3. <i>Selenoproteínas</i>	40
3.1 Características de la selenocisteína (Sec)	40
3.2 Características generales de las selenoproteínas	40

3.3 Selenoproteoma humano	41
4. <i>Auranofín</i>	44
4.1 Uso farmacológico	44
4.2 El auranofín y las selenoproteínas	45
5. <i>Biología de Taenia crassiceps</i>	47
5.1 Generalidades de los platelmintos	47
5.2 La clase Cestoda	47
5.3 Biología de <i>Taenia crassiceps</i>	48
5.4 La TGR y los céstodos	51
5.5 Efecto del auranofín en la TGR de <i>T. crassiceps</i>	51
5.6 El cisticerco de <i>T. crassiceps</i> como modelo de estudio	53
ANTECEDENTES	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
1. <i>Hipótesis</i>	55
2. <i>Objetivos</i>	55
2.1 Objetivo general	55
2.2 Objetivos particulares	55
MATERIALES Y MÉTODOS	56
1. <i>Reactivos</i>	56
2. <i>Obtención del material biológico</i>	56
3. <i>Selección y mantenimiento de los cisticercos</i>	56
4. <i>Parámetros de viabilidad</i>	57
4.1 Determinación de la viabilidad por motilidad	57
4.2 Determinación de la viabilidad por colorantes vitales	57
4.3 Determinación del consumo O ₂	57
5. <i>Efecto del auranofín en los cisticercos</i>	57
5.1 Efecto del tiempo	58
5.2 Efecto de la concentración	58
5.3 Infectividad	58
6. <i>Obtención de extractos crudos</i>	58
6.1 Determinación de proteína	59
7. <i>Evaluación de la actividad enzimática</i>	59
7.1 Por espectrofotometría	59
7.2 Por zimograma	59
8. <i>Análisis estadístico</i>	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
1. <i>Caracterización de parámetros de viabilidad</i>	62
1.1 Motilidad	62
1.2 Tinción por colorantes vitales	62
1.3 Consumo O ₂	64
2. <i>Mantenimiento en medio de cultivo</i>	65
3. <i>Efectos del auranofín</i>	66
3.1 Efecto del tiempo	67
3.2 Efecto de la concentración	69
3.3 Validación de los controles	71
3.4 Efecto en la infectividad	71
3.5 En la actividad de la TGR	73
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), son generados en las células en diversos procesos biológicos como la respiración y en la catálisis mediada por diversas enzimas (ej. hipoxantina/xantina oxidasa, lipooxigenasa, NADPH oxidasa, etc). Es conocido que altos niveles de ERO producen estrés oxidativo mientras que bajos niveles participan en vías de señalización sensibles a variaciones redox. En la célula, existen diversos mecanismos que ayudan a mantener la homeostasis redox. Dos de éstos, son el sistema dependiente de glutatión y el sistema dependiente de la tiorredoxina; los cuales constan de una reductasa (glutatión reductasa, GR y tiorredoxina reductasa, TrxR ; respectivamente) que transfiere electrones provenientes del NADPH a un sustrato (glutatión o tiorredoxina). Sin embargo, se ha reportado la existencia de una reductasa que es capaz de reducir tanto al glutatión como a la tiorredoxina (Sun, 2001). Esta selenoenzima, la Tiorredoxina Glutatión Reductasa (TGR), descrita primero en mamíferos, se ha reportado en diversos organismos parásitos como en *Schistosoma mansoni* (Heather, 2002), *Echinococcus granulosus* (Agorio, 2003) y en *Taenia crassiceps* (Rendón, 2004). A diferencia de los mamíferos (que poseen además GR y TR), en los platelmintos antes mencionados solo se ha encontrado a la TGR por lo cual se infiere que esta enzima es vital para estos organismos. La TGR pura se inhibe con auranofín en concentraciones de 10 nM. En este trabajo utilizamos el auranofín para evaluar su efecto en la sobrevivencia de los cisticercos de *T. crassiceps*. Determinamos las condiciones óptimas de mantenimiento de los cisticercos y diversos parámetros de viabilidad: movimiento, colorantes vitales, consumo de O₂ e infectividad. Adicionalmente, se homogeneizaron cisticercos tratados y se evaluó la actividad de la TGR mediante espectrofotometría y en un zimograma. Nuestros resultados indican que a una concentración 10 µM de auranofín la TGR se inhibe a partir de las dos horas de exposición a este compuesto aunque los cisticercos sobreviven 10 horas más. Por otro lado, se demostró que el auranofín tiene un efecto letal dosis-dependiente en los cisticercos de *T. crassiceps*, lo que corrobora la propuesta de que la TGR es vital para la supervivencia de éstos parásitos, convirtiendo a esta enzima en un blanco idóneo para el desarrollo de fármacos contra la cisticercosis.

Palabras clave: Especies Reactivas de Oxígeno, Tiorredoxina Glutatión Reductasa, *Taenia crassiceps*, Selenoproteínas, Auranofín.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	oxígeno en singulete
AA	ácido ascórbico
AF	auranofín
AFS (PBS)	solución amortiguadora de fosfato salina (del inglés <i>phosphate buffer saline</i>)
AL	ácido lipóico
AT-M	viabilidad azul tripano – movimiento
CAT	catalasa
DMSO	dimetilsulfóxido
AEDT (EDTA)	ácido etilendiamintetraacético (en inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ERN (RNS)	especie(s) reactiva(s) derivadas del nitrógeno (del inglés <i>reactive nitrogen species</i>)
ERO (ROS)	especie(s) reactiva(s) derivadas del oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
FAD	flavina adenina dinucleótido
<i>g</i>	fuerza centrífuga relativa
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
Grx –(S ₂)	glutarredoxina (forma oxidada)
Grx –(SH) ₂	glutarredoxina (forma reducida)
Grx –SG	glutarredoxina glutationilada
GSH	glutación (forma reducida)
GSSG	disulfuro de glutación (forma oxidada)
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HO [⊖]	ión hidroxilo
HO [•]	radical hidroxilo
MPO	mieloperoxidasa
MTT	bromuro de tetrazolio azul de tiazolil
NADP [⊕]	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)

ABREVIATURAS (continuación)

NADPH	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
nat O ₂	nanoátomos de oxígeno
nm	nanómetros
\cdot NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
O ₂ \cdot^{\ominus}	radical superóxido
ONOO $^{\ominus}$	peroxinitrito
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
Prot –SH	proteína reducida
Prot –SSG	proteína glutacionilada
Prx	peroxirredoxina
redox	reducido / oxidado
Sec , U	selenocisteína
SOD	superóxido dismutasa
TGR	tiorredoxina glutatión reductasa
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
Trx –S ₂	tiorredoxina (forma oxidada)
Trx –(SH) ₂	tiorredoxina (forma reducida)
TrxP	tiorredoxina peroxidasa
TrxR	tiorredoxina reductasa
\ominus	carga negativa
\oplus	carga positiva

INTRODUCCIÓN

Según estimaciones biogeoquímicas, la Tierra se originó hace aproximadamente 4600 millones de años. La primera evidencia de vida microbiana se ha observado en rocas con una edad de 3860 millones de años. Así mismo, el registro fósil parece indicar que los primeros organismos aerobios (cianobacterias) surgieron probablemente hace 3000 millones de años (Nelson y Cox, 2008). Es notable observar que, aunque se cree que los tres dominios de la vida ya habían divergido para ese entonces, la liberación de O₂ producto de la fotosíntesis oxigénica y su acumulación gradual en la atmósfera, permitieron que la velocidad de la evolución (de nuevos organismos y nuevas rutas metabólicas) se incrementara considerablemente. (Mandigan, *et.al.* 2004)

En el caso de los organismos aerobios, el oxígeno permite extraer una mayor cantidad de energía de los compuestos que son oxidados al servir como último aceptor de la cadena de transporte de electrones y reducirse a una molécula de agua. Por lo contrario, en los organismos fotosintéticos oxigénicos el agua se utiliza como un donador de electrones, los cuales serán utilizados para generar poder reductor en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis. Adicionalmente, se genera oxígeno como producto de la oxidación del agua que se libera a la atmósfera.

A pesar de que el oxígeno es indispensable para la existencia de la vida aerobia, se sabe que bajo ciertas condiciones fisiológicas (o patológicas) pueden generarse diversas especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS) que pueden ser perjudiciales en altas concentraciones para los organismos, sin embargo, a bajas concentraciones, pueden tener un papel importante en la fisiología celular.

1. Homeostasis redox

1.1 Definición de homeostasis redox

Las células deben mantener un equilibrio en su estado reducido/oxidado (redox) para evitar el daño de sus componentes por una oxidación excesiva que la lleva al denominado estrés oxidativo. La conservación rigurosa de este

equilibrio es especialmente importante porque pequeños cambios en esta relación sirven como un mecanismo de señalización que regula múltiples procesos metabólicos. Al mantenimiento de este equilibrio reducido-oxidado al interior de las células, se le denomina **homeostasis redox**.

Drogüe (2002), expone que la homeostasis redox se logra, en principio, mediante un balance entre la tasa de producción de especies reactivas pro-oxidantes derivadas del oxígeno y nitrógeno; ERO y ERN respectivamente y la tasa de eliminación de éstos, por medio de los diversos mecanismos antioxidantes que posee el organismo. Una sobre exposición -ó sobreproducción- de dichos compuestos (por ejemplo, el peróxido de hidrógeno o el óxido nítrico) pueden desencadenar diversos eventos que tienen por finalidad inducir una respuesta protectora contra el posible daño ocasionado y tratar de recuperar el estado redox original de la célula. Dicha respuesta puede consistir en aumentar la eficiencia de sus mecanismos antioxidantes. Es importante señalar que el estado redox es particular al tipo celular y a su nivel de desarrollo dentro del ciclo celular así como la función que ésta lleve a cabo (Valko, *et.al.* 2007).

En el caso de procesos fisiológicos en donde se generan especies reactivas de manera espontánea (como en el caso de la respiración mitocondrial), el incremento inicial de ERO/ERN es relativamente pequeño, por lo que la respuesta antioxidante puede ser suficiente para compensar su incremento y recuperar el equilibrio original.

El término **señalización redox** se usa para describir un proceso regulatorio que se da a través de la modulación de las reacciones redox, ya sea por la formación de ERO/ERN o por el decremento de la actividad de los sistemas antioxidantes en forma muy controlada. El incremento regulado de especies reactivas genera un desequilibrio temporal el cual representa las bases fisiológicas de la regulación redox. Un ejemplo de ello se da en el proceso de la transducción de señales dependiente de ERO en el cual hay un cambio temporal hacia condiciones más oxidantes (Malpica, *et.al.* 2004 ; Rhee, *et.al.* 2005 ; Halvey, *et.al.* 2005 ; Lee, *et.al.* 2007). En la célula, el proceso de señalización redox permite inducir respuestas en contra del estrés oxidativo y restaurar el equilibrio redox original (Valko, *et.al.* 2007).

Bajo ciertas condiciones (como en el caso de procesos de diferenciación celular o envejecimiento) el aumento de ERO / ERN se da de una manera continua y la respuesta antioxidante puede no ser suficiente para regresar el sistema a su nivel redox original sin embargo, aún es posible que el organismo alcance un equilibrio semi-estable sin comprometer su supervivencia. Cuando la célula se encuentra bajo ciertas condiciones patológicas se puede dar la producción elevada de ERO / ERN generando efectos indeseables al organismo ocasionados por los efectos dañinos de éstos (Diplock, 1998) y un cambio en la expresión genética y de señalización redox-dependiente. En este estado de **estrés oxidativo** la célula es incapaz de regresar al equilibrio redox original con la consecuente acumulación de daño oxidativo en los constituyentes celulares (Ježek, 2005).

A continuación se describen, por un lado, las principales ERO y ERN y los mecanismos de generación de éstas y por el otro, los diversos mecanismos antioxidantes con los que cuenta la célula que incluyen enzimas, pequeñas moléculas y quelantes de metales en transición.

1.2 Definición de especie reactiva de oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) es un birradical, ya que tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro en paralelo (Figura 1). Esto impide que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en la que interviene dado que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo. Por esta razón, el oxígeno sólo puede intervenir en reacciones univalentes (Huberman, 1995), sin embargo, el oxígeno es inerte a temperatura fisiológica por lo que su reducción necesita, en la mayoría de los casos, la presencia de un catalizador (Brown, *et.al.* 1998).

Las moléculas producto de la reducción incompleta del oxígeno se denominan **especies reactivas de oxígeno (ERO)** y varían en función de su origen y/o reactividad (Norberg y Arner, 2001).

Es frecuente el uso del término “radical libre” (molécula que contiene, al menos, un electrón desapareado) como sinónimo de ERO en función de que ambos pueden interactuar con biomoléculas comenzando una reacción en cadena que propicia la formación de radicales libres. En el caso de las ERO pueden clasificarse en dos tipos: a) radicales o b) no radicales (moléculas

reactivas derivadas del oxígeno con capacidades oxidantes) (Diplock, *et.al.* 1998).

Algunos de las ERO más importantes por su papel fisiológico son los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e hidroxilo (HO^{\bullet}); así como la especie reactiva peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno en singulete (1O_2).

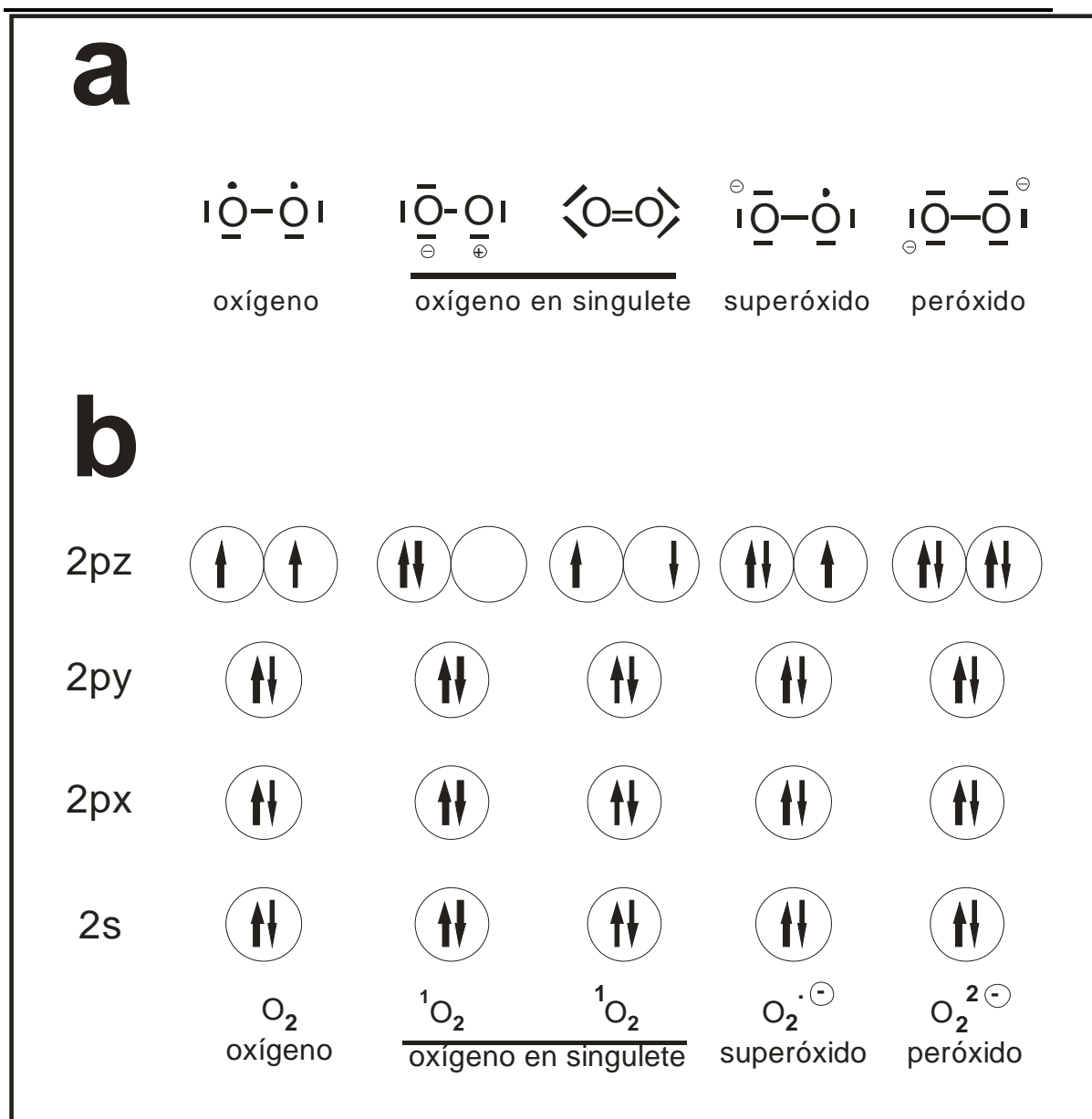


Figura 1. Esquema de algunas especies reactivas de oxígeno. Se muestra la representación de Lewis **(a)** y la configuración electrónica parcial de algunas especies reactivas de oxígeno **(b)**.

- El *radical superóxido* ($O_2^{\bullet\ominus}$). Este radical puede ser generado principalmente por dos procesos celulares (Cuadro 1, reacción 1 y 2): i) durante la respiración por la reducción monovalente espontánea del oxígeno a nivel de complejo I y III (Wolin, *et.al.* 2005) y ii) durante el estallido respiratorio a través de las NADPH oxidasas (NOX; E.C. 1.6.3.1) (Winterbourn y Hampton, 2008 ; ver más adelante). El radical superóxido es precursor de varias ERO siendo, al contrario de lo que se creía antes, una especie poco reactiva (Hansberg, 2008). Además, debido a que es una especie con una carga muy fuerte, no le es posible difundir libremente a través de la membrana (Valko, *et.al.* 2007) por lo cual se acumula principalmente al interior del compartimiento celular de origen (matriz mitocondrial o el interior del fagosoma) o es liberado al citosol mediante canales iónicos dependientes de voltaje (Wolin, *et.al.* 2005).

- El *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2). El radical superóxido puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1) como se muestra en la reacción 3 (cuadro 1). Puede ser generado deliberadamente por la célula por ejemplo, como producto secundario de la generación de superóxido por parte de las NADPH oxidasas o como un producto secundario de la respiración mitocondrial y otros procesos metabólicos (Winterbourn y Hampton 2008). El peróxido de hidrógeno puede atravesar membranas y potencialmente difundir a una distancia 2000 veces mayor a la de su fuente de origen (Winterbourn, 2008).

- El *radical hidroxilo* (HO^{\bullet}). Este radical es probablemente la ERO más reactiva en los sistemas biológicos. Se forma a partir del peróxido de hidrógeno y iones metálicos (libres o unidos a biomoléculas) mediante la reacción de Fenton en la cual se genera un electrón (producto de la oxidación del Fe^{2+} , Cu^+) que reduce al peróxido de hidrógeno, generando a su vez al radical y al ión hidroxilo (reacción 6). En la reacción de Haber – Weiss, los iones oxidados en la reacción de Fenton son reciclados al ser nuevamente reducidos por la oxidación acoplada del radical superóxido (reacción 7). Debido a su alta reactividad y a su poca capacidad de atravesar membranas, este radical puede reaccionar con componentes membranales generando daño por lipoperoxidación (Baynes y Dominiczak, 2006; ver más adelante) (reacción 8).

- *El ácido hipocloroso (HOCl)*. Dentro del proceso de estallido respiratorio, se genera peróxido de hidrogeno y debido a la acción enzimática de la mieloperoxidasa, una enzima asociada a gránulos de neutrófilos capaz de oxidar haluros, como el cloro (Cl^{\ominus}), es posible convertir al peróxido de hidrógeno en un radical hidroxilo y en ácido hipocloroso (HOCl) (reacción 5). Éste último, al interactuar con aminoácidos en el organismo patógeno, puede generar cloraminas. Adicionalmente, la reacción del peróxido de hidrógeno y del ácido hipocloroso puede llevar a la formación del oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$) (Hitchon y El-Gabalawy, 2004).

- *El oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$)*. El oxígeno en singulete se origina cuando uno de los dos electrones libres del O_2 cambia de giro al captar energía por lo que ahora, al tener giro opuesto, los electrones libres se aparean inmediatamente (Hansberg, 2008). En condiciones fisiológicas, su generación se da en respuesta a la exposición a la luz de algunos pigmentos biológicos como en el caso de la clorofila (Mandigan, *et.al.* 2004), el retinol, diversas flavinas y porfirinas; así como en tejidos y órganos expuestos a radiaciones ionizantes terapéuticas (Huberman, 1995).

1.3 Definición de especie reactiva de nitrógeno

Adicionalmente, en la célula puede darse la formación de moléculas derivadas de la reducción incompleta del nitrógeno, denominadas genéricamente **especies reactivas de nitrógeno (ERN)** (Valko, *et.al.* 2007) las cuales varían en su origen y su reactividad. Un ejemplo de ellas pueden ser el óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$) y el peroxinitrito (ONOO^{\ominus}), entre otros.

- *El óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$)*. El óxido nítrico es un radical que puede difundir a través de las membranas biológicas (Kakkar y Singh, 2007) y que se genera como producto secundario de la oxidación de L-arginina a L-citrulina (reacción 9, cuadro 1) por medio de una familia de isoenzimas: las óxido nítrico sintetasas (NOS; E.C. 1.14.13.39) (Nordberg y Arner 2001). Este compuesto puede ser generado por células mediadoras de la inflamación, por lo que puede ser considerado como un mecanismo de defensa del hospedero (Winterbourn y Hampton, 2008). En bajas concentraciones, puede participar en procesos de

Cuadro 1. Mecanismos de generación de especies reactivas

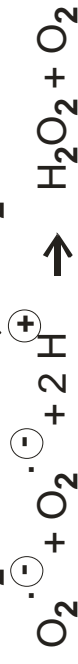
1) Formación de superóxido



2) NADPH oxidasa



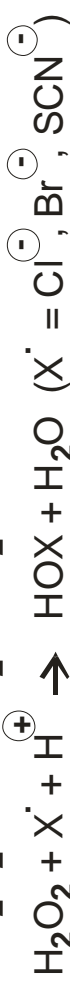
3) Superóxido dismutasa



4) Catalasa



5) Mieloperoxidasa



6) Reacción de Fentón



7) Reacción de Haber-Weiss



8) Lipoperoxidación



9) Óxido nítrico sintasa



10) Generación de peroxinitrito



señalización celular (Winterbourn, 2008) mientras que en altas concentraciones, puede resultar citotóxico para la célula que lo genera (Diplock, *et.al.* 1998). Adicionalmente, se sabe que esta molécula puede participar en diversos procesos fisiológicos como la neurotransmisión, la regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune (Valko, *et.al.* 2007).

-El *peroxinitrito* (ONOO^\ominus). Las células del sistema inmune producen de forma simultánea los radicales superóxido y óxido nítrico durante el estallido respiratorio ocasionada por procesos inflamatorios (Valko, *et.al.* 2007). Esto se debe a que ambos compuestos pueden reaccionar para generar peroxinitrito (cuadro 1, reacción 10), un compuesto altamente citotóxico y microbicida debido a su capacidad de reaccionar directamente con diversas biomoléculas (Nordberg y Arner, 2001) generando con ello otros radicales, entre ellos el radical hidroxilo el cual es producido en mayores cantidades que la que se genera por la reacción de Fenton (Kakkar y Singh, 2007).

- *Otras*. A su vez, el peroxinitrito puede generar otras especies reactivas al reaccionar directamente con otros compuestos: a) al reaccionar con CO_2 forma *peroxycarboxilato nitroso* (ONOOCO_2^\ominus); b) puede protonarse para formar *ácido peroxinitroso* (ONOOH) y posteriormente romperse originando al radical hidroxilo y *dióxido de nitrógeno* (NO_2^\bullet); y c) puede reorganizarse y dar *nitrato* (NO_3) (Nordberg y Arner, 2001).

1.4 Procesos fisiológicos generadores de especies reactivas

La generación de distintas especies reactivas puede llevarse a cabo mediante diversos procesos fisiológicos:

- *Respiración*. Se sabe que aproximadamente el 1-3% del oxígeno molecular consumido durante la respiración se reduce a superóxido (Ott, *et.al.* 2007). Esta reducción puede llevarse espontáneamente a distintos niveles de la cadena de transporte de electrones: 1) a nivel del Complejo I (NADH deshidrogenasa), en la región proximal al sitio de inhibición por rotenona y 2) la región del ciclo Q, en la parte distal al sitio de inhibición por mixotiazol o en la parte proximal al sitio de inhibición de la antimicina A (Wolin, *et.al.* 2008).

- *Estallido respiratorio.* Algunas células del sistema inmune como los macrófagos y los neutrófilos generan ERO como parte del mecanismo de defensa contra patógenos intra- e intercelulares (Hitchon y El-Gabalawy, 2004). Esta acción es mediada por una familia de enzimas: las **NADPH oxidasas (NOX)**. Las NOX son un grupo de hemoproteínas transmembranales las cuales tienen por función transportar electrones de un donador citoplasmático a un aceptor, ya sea extracelular o intrafagosomal (Winterbourn, 2008) siendo, en la mayoría de los casos, el NADPH el donador y el O₂ el aceptor (Bedard, *et.al.* 2007). En estos casos, ocurre un aumento en el consumo neto de O₂ denominado estallido respiratorio (Abbas, *et.al.* 2002), el cual va dirigido principalmente a la producción de ERO. Como producto de la acción de la NOX tenemos la formación de O₂[•] el cual será dismutado por SOD generando así H₂O₂. Ambas ERO pueden ser precursoras de otras especies reactivas como el ácido hipocloroso (Hitchon y El-Gabalawy, 2004).

- *Mecanismos de transducción de señales redox-dependientes.* Se sabe que distintas ERO y ERN pueden jugar un papel en varios procesos de señalización celular tan diversos como la diferenciación y proliferación celular, angiogénesis, envejecimiento y apoptosis (Halvey, *et.al.* 2005). Esto se debe principalmente a que el citosol de las células es un medio principalmente reductor y un gran número de proteínas sensibles a variaciones redox son reguladas por la formación reversible de enlaces disulfuro a partir de sus tioles vecinales (de SH₂ a S-S) (Malpica, *et.al.* 2004), afectando con esto su conformación o actividad enzimática (Nordberg y Arner, 2001).

- *Generación de ERO en otros procesos fisiológicos y/o patológicos.* Existen, adicionalmente a los ya descritos, diversos procesos fisiológicos que llevan a la formación de ERO, por ejemplo: i) La generación de superóxido por la acción de diversas enzimas como la xantina oxidasa, la lipoxigenasa y ciclooxigenasa. (Nordberg y Arner, 2001); ii) Durante el proceso de lipoperoxidación, en el cual un radical, generalmente un HO[•], sustrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado iniciando una cadena de reacciones de peroxidación lipídica, comprometiendo con ello la estabilidad de las membranas celulares al generar nuevos radicales de origen orgánico; iii) La generación de ERO en función de la exposición a diversas presiones parciales de oxígeno como en el epitelio y endotelio de alvéolos y bronquiolos en el

pulmón debido a su gran exposición a altas concentraciones de oxígeno y a diferentes xenobióticos como pueden ser compuestos minerales, óxidos de nitrógeno, ozono, humo de tabaco, etc. (Rahman, *et.al.* 2006); en respuesta a condiciones de hipoxia en tejido vascular (Wolin, *et.al.* 2005) o de isquemia y reperfusión (Hitchon y El-Gabalawy, 2004).

1.5 Mecanismos antioxidantes

Halliwell y Gutteridge han definido **antioxidante** como aquella sustancia capaz de competir con otros sustratos celulares para evitar la oxidación de estos últimos (Drogue, 2002). En las células existen varios mecanismos antioxidantes para reestablecer el estado redox original después de una exposición temporal a ERO. Dichos mecanismos pueden actuar a distintos niveles evitando la generación y/o acumulación de especies reactivas y, por consiguiente, el daño oxidativo a biomoléculas (figura 2).

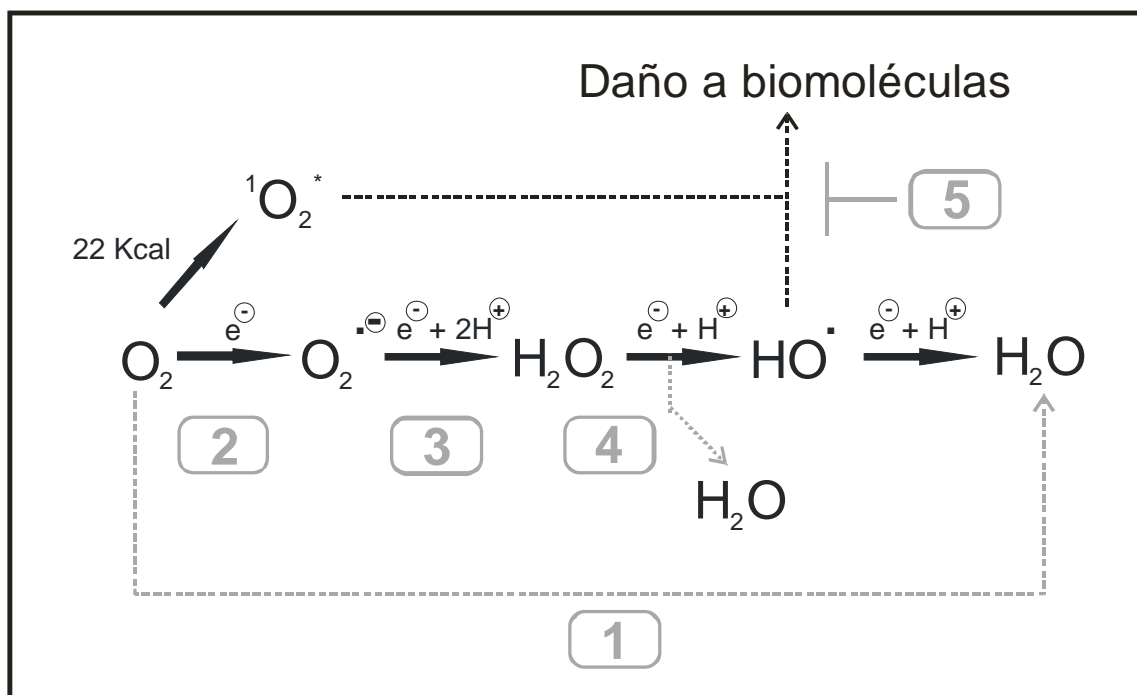


Figura 2. Niveles de los mecanismos antioxidantes. En negro se muestra la reducción tetravalente secuencial del oxígeno y la formación de ERO, en gris se indica el nivel de acción de los mecanismos antioxidantes.

- **Primer Nivel:** en condiciones fisiológicas, aproximadamente el 0.1-2% del oxígeno molecular consumido durante la respiración se reduce univalente a superóxido (Ott, *et.al.* 2007). Los mecanismos antioxidantes de este nivel lo constituyen diversas metaloenzimas especializadas en llevar a cabo la eliminación de este radical por la dismutación del superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Dichas enzimas se denominan **superóxido dismutasas (SOD)** (E.C. 1.15.1.1). Existen diversas isoformas de la SOD (Filippin, *et.al.* 2008; Huberman, 1985; Castellanos-González, *et.al.* 2002) :

a) *Cu/Zn SOD intracelular.* Esta isoforma se encuentra principalmente en el citoplasma de eucariontes superiores. Esta constituida por dos subunidades con un peso de 16 kDa cada una y contiene en su sitio activo un átomo de Cu^{2+} y un átomo de Zn^{2+} .

b) *Cu/Zn SOD extracelular (EC SOD).* A diferencia de la isoforma citoplásmica, esta enzima es una glicoproteína compuesta por cuatro subunidades con un peso molecular de 135 kDa. Comparte con su homólogo citoplásmico la presencia de un átomo de cobre y zinc en su sitio activo aunque se le encuentra en fluidos e intersticios extracelulares.

c) *Mn SOD.* Esta isoforma se encuentra en bacterias y en la mitocondria de las células eucariontes. Esta constituida por un homotetrámero de 22 kDa por cada subunidad y tiene un átomo de Mn^{3+} en su sitio activo.

La SOD es imprescindible en las células aeróbicas y su ausencia en anaerobios estrictos parece ser la causa por la que el oxígeno sea tan tóxico para estas células (Madigan, *et.al.* 2004) aunque, en algunos organismos anaerobios facultativos que son parásitos se ha reportado la presencia de una única isoforma de SOD que contiene un átomo de hierro en su sitio activo (*Fe SOD*) presentando alta homología con la Mn SOD (Brown, *et.al.* 1998). Cabe mencionar que algunas bacterias pueden presentar Mn SOD y Fe SOD (Nordberg y Arner, 2001).

- **Segundo Nivel:** Como ya se mencionó anteriormente, el peróxido de hidrógeno es un potente oxidante capaz de difundir potencialmente hasta 2000 veces mas allá de su sitio de origen (Winterbourn, 2008). Este nivel de defensa esta constituido por un grupo de enzimas especializadas en llevar a cabo la dismutación y eliminación del H_2O_2 generado en el nivel anterior, evitando con ello la posibilidad de formación del radical hidroxilo. Estas enzimas son la

catalasa (E.C. 1.11.1.6) y dos familias de enzimas con actividad de peroxidasa: las glutatión peroxidases (E.C. 1.11.1.9) y peroxirredoxinas.

- **Catalasa (CAT)**: esta hemo-enzima es una proteína homotetramérica de un peso total de 240 kDa que lleva a cabo principalmente la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 en agua y oxígeno aunque también puede contribuir en la detoxificación de otras moléculas como alcoholes y fenoles mediante el acoplamiento a la reducción del H_2O_2 . La **catalasa** es una enzima ubicua en muchas células aerobias, localizada principalmente en los peroxisomas. (Rahman, *et.al.* 2006 ; Nordberg y Arner, 2001). En algunos protozoarios como *Entamoeba histolytica* y en los tripanosomatídeos no se ha encontrado esta enzima por lo que se infiere que utilizan otras peroxidases (Brown, *et.al.* 1998).

- **Glutatión Peroxidasa (GPx)**. La **glutatión peroxidasa** comprende una familia de isoenzimas seleno-dependientes y no seleno-dependientes que llevan a cabo la reducción del H_2O_2 utilizando como sustrato a dos moléculas de glutatión (GSH) llevándolo a su forma oxidada (GSSG) (Rahman, *et.al.* 2006; Nordberg y Arner, 2004), que es reducido subsecuentemente por la glutatión reductasa (GR), restableciendo así el sustrato de las GPx. Dada la importancia de este ciclo se abordará con detalle en una sección aparte.

- **Peroxirredoxinas (Prx)** Las **peroxirredoxinas** son una familia de proteínas homodiméricas que catalizan la reducción del H_2O_2 y alquil hidroperóxidos a agua y alcohol, respectivamente. Contienen un residuo de cisteína conservado en la región amino terminal que es el sitio primario de oxidación del peróxido. Aunque las Prx son abundantes, su eficiencia catalítica es menor que CAT o las GPx de uno a tres órdenes de magnitud (Rhee, *et.al.* 2005). Este tipo de proteínas han sido detectadas en organismos representativos de los seres vivos, en distintos compartimientos celulares (Winterbourn, 2008).

A la fecha, han sido identificadas en mamíferos seis isoformas clasificadas en tres subgrupos: *i*) 2-Cys: incluye a las Prx I, II y IV (de localización citosólica) además de la Prx III, la cual es considerada como la principal responsable de la eliminación de peróxido de H_2O_2 de la mitocondria, (Ott, *et.al.* 2007). Estas Prx contienen un residuo conservado adicional de cisteína en su extremo carboxilo terminal, muestran un alto nivel de homología y requieren de tioredoxina como su donador de electrones (Das, 2004) *ii*) 2- Cys

atípicas: en este grupo está incluido la Prx V la cual se localiza en retículo endoplasmático y en el espacio extracelular; presenta una reactividad mayor con el peroxinitrito que con peróxidos (Winterbourn, 2008). *iii*) 1-Cys: en este grupo se ubica la Prx VI. En el caso de las Prx V y VI pueden usar otros donadores de electrones diferentes a la tiorredoxina, como el glutatión (Das, 2004).

- **Tercer Nivel:** En este nivel, el radical hidroxilo producto de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (así como otros radicales orgánicos) pueden ser neutralizados mediante diversos compuestos como la vitamina C y la vitamina E, -entre otros-, las cuales funcionan como agentes reductores al donar un átomo de hidrógeno a los radicales intermedios formados por acción de ERO. A este nivel pueden actuar adicionalmente a compuestos vitamínicos, otros no vitamínicos.

Compuestos vitamínicos:

- *Vitamina C (Ácido ascórbico)*. El **ácido ascórbico (AA)** es considerado uno de los antioxidantes naturales más poderosos y menos tóxicos (Diplock, *et.al.* 1998), pudiéndosele considerar como el principal antioxidante no-enzimático de fase acuosa (Baynes y Dominiczak, 2006). Es posible encontrarla en altas concentraciones en tejidos animales (Diplock, *et.al.* 1998) y vegetales (Blokhina, *et.al.* 2003).

El AA puede directamente neutralizar al superóxido, radicales hidroxilo, radicales lipídicos peroxilo y al oxígeno en singulete; así como algunas especies reactivas de nitrógeno, reduciéndolos (Diplock, *et.al.* 1998; Blokhina, *et.al.* 2004, Winterbourn, 2008). Simultáneamente, el AA se oxida a dehidroxi-ascorbato, DHA (pasando antes por un intermediario radical dehidro-ascorbilo (As^{\bullet})), el cual puede ser reducido nuevamente a ascorbato mediante la dehidroascorbato reductasa (DHAR; Baynes, y Dominiczak, 2006) usando como reductante al glutatión (GSH) o mediante la tiorredoxina reductasa (TR) que usa como donador de electrones a la tiorredoxina (Nordberg y Arner, 2001).

Adicionalmente, se sabe que el AA juega un papel importante en la reducción y reciclado de la vitamina E (Diplock, *et.al.* 1998; Blokhina, *et.al.* 2003; Baynes y Dominiczak, 2006; Nordberg y Arner, 2001).

- *Vitamina E (Tocoferoles)*. El término “Vitamina E” es un nombre genérico para todos los derivados de tocoles y tocotrienoles los cuales exhiben actividad de **α -Tocoferol** (Diplock, *et.al.* 1998). Esta familia de isómeros presentan importante actividad antioxidante lipofílica y estabilizante de membranas (Baynes y Dominiczak, 2006).

Los α -Tocoferoles son considerado como los antioxidantes no-enzimáticos de fase lipídica más importantes, conocidos adicionalmente por ser antioxidantes de rompimiento de cadena, puesto que son capaces directamente de neutralizar radicales peroxil de origen lipídico (producto de la lipoperoxidación), previniendo así la propagación en cadena del daño oxidativo (Blokhina, *et.al.* 2003). Como productos de dicho proceso se obtienen hidroperóxidos lipídicos y el radical tocoferoxilo. Este último es mucho más estable y puede ser reducido por AA y GSH o ser completamente oxidado a tocoferil-quinona (Diplock, *et.al.* 1998; Baynes y Dominiczak, 2006).

- *Vitamina A y otros carotenoides*. “Vitamina A” es un término genérico para designar tres compuestos de fase lipídica: **retinol, retinal y ácido retinóico**. Su precursor, el β -caroteno, forma parte del grupo de los **carotenoides**. Estos últimos, son pigmentos naturales con pronunciada actividad antioxidante. Sus propiedades químicas están relacionadas con la presencia de un extenso sistema de dobles enlaces conjugados los cuales juegan un papel importante en su función antioxidante ya que pueden desactivar al oxígeno en singulete y neutralizar radicales peroxilo. (Diplock, *et.al.* 1998)

Compuestos no vitamínicos

- *Glutación*. El **glutación** presenta una amplia distribución en los seres vivos. En la célula, es el tiol de bajo peso molecular intracelular más abundante (aproximadamente de 0.2 a 10 mM) por lo que juega un papel importante en el control del estado redox necesario para la señalización redox (Nkabyo, *et.al.* 2002). Dada su importancia, se describirá este compuesto en el siguiente apartado.

- *Compuestos fenólicos*. Los **compuestos fenólicos** son metabolitos secundarios diversos (flavonoides, taninos, ésteres de hidroxicinamato y lignina), los cuales son abundantes en tejidos vegetales. Los polifenoles poseen una estructura química que los hace ideales para llevar a cabo funciones de

neutralización de radicales en función de: i) su alta reactividad como donadores de electrones o átomos de hidrógeno; ii) la capacidad de los radicales derivados de polifenoles para estabilizar y deslocalizar electrones desapareados (actividad de rompimiento de cadena) y iii) su capacidad para quelar iones de metales de transición (necesarios para la reacción de Fenton; Blokhina, *et.al.* 2001 y Diplock, *et.al.* 1998).

- **Ácido lipóico (AL).** El **ácido lipóico** es un grupo prostético esencial en el componente dihidrolipoil transacetilasa (E₂) de deshidrogenasas mitocondriales. La está covalentemente unido a una cadena lateral específica de una lisina para formar un motivo similar a lipoamida. El componente E₃, también llamada dihidrolipoil (lipoamida) deshidrogenada (LipDH), es finalmente la responsable de la regeneración de la lipoamida vía NAD⁺ y FAD. Por lo tanto, las funciones in vivo de la LipDH en la mitocondria es oxidar la dihidrolipoamida.

El AL en su forma reducida (ácido dihidroxilipóico, ADHL) tiene una gran capacidad reductora. El uso terapéutico del AL (y del ADHL) ha sido explorado y se ha observado que el AL / ADHL administrado como fármaco tiene muchas propiedades antioxidantes como la quelación de metales, neutralización de radicales libres y regeneración de otros antioxidantes como GSH, AA y vitamina E. (Nordberg y Arner, 2001).

- **Ubiquinona (Coenzima Q/ Q₁₀).** La **ubiquinona** está presente en bajas concentraciones en plasma y en las membranas celulares pudiendo llevar a cabo una función antioxidante, previniendo la lipoperoxidación. La regeneración de la ubiquinona se da por la acción de la lipoamida deshidrogenada pudiéndose llevar a cabo además por otros miembros de esta familia de enzimas, como la tioredoxina reductasa (TrxR; Nordberg y Arner, 2001).

- **Cuarto Nivel:** Las ERO pueden llegar a causar modificaciones a distintas estructuras celulares. En el caso de las proteínas, dichas modificaciones de origen oxidativo ocurren a nivel de los residuos de cisteína, lo que puede conducir a cambios y/o la pérdida de su función al ocasionar una fragmentación química en la proteína oxidada o un aumento en su susceptibilidad para ser degradadas vía proteosoma (Valko, *et.al.* 2007). En este nivel se lleva a cabo la reparación del daño oxidativo en proteínas por alguno de los siguientes mecanismos: a) la regeneración de las proteínas a su estado reducido (Guezzi, 2005); b) la interacción de las proteínas

desnaturalizadas con moléculas con actividad similar a chaperonas (como la tiorredoxina y la glutarredoxina) para reestablecer la configuración nativa de la proteína dañada (Kern, *et.al.* 2003; Trotter y Grant, 2003) o c) la degradación de proteínas oxidadas ya que las modificaciones oxidativas en las proteínas incrementan su susceptibilidad a ataque proteolítico y su posterior recambio al estimular su síntesis *de novo* (Ott, *et.al.* 2007; Valko, *et.al.* 2007).

2. Sistemas dependientes del glutatión y la tiorredoxina

Siendo los sistemas redox dependientes del glutatión y la tiorredoxina los dos sistemas más importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula (Garrido y Grant, 2002; Trotter y Grant, 2003; Valko, *et.al.* 2007) y en la activación de transductores y moléculas efectoras (Das y White, 2002) que participan en la señalización redox, procederemos a exponer brevemente cada uno de sus componentes:

2.1 Sistema dependiente del Glutatión (GSH)

El sistema dependiente del glutatión comprende a las enzimas glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx) además del tripéptido glutatión (GSH) y la proteína glutarredoxina (Grx).

a) *Glutatión*. El **glutatión** (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina (Figura 3a), con una masa molecular de aproximadamente 307 Da (Watson, *et.al.* 2004). Contiene un enlace peptídico poco común γ entre el glutamato y la cisteína lo que previene que sea hidrolizado por la mayoría de las peptidasas (Anderson, 1998). El glutatión no es fácilmente oxidado a diferencia de sus precursores, la cisteína y la γ -glutamilcisteína.

El glutatión ha sido encontrado en diversos compartimientos celulares como en: citosol, retículo endoplásmico, vacuolas y mitocondrias entre otros (Blokhina, *et.al.* 2002). Tiene varias funciones celulares importantes como el transporte de aminoácidos, el mantenimiento del estado redox de proteínas y de compuestos de bajo peso molecular, el mantenimiento del AA en su forma reducida y la formación de deoxirribonucleótidos.

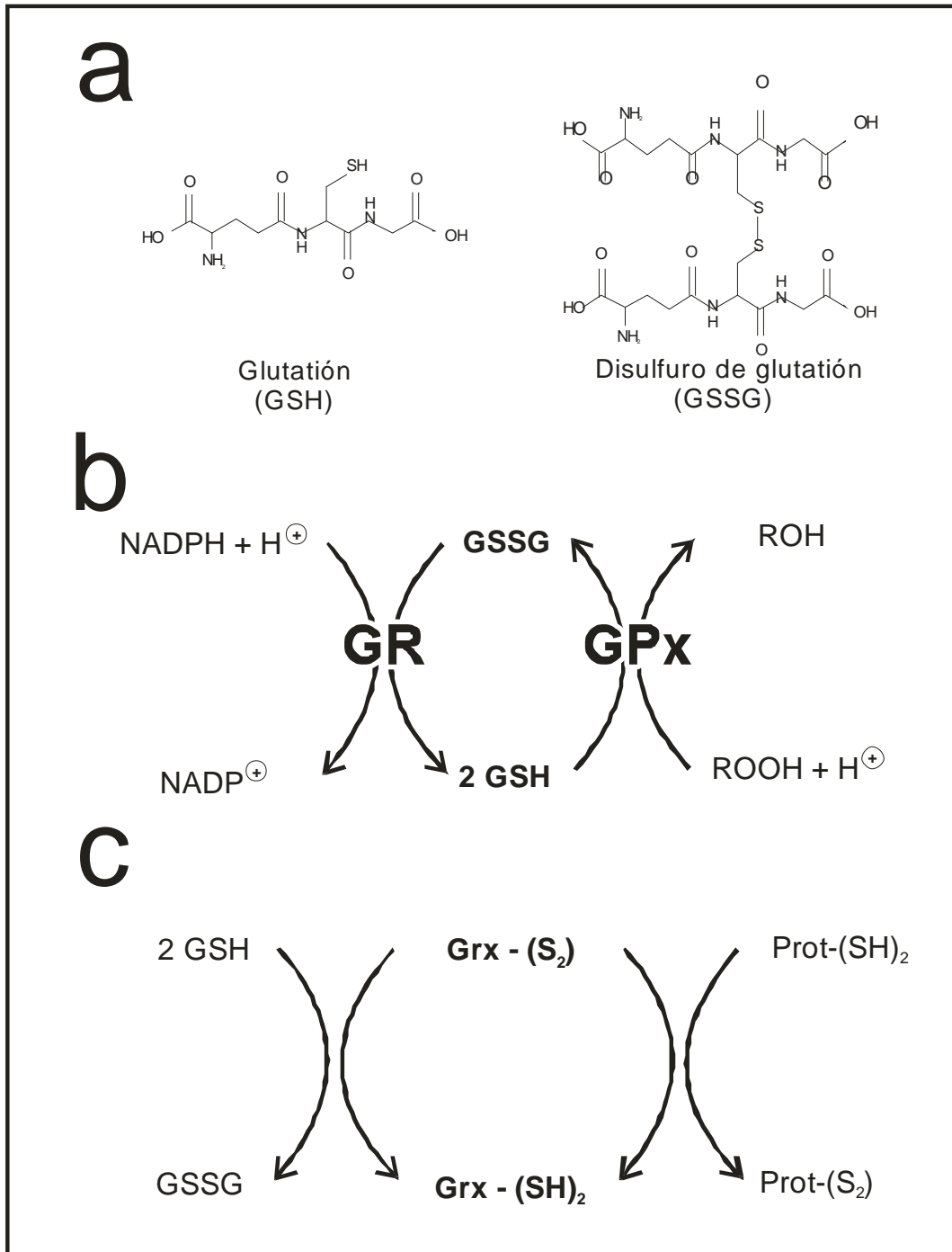


Figura 3. Sistema dependiente de glutati3n. Estructura qu3mica del glutati3n en su forma reducida (GSH) y en su forma oxidada (GSSG) **(a)**. Mecanismo general de acci3n de las distintas enzimas de este sistema **(b)** y de la transferencia de electrones del glutati3n a la glutaredoxina **(c)**. Abreviaturas: GR, glutati3n reductasa; GPx, glutati3n peroxidasa; Grx, glutaredoxina; Prot, prote3na.

Adicionalmente, se sabe que el GSH puede reaccionar enzim3ticamente (a trav3s de la familia de las glutati3n-S-transferasas, GST) o de manera no enzim3tica con compuestos xenobi3ticos para formar compuestos conjugados

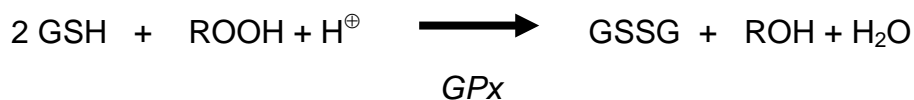
solubles de glutatión, ayudando con esto a los procesos de detoxificación intracelulares (Rendón y Juárez, 2008). Protege contra el daño oxidativo causado por ERO formados por diversos procesos (Mustacich y Powis, 2000) o participando en el reestablecimiento del correcto plegamiento de proteínas afectadas durante el estrés oxidativo a través de las glutarredoxinas (Berndt, 2008). Existe creciente evidencia experimental que sugiere un rol adicional regulatorio del glutatión a través de su unión covalente a proteínas (glutacionilación; Rendón, *et.al.* 2004).

El glutatión puede existir en dos formas: su forma tiol (GSH) y su forma disulfuro (GSSG) (Figura 3a). En condiciones normales, la relación entre las concentraciones de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en citosol es aproximadamente de 100: 1 en mamíferos (Rendón y Juárez, 2008). En cambio, en el cisticerco de *Taenia crassiceps* esta relación es de 5: 1 (Guevara-Flores, 2004).

La relación GSH/GSSG en la célula es un indicador importante del ambiente redox y el principal determinante del potencial redox celular (Berndt, *et.al.* 2007). Dicho potencial esta en función del estadio celular y cambia ligeramente durante la progresión celular hacia la proliferación, la diferenciación celular y apoptosis. En dichos procesos celulares existe una progresión natural hacia un estado más oxidado por lo que cambia la relación GSH / GSSG (Nkabyo, *et.al.* 2002).

Se sabe que existen varios organismos que no sintetizan glutatión (muchos procariontes y algunos eucariontes) por lo que ocupan diversos compuestos para sustituirlo por ejemplo cisteína libre (Brown, *et.al.* 1998), el tripanotión (Müller, *et.al.* 2003; Krauth-Siegel e Inhoff, 2003) o el micotiol (Newton y Fahey, 2002).

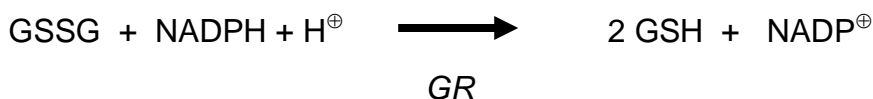
b) Glutatión Peroxidasa (GPx). La **glutatión peroxidasa** (E.C. 1.11.1.9 GSH : H₂O₂ oxidorreductasa) fue la primera selenoproteína específica de mamífero que fue identificada y se le conoce actualmente como GPx-1 (Papp, *et.al.* 2007). Como se mencionó anteriormente, esta familia esta constituida por enzimas que llevan a cabo la reducción de distintos tipos de peróxidos a sus respectivos alcoholes utilizando como sustrato a dos moléculas de glutatión (GSH) que se oxidan dando lugar a su forma disulfuro (GSSG) (Rahman, *et.al.* 2006 ; Nordberg y Arner, 2001), como se indica en la siguiente reacción:



A la fecha, esta familia esta constituida por siete isoenzimas en humanos, de las cuales, solo las GPx-5 y GPx-7 no son selenoenzimas, por lo que éstas últimas no son inhibidas por compuestos derivados del oro (I). (Gromer, *et.al.* 2005).

En general, estas enzimas son homotetrámeros con un peso molecular de alrededor de 70-100 kDa (aunque algunas como la GPx-4 es monomérica). Pueden ser de localización intracelular (citosol, mitocondria y núcleo), asociadas a membranas, o de localización extracelular (plasma e intestino). Su abundancia en algunos órganos como el hígado depende de la disposición de selenio (GPx-2). En este órgano es la principal defensa para reducir hidroperóxidos orgánicos.

c) *Glutación Reductasa (GR)*. La **glutación reductasa** (E.C. 1.6.4.2. NAD[P]H : GSSG oxidoreductasa), es un miembro representativo de la familia de las flavoproteínas disulfuro reductasas. Estas enzimas son dependientes de la presencia de un grupo prostético FAD, el cual actúa como un intermediario de la transferencia de electrones del NADPH al glutación oxidado (GSSG):



La GR se encuentra formando un homodímero con un peso molecular de 50 kDa por subunidad. Desde su descubrimiento en 1935 en extractos eritrocitos, la GR ha sido purificada de representantes de la mayoría de los grupos de los seres vivos, sin embargo, no es una proteína universal. La ausencia de esta enzima ha sido reportada en varios organismos, que en su caso, utilizan diversos mecanismos para suplir su carencia por ejemplo: i) en el caso de *Drosophila melanogaster* se ha encontrado GSH no así la GR por lo que se propone que la reducción del primero es dependiente directamente de la tiorredoxina (Missirlis, *et.al.* 2002), ii) en el caso de los organismos que utilizan otros compuestos tioles diferentes al glutación es posible encontrar una enzima

disulfuro reductasa especializada en la reducción del tiol utilizado, por ejemplo, la micotiol reductasa (MSH-R) en el caso de *Mycobacterium* y *Streptomyces* (Newton y Fahey, 2002) y la tripanotión reductasa (TrpR) en el caso de los tripanosomatídeos (Müller, *et.al.* 2003) (ver apartado anterior).

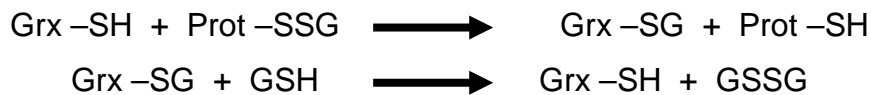
d) *Glutarredoxina (Grx)*. Las **glutarredoxinas** son proteínas pequeñas, usualmente alrededor de 9-15 kDa, las cuales existen en varias isoformas en los organismos que sintetizan glutatión.

Basados en el número de cisteínas en su sitio activo, las glutarredoxinas pueden dividirse en dos categorías principales: i) con motivo ditiol (Cys-Pro-Tyr-Cys) y ii) con motivo motiol (Cys-Gly-Phe-Ser) diferenciándose además por su mecanismo de acción:

Mecanismo ditiol:



Mecanismo monotiol:



En *E. coli* hay tres isoformas de Grx ditiol mientras que en levaduras y mamíferos solo se han observado dos isoformas: una citosólica y una mitocondrial. Un caso especial son las plantas pues se ha encontrado que el genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para 14 glutarredoxinas ditiol.

Las principales funciones de las glutarredoxinas son: 1) reducir directamente al GSSG (o a ciertas proteínas) a través de electrones provenientes del NADPH (mecanismo ditiol); 2) reducir proteínas generando disulfuros mixtos con GSH (glutacionilación) utilizando un mecanismo que requiere solo uno de los residuos del sitio activo de la glutarredoxina (mecanismo monotiol; Figura 3b) Además, debido a su capacidad de donar electrones, puede participar como un regulador de la respuesta ante estrés oxidativo (Berndt, *et.al.* 2008).

2.2 Sistema dependiente de la Tiorredoxina (Trx)

El sistema de tiorredoxina comprende a las enzimas tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina peroxidasa o peroxirredoxina (Prx), además de la proteína tiorredoxina (Figura 4a).

a) *Tiorredoxina (Trx)*. La **tiorredoxina** es una proteína pequeña de aproximadamente 12 kDa con un sitio catalítico con un motivo conservado WCGPC. Puede existir en su forma oxidada (Trx – [S₂]) o reducida (Trx – [SH]₂). Participa en reacciones redox a través de la oxidación reversible de tioles en su sitio activo (Madelon, *et.al.* 1999). Esta ampliamente distribuida a través de la escala filogenética pues es posible encontrarla en distintos grupos: desde bacterias hasta vertebrados (Hill, *et.al.* 1997 ; Brown, *et.al.* 1998 ; Zhong y Holmgren, 2000 ; Krnajski, *et.al.* 2001 ; Garrido y Grant 2002 y Gelhaye, *et.al.* 2005).

En plantas hay al menos 20 genes que codifican para 6 isoformas (Gelhaye, *et.al.* 2005), mientras que en *E. coli*, en levaduras y en células de mamífero solo se ha encontrado de uno a dos genes (Garrido, 2002, Berndt, 2008).

La principal función de la tiorredoxina en su forma reducida es la de proveer equivalentes reductores a una amplia variedad de rutas metabólicas y procesos intracelulares como en la síntesis de deoxirribonucleótidos (Wang, *et.al.* 1998), en la detoxificación de peróxido vía las tiorredoxina peroxidasas (Mustacich y Powis, 2000) y la de mantener a las proteínas intracelulares en su estado reducido (Arnér y Holmgren, 2000). Adicionalmente, se ha podido comprobar que la Trx y la Grx pueden tener actividad de chaperonas en condiciones de estrés oxidativo y choque térmico (Kern, *et.al.* 2003).

En diferentes estirpes celulares de mamífero, la Trx-1 (citoplásmica) se expresa de manera constitutiva aunque se ha demostrado que el incremento en su nivel de expresión génica, puede ser inducido por diversos padecimientos como infección viral, irradiación con UV, estrés oxidativo, etc. (Madelon, *et.al.*

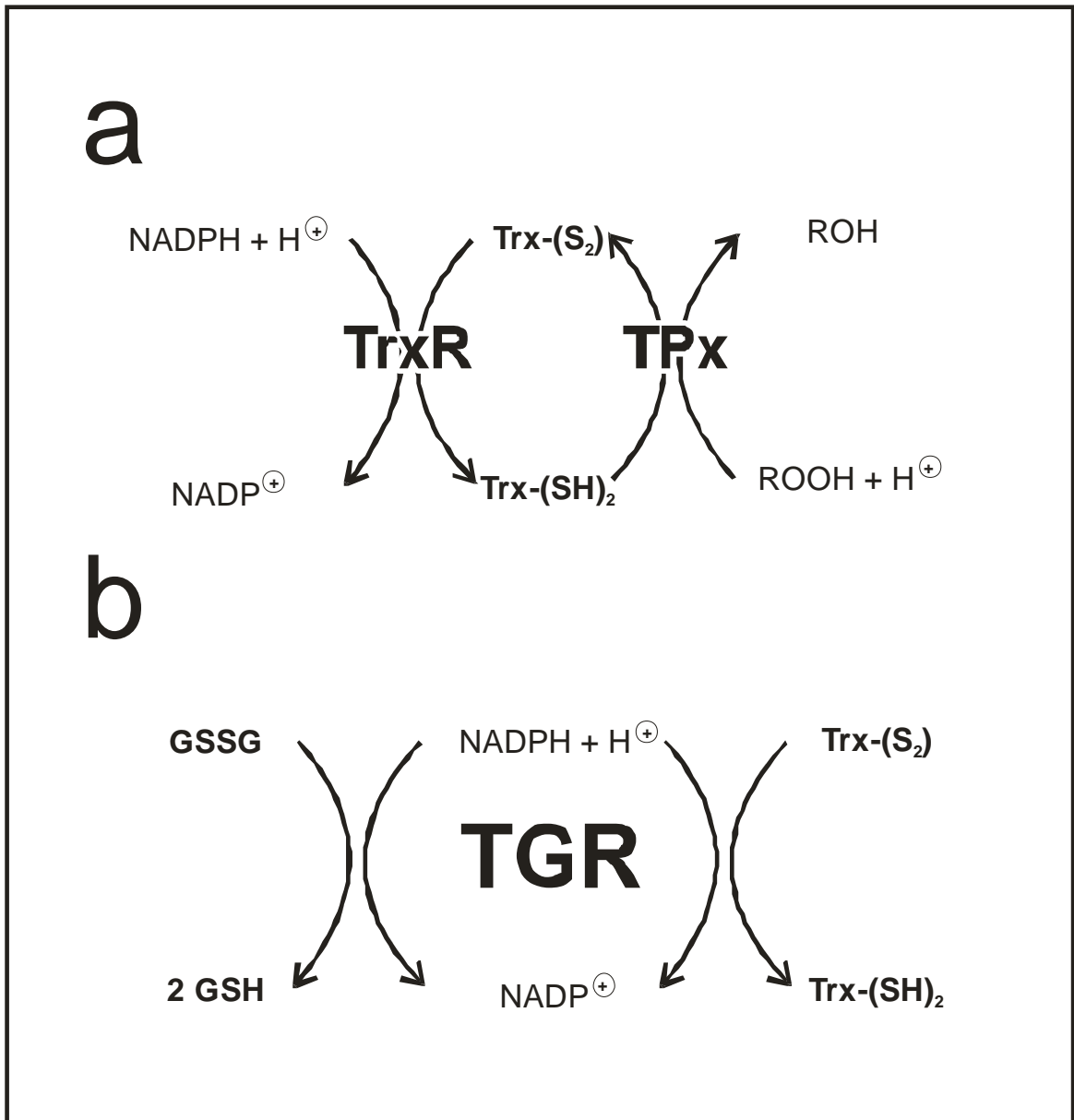


Figura 4. Sistema dependiente de la tiorredoxina. Mecanismo general de acción de las enzimas participantes en este sistema **(a)**. Actividad reductasa de la TGR **(b)**. Abreviaturas: TrxR: tiorredoxina reductasa; TPx: tiorredoxina peroxidasa; Trx: tiorredoxina; TGR: tiorredoxina glutatión reductasa.

1999) Adicionalmente, se sabe que la activación de ciertos tipos celulares puede conducir a la secreción de la Trx-1 al espacio extracelular (donde puede tener actividad similar a citosina o participar en la reducción de proteínas blanco (Windle, *et.al.* 2000) o su translocación al núcleo en donde puede facilitar las interacciones proteínas- ácidos nucleicos, prevenir daño oxidativo y proveer de equivalentes reductores (Watson; *et.al.* 2004).

b) Tiorredoxina Peroxidasa (TrxP). Las peroxirredoxinas dependientes de tiorredoxina de tipo 2-Cys, también llamadas **tiorredoxina peroxidasa** (E.C. 1.11.1.15 ; reductante que contiene tioles : hidroperóxido oxidorreductasa) forman un gran grupo de proteínas con actividad de peroxidasa seleno-independiente y que son capaces de reducir directamente peróxidos, como el H₂O₂ o hidroperóxidos de origen lipídico, a costa de los equivalentes provenientes de la tiorredoxina (Trx – [SH]₂), llevándola a esta última a su forma oxidada (Trx – [S₂] ; Rahman, *et.al.* 2006 ; Nordberg y Arner, 2001) la cual será nuevamente reducida por la tiorredoxina reductasa (TrxR) cerrando así el ciclo de la tiorredoxina:



c) Tiorredoxina Reductasa (TrxR). La **tiorredoxina reductasa** (E.C. 1.6.4.3. NAD[P]H : Trx oxidorreductasa) es una flavoenzima homodimérica NADPH-dependiente que mantiene a la tiorredoxina en su estado reducido, de acuerdo a la siguiente reacción:



En la naturaleza, es posible encontrarla en dos formas (Figura 5a): i) una forma de bajo peso molecular (35 kDa por monómero) presente en procariontes, en la mayoría de los eucariontes inferiores (incluyendo levaduras) y en plantas; y ii) una forma de alto peso molecular de aproximadamente 55 kDa por monómero (Gromer, *et.al.* 1998) que es homóloga a GR (Hill, *et.al.* 1997) y que esta presente en eucariontes superiores como los mamíferos, aunque también se ha reportado en *Plasmodium falciparum* (Krnajski, *et.al.* 2001).

Se sabe que las TrxR de origen bacteriano presentan gran especificidad por su sustrato natural mientras que las TrxR de muchos otros organismos, por ejemplo en los mamíferos, presentan afinidad variable por distintos sustratos (Hill, *et.al.* 1997; Zhong y Holmgren, 2002). Como otros miembros de la familia

de las disulfuro oxidoreductasas, la TrxR muestra dominios de unión a NADPH y FAD, una secuencia de interfase necesaria para la dimerización de la enzima y un sitio activo redox cerca del extremo amino-terminal (Missirlis, *et.al.* 2002). Las TrxR de alto peso molecular presentan un sitio activo redox carboxilo-terminal adicional al de las TrxR de bajo peso molecular que solo presentan uno (Andricopulo, *et.al.* 2006; figura 5a).

Adicionalmente, se sabe que la TrxR de varios organismos eucariontes (incluyendo a los mamíferos) presentan en su sitio activo redox carboxilo terminal un residuo de selenocisteína (Sec, U en el código de una letra ; Lacey y Hondal, 2006) lo que le confiere la capacidad de reducir una amplia variedad de compuestos adicionales a su sustrato natural (Hill, *et.al.* 1997 ; Gromer, *et.al.* 1998 ; Mustacich y Powis, 2000). La presencia de Sec convierte a esta enzima en una selenoproteína, lo que le confiere atributos particulares de este tipo de proteínas.

En mamíferos se han descrito tres isoformas de la TrxR que se encargan principalmente de la reducción de la Trx y de otras proteínas así como de otros sustratos redox no protéicos en la célula (Missirlis, *et.al.* 2000; Papp, *et.al.* 2007):

- *Tiorredoxina Reductasa 1 (TrxR-1, TR1, TR α)*. Esta selenoenzima es de localización principalmente citosólica y esta involucrada en muchos aspectos de la regulación redox celular. En algunos casos especiales es capaz de actuar como prooxidante e inducir apoptosis (Anestal, *et.al.* 2008). Actualmente, debido a su importancia dentro del sistema dependiente de tiorredoxina, es considerado como un blanco para el desarrollo de fármacos contra diversos padecimientos como cáncer y la artritis (Arner y Holmgren, 2006).
- *Tiorredoxina Reductasa 2 (TrxR-2, TR3, TR β)*. Esta selenoenzima se localiza en la mitocondria y tiene mayores niveles de expresión en próstata, testículos, hígado, útero e intestino delgado, mientras que en cerebro, músculo esquelético, corazón y bazo se expresa en niveles menores (Gromer, *et.al.* 2005). Estudios *knockout* para TrxR2 han mostrado que su delección genera una muerte embrionaria temprana mientras que su sobreexpresión protege a las células *in vitro* contra apoptosis inducida por estrés oxidativo (Das y White, 2004) además de

participar en la regulación redox de la apertura del poro de transición de permeabilidad en la mitocondria (Narvarte, *et.al.* 2004 ; He, *et.al.* 2008).

- *Tiorredoxina Reductasa 3 (TrxR-3, TR2, TGR)* Esta selenoenzima presenta un dominio con alta homología con una glutarredoxina tipo monotiol en su extremo amino-terminal (Figura 5a) lo que le confiere, a diferencia de las anteriores isoformas, la capacidad de utilizar como sustrato tanto a la tiorredoxina, como al glutatión por lo que fue denominada tiorredoxina glutatión reductasa (Figura 4b) y fue descrita en el cisticerco de *Taenia crassiceps* (Rendón, *et.al.* 2004).

2.3 Tiorredoxina Glutatión Reductasa

Características y mecanismo de acción. La **tiorredoxina glutatión reductasa (TGR)** fue descrita por el grupo de Gladyshev y colaboradores (Sun, *et.al.* 2001). Esta enzima al igual que la tiorredoxina reductasa clásica, la glutatión reductasa (GR), la tripanotión reductasa (TrpR) y la lipoamida deshidrogenasa (LDH) forman parte de la familia de las piridin-nucleótido-disulfuro oxidoreductasas (ver figura 5a), que comparten los siguientes dominios estructurales:

- Un dominio de unión a FAD,
- Un dominio de unión a NADPH,
- Un dominio de interfase para llevar a cabo la dimerización y
- Un centro activo redox ditiol/disulfuro N-terminal

Adicionalmente, la TGR posee un centro activo redox ditiol/disulfuro en su extremo C-terminal, de manera similar a la mercurio reductasa y a las TRs de alto peso molecular. En el caso de las TrxRs de mamífero, se ha encontrado que este centro activo redox posee un residuo de selenocisteína (como parte del motivo conservado Gly-Cys-Sec-Gly) por lo que se forma un enlace selenotiol / selenenuro-sulfuro.

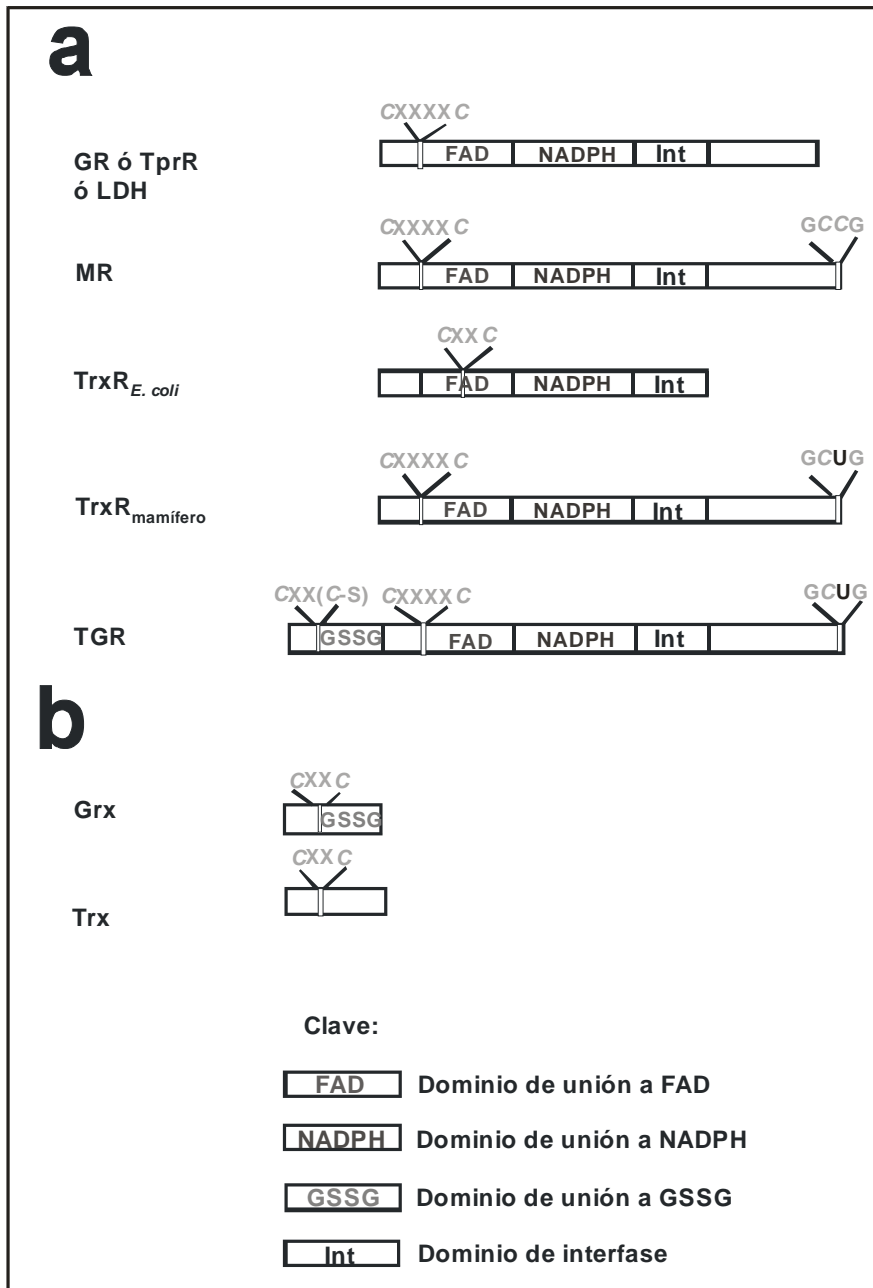


Figura 5. Diagrama comparativo del arreglo estructural primario de la TGR y otras flavoenzimas de la familia de disulfuro reductasas. Esquema comparativo de diversas flavoenzimas y de sus dominios de unión a diversos ligandos así como la posición relativa de sus sitios activos y los residuos catalíticos de cisteína (C, en cursivas) o selenocisteína (U, en negritas) **(a)**. Diagrama comparativo entre los sustratos de la Trx, (Tiorredoxina) y la Grx, (Glutarredoxina) **(b)**. Abreviaturas: GR, Glutación Reductasa; TR, Tripanotión reductasa; LDH, Lipoamida Deshidrogenasa; MR, Mercurio Reductasa; TrxR, Tiorredoxina Reductasa; TGR, Tiorredoxina Glutación Reductasa; Modificado de Salinas, *et al.* 2004 y Rendón y Juárez, 2008.

La TGR fue aislada inicialmente de testículo de ratón e identificada por secuencia en el genoma de distintos organismos vertebrados, incluyendo el hombre (Sun, *et.al.* 2005). También ha sido posible identificar y purificar esta enzima de varios platelmintos parásitos: *Schistosoma mansoni* (smTGR; Alger y Williams, 2002), *Echinococcus granulosus* (egTGR; Agorio, *et.al.* 2003), *Taenia crassiceps* (tcTGR; Rendón, *et.al.* 2004) y, recientemente, *Fasciola hepatica* (fhTGR; Rendón, *et.al.* en preparación). En estos organismos se sugiere que la unión de la unión de los dominios de TrxR y Grx puede representar una ventaja evolutiva pues es una enzima capaz de reducir sustratos pertenecientes a dos sistemas redox independientes (Sun, *et.al.* 2001).

Sin embargo, al parecer existen diferencias entre la enzima de ambos grupos:

- a) En las TGR de mamíferos se ha encontrado el motivo monotiol CXXS dentro del dominio de glutarredoxina (Sun, 2001) mientras que en las TGR de *S. mansoni* y *E. granulosus* este motivo es sustituido por un motivo ditiol CXXC (Alger y Williams, 2002 y Agorio, *et.al.* 2003).
- b) Aunque es posible localizar la expresión de TGR en diversos tejidos, es muy abundante en el testículo. Evidencia experimental señala su participación en la maduración de las espermátidas y que su expresión cesa en el espermatozoide maduro (Su, *et.al.* 2005), mientras que la expresión de TrxR-1 y TrxR-2 es prácticamente la misma en todos los tejidos. En el caso de los platelmintos no se ha encontrado la presencia de una tiorredoxina reductasa clásica ni de una glutatión reductasa por lo que se presume que solo existe en estos organismos la TGR y que dicha enzima lleva a cabo la función de reductasa de los sistemas dependientes de glutatión y de la tiorredoxina (Alger y Williams, 2002; Agorio, *et.al.* 2003; Rendón, *et.al.* 2004).

El mecanismo básico de acción de la TGR propuesto por Sun y colaboradores (2001) es similar al observado en las otras isoformas de TrxR:

- 1) La transferencia de electrones provenientes del NADPH al grupo prostético FAD.

2) La formación de un complejo de transferencia de carga entre el FAD y uno de los residuos de cisteína del sitio catalítico amino-terminal, dejando reducido al otro residuo.

3) Posteriormente se lleva a cabo la transferencia de electrones del sitio activo amino-terminal al sitio activo carboxilo-terminal.

4) Finalmente, en el caso de la tiorredoxina, se lleva a cabo la formación temporal de un enlace selenenuro-sulfuro entre el residuo de selenocisteína de la enzima y un residuo de cisteína del sustrato. Al ser reducido dicho enlace libera al sustrato reducido, regenerando con esto a la enzima a su forma basal.

En el caso de la reducción del glutatión se propone que éste es reducido por el dominio de glutarredoxina el cual transfiere los electrones provenientes del sitio catalítico carboxilo-terminal (Figura 6).

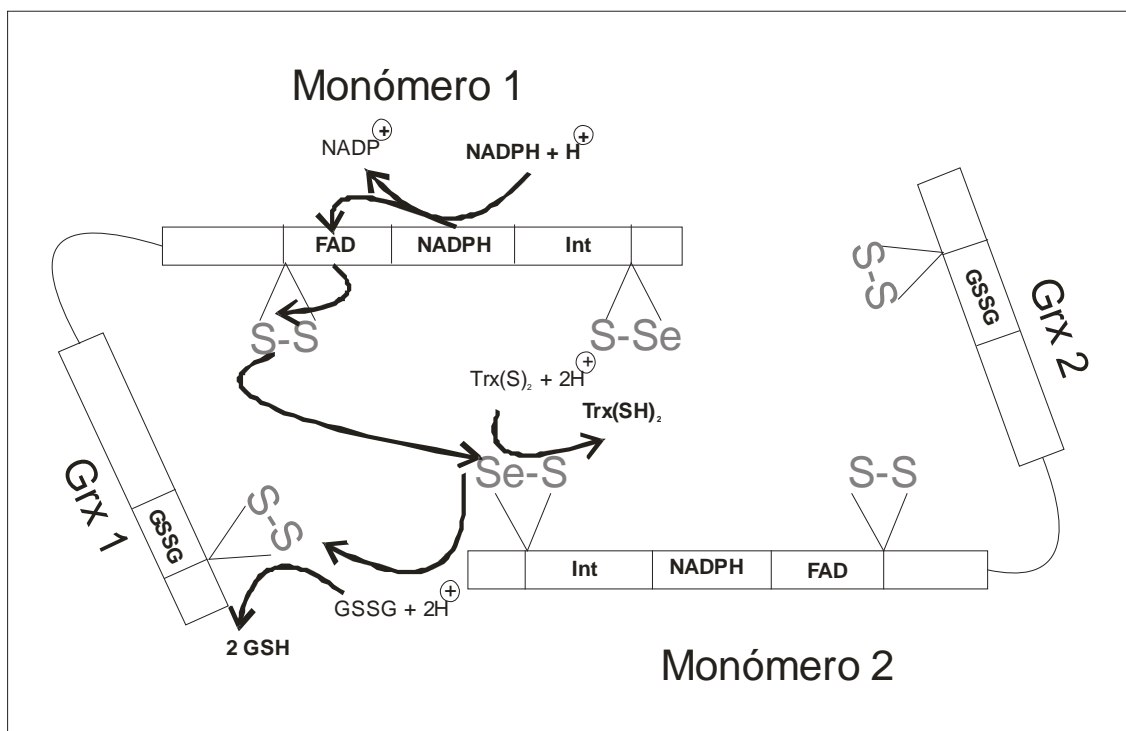


Figura 6. Mecanismo general consensado de la transferencia de electrones en la TGR. Se muestra por medio de flechas el flujo de electrones desde el donador (el NADPH) hasta los sustratos aceptores finales (el disulfuro de glutatión y la tiorredoxina). Nótese la participación necesaria de los dos monómeros en la conformación del sitio catalítico así como el papel del residuo de selenocisteína en la catálisis (modificado de Sharma, *et.al.* 2008).

3. Selenoproteínas

3.1 Características de la selenocisteína (Sec)

En el caso de aquellas proteínas que presentan al menos un residuo de selenocisteína (Sec, U en el código de una letra) se denominan genéricamente **selenoproteínas**.

La actividad biológica del selenio puede ser atribuida casi completamente a la selenocisteína (Allmang y Krol, 2006). Este aminoácido descubierto en 1970, difiere estructuralmente de la cisteína convencional solo en el átomo de azufre, el cual es sustituido por un átomo de selenio en el caso de la selenocisteína. Sin embargo, debido a la configuración electrónica del selenio, la base conjugada de la selenocisteína (el anión selenolato) es más estable que la correspondiente base conjugada de la cisteína (el anión tiolato). De hecho, el selenol protonado es más ácido que el tiol de la cisteína ($pK_{a_{Sec}} = 5.2$ vs $pK_{a_{Cys}} = 8.5$) por lo que, a pH fisiológico, el selenol de la selenocisteína se encuentra en su forma aniónica de selenolato, lo que lo hace más reactivo durante la catálisis que su contraparte cisteína, aumentando con esto la eficiencia catalítica de las selenoenzimas (Johansson, *et.al.* 2005).

A diferencia de otros aminoácidos modificados la selenocisteína es incorporada durante la traducción a las proteínas al igual que los aminoácidos canónicos.

3.2 Características generales de las selenoproteínas

Las diversas selenoproteínas exhiben una amplia diversidad de estructura, función, distribución y evolución. Pueden ser intracelulares, transmembranales o extracelulares Su expresión puede ser ubicua o específica del tejido. Se han descrito en *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* aunque no están representadas de igual forma en todos los grupos.

La mayoría de las selenoproteínas caracterizadas son enzimas, muchas de las cuales están involucradas en reacciones redox. El residuo Sec es esencial para la actividad catalítica por formar parte del sitio activo, exhibiendo generalmente una eficiencia catalítica mayor que la de sus contrapartes con cisteína. Adicionalmente a esto, algunas selenoproteínas pueden exhibir

funciones estructurales, de transporte, de señalización, de defensa o aún no tener función conocida (Small-Howard y Berry, 2005).

A pesar de esta gran diversidad, todas las selenoproteínas comparten ciertos elementos claves en su proceso de biosíntesis (Small-Howard, *et.al.* 2006), en particular, la presencia de un tRNA único capaz de decodificar el codón UGA como codón de inserción de selenocisteína (Sec tRNA^{[Ser]^{Sec}), así como la maquinaria necesaria para la síntesis de selenocisteína y selenofosfato.}

3.3 Selenoproteoma humano

A la fecha, se han identificado aproximadamente 30 familias distintas de selenoproteínas entre los diferentes organismos. (Papp, *et.al.* 2007). El conjunto total de proteínas que contienen al menos un residuo de selenocisteína en un organismo es denominado **selenoproteoma**, El selenoproteoma más grande se ha reportado en peces con 30 selenoproteínas comparativamente con el humano compuesto por 25 selenoproteínas. En la mayoría de los organismos, su selenoproteoma se reduce a unas cuantas selenoproteínas mientras que en el grupo de las levaduras y plantas se pierden (así como su maquinaria necesaria para su síntesis); sin embargo, dichos organismos expresan homólogos conteniendo – Cys.

De hecho, para muchas familias de selenoproteínas, la interconversión de Sec/Cys se observa comúnmente entre especies.

El selenoproteoma humano consiste en 7 familias de selenoproteínas, algunas con múltiples genes con funciones similares (cuadro 2). Aunque varias selenoproteínas no tienen una función determinada, se infiere una posible función redox debido a la presencia de un motivo de tiorredoxina CXXC.

Cuadro 2. Selenoproteoma humano

Selenoproteína	Localización			Función	Lugar de expresión
	en el cromosoma (nº de exones)	del residuo Sec (Nº de residuos)	celular		
15 kDa	1p22.3 (5)	93 (162)	RE(l)	Participa en el control de calidad de glicolisación en proteínas	Abundante en próstata, testículo, riñón e hígado; bajo en otros órganos
DIO 1	1p32.3 (4)	126 (249)	MP	Metabolismo de la hormona tiroidea (Transforma T4 en T3)	Abundante en hígado, riñón, tiroides y pituitaria; bajo en otros órganos ; NO cerebro
DIO 2	14q31.1 (2)	133 (265)	RE(m)	Metabolismo de la hormona tiroidea (Transforma T4 en T3)	Abundante en sistema nervioso central, músculo cardiaco y esquelético, tiroides y pituitaria; bajo riñón y páncreas.
DIO 3	14q32 (ND)	144 (278)	MP	Metabolismo de la hormona tiroidea (Transforma T4 en rT3; inactiva DIO 1 y 2)	Abundante en cerebro, placenta y útero en embarazo
GPx 1	3p21.31 (2)	47 (201)	C	Reducción de peróxido de hidrógeno	Ubicua; abundante hígado y eritrocitos
GPx 2	14q23.3 (2)	40 (190)	C	Reducción de hidroperóxidos orgánicos	Solo hígado y sistema gastrointestinal; NO corazón y riñón
GPx 3	5q33.1 (5)	73 (226)	Exc	Antioxidante plasmático	Solo túbulos proximales renales y plasma
GPx 4	19p13.3 (7)	73 (197)	C,Mi,N	Reducción de hidroperóxidos fosfolipídicos de membrana	Ubicua; abundante en testículo
GPx 6	6p22.1 (5)	73 (221)	ND	Metabolismo de olores	Solo epitelio olfatorio y tejidos embrionarios
H	11q12.1 (4)	44 (122)	C	Posible función redox	Ubicua
I	2p23.3 (10)	387 (397)	ND	ND	Ubicua
K	3p21.31 (5)	92 (94)	MP, RE (l)	Posible función redox	Ubicua; abundante en corazón y músculo esquelético
M	22q12.2 (5)	48 (145)	RE (l)	Posible función redox	Ubicua; abundante en cerebro y tiroides

Abreviaturas: RE(l), lumen del retículo endoplasmático; MP, membrana plasmática, RE (m), membrana del retículo endoplasmático; C, citosol ; Mi, mitocondria; N, núcleo; Exc, extracelular ; ND, no determinado. (Adaptado de Kryukov, *et.al.* 2003)

Cuadro 2. Selenoproteoma humano (continuación)

Selenoproteína	Localización			Función	Lugar de expresión
	en el cromosoma (nº de exones)	del residuo Sec (Nº de residuos)	celular		
N	1p36.11 (12)	428 (556)	RE (l)	ND	Ubicua en desarrollo fetal; abundante en músculo esquelético, cerebro y pulmón
O	22q13.33 (9)	667 (669)	ND	Posible función redox	ND
P	5p12 (4)	59,300,318,330, 345,352,367, 369, 376,378 (381)	Exc	Almacenaje y transporte de selenio Posible función redox	Plasma; secretada por el hígado
R (MsrB 1)	16p13.3 (4)	95 (116)	C, N	Reducción de residuos de metionina oxidada	Ubicua; abundante en cerebro
S	15q26.3 (6)	188 (189)	Exc, RE (m)	Posiblemente en el metabolismo de la glucosa hepática y en la degradación de proteínas	Ubicua; baja en animales diabéticos
SPS 2	16p11.1 (ND)	60 (448)	C	Cataliza la formación de selenofosfato para la síntesis de selenocisteína	Ubicua; abundante en estadios de desarrollo tempranos
T	3q24 (6)	36 (182)	ND	Posible función redox	ND
TrxR 1	12q23.3 (15)	498 (499)	C, Exc, N	Reducción de la tiorredoxina Señalización redox Antioxidante	Ubicua
TrxR 2	22q11.21 (18)	522 (523)	Mi	Reducción de la tiorredoxina Señalización redox Antioxidante	Ubicua; abundante en próstata, testículos, hígado, útero e intestino delgado
TrxR 3 (TGR)	3q21.2	655 (656)	RE (l)	Maduración de las espermátidas	Ubicua en bajos niveles, abundante en testículos
V	19q13.13 (6)	273 (346)	ND	Posible función redox	Solo en tubos seminíferos de testículo
W	19q13.32 (6)	13 (87)	C, (¿MP?)	Posible función redox	Ubicua

Abreviaturas: RE(l), lumen del retículo endoplasmático; MP, membrana plasmática, RE (m), membrana del retículo endoplasmático; C, citosol ; Mi, mitocondria; N, núcleo; Exc, extracelular ; ND, no determinado. (Adaptado de Kryukov, *et.al.* 2003)

4. Auranofín

El **auranofín** es un compuesto sintético altamente hidrofóbico derivado del oro (I) en el cual el átomo central de oro se estabiliza por un ligando fósforo y un ligando azufre unidos covalentemente (figura 7).

Su nombre sistemático IUPAC es trietilfosfino de (2,3,4,6-tetra-6-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosato-S de oro), mientras que su nombre genérico es auranofín teniendo como sinónimos ridaura, crisinor, crisofin y ridaurán.

4.1 Uso farmacológico

Desde hace más de 50 años los compuestos derivados del oro han jugado un papel importante en el tratamiento de la artritis reumatoide (Sigler, 1983) que es un padecimiento crónico común en el cual la membrana sinovial de múltiples articulaciones esta inflamada, causando daño al cartílago y al hueso. Durante el proceso inflamatorio, el tejido sinovial se infiltra por células mononucleadas, principalmente macrófagos y células T que juegan un rol crucial en la patología de este padecimiento. En el curso de la inflamación, los compuestos promotores de la inflamación derivados de células, incluyendo citocinas como IL-1, IL-6, y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α), auto-anticuerpos, metabolitos lipídicos y ERO inducen un crecimiento patológico de los fibroblastos sinoviales y producen enzimas proteolíticas que median la destrucción local del cartílago y del hueso. (Madelon, *et.al.* 1999).

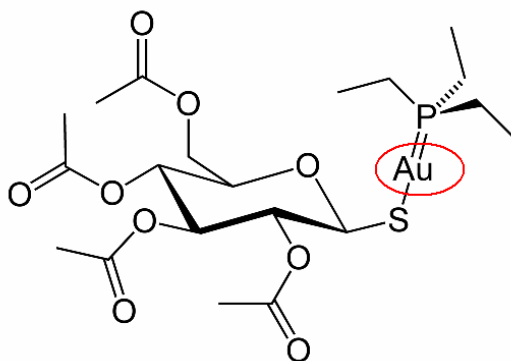


Figura 7. Diagrama de la estructura química del auranofín.

El primer reporte del uso del auranofín como un tratamiento útil para pacientes con artritis reumatoide fue hecho por Finkelstein y colaboradores (1976). Su eficacia y seguridad se ha probado ampliamente en pacientes con artritis reumatoide en sus etapas tempranas (Itokazu, *et.al.* 1995).

Los efectos de la administración farmacológica del auranofín descritos por Blodgett (1983) son:

- Inhibición parcial en la producción de anticuerpos, en el modelo de ratas con artritis.
- Reducción de los niveles séricos elevados de IgA, IgM e IgG, así como el factor reumatoide.
- Inhibición de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.
- Inhibición de la liberación de enzimas lisosomales.
- Reducción de la actividad quimiotáctica de monocitos humanos.
- Supresión de la generación del radical superóxido por parte de las células polimorfonucleares después de su activación química.

La dosis terapéutica recomendada para un adulto de 70 kg es de dos dosis de 6 mg por día administrada por vía oral durante 12 meses, pudiéndose extender de manera indefinida el tratamiento si no se observan efectos secundarios (Blodgett, 1983). Dicha forma de administración produce incrementos pequeños y graduales de oro en sangre y riñón. En sangre, el 90 % del oro se encuentra asociado principalmente a la albúmina. La penetración del compuesto transportado y liberado por la albúmina al interior de la célula puede deberse en parte a su naturaleza lipofílica. Su vida media en plasma terminal es de 16.8 días después de la dosis inicial y 25.5 días siguiendo seis meses de tratamiento con 6 mg por día. La principal ruta de excreción es vía entérica, recuperándose el 95 % del oro en heces (Blocka, 1983).

4.2 El auranofín y las selenoproteínas

Aunque no se conoce a ciencia el mecanismo de acción del auranofin dentro de la célula, se sabe desde hace mucho tiempo que los compuestos derivados del oro pueden inhibir en distinto grado a las selenoenzimas, siendo

la familia de las tiorredoxina reductasas las más sensibles (Hill, *et.al.* 1997 ; Gromer, *et.al.* 1998).

De los diversos compuestos derivados del oro, como la aurotioglucosa, el aurotiomalato y el auranofín, éste último tiene la mayor efectividad para inhibir específicamente la actividad de las TrxR en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Zhong y Holmgren, 2000 ; Witte, *et.al.* 2005) de manera dosis-dependiente (Manzano, *et.al.* 2007). Por ejemplo, las TrxR citosólica y mitocondrial en hepatocitos de rata se inhiben por el auranofín dentro de un rango nanomolar, mientras que se requirió una cantidad superior al rango micromolar para observar un efecto en la glutatión peroxidasa y en la glutatión reductasa (Rigobello, *et.al.* 2004b).

5. Biología de Taenia crassiceps

5.1 Generalidades de los platelmintos.

El phylum *Platyhelminthes* agrupa a más de 18,500 especies distribuidas en cuatro clases de organismos: la clase Turbellaria, compuesta por organismos de vida libre y las clases Trematoda, Monogenea y Cestoda; constituidas por organismos parásitos (Pechenick, 2000). Los platelmintos se caracterizan por ser organismos acelomados, triploblásticos, con simetría bilateral y aplanados dorsoventralmente. La capa mesodérmica de origen embrionario forma un conjunto no homogéneo de células denominado parénquima. Este tejido ocupa el espacio entre la pared corporal externa y el endodermo del tubo digestivo ciego (en caso de existir) y en él se encuentran embebidos los órganos internos como el aparato reproductor o las fibras musculares (Brusca y Brusca, 2003).

Estos organismos no presentan órganos especializados para la respiración ni para la circulación por lo que el intercambio gaseoso se da por difusión simple a través de la pared corporal o tegumento. La eliminación de desechos metabólicos se lleva a cabo principalmente a través de protonefridios. Los platelmintos son organismos cefalizados. Básicamente, su sistema nervioso comprende un ganglio cerebral anterior conectado a cordones nerviosos longitudinales.

La mayoría de las especies de platelmintos son hermafroditas por lo que el intercambio de esperma y la fertilización puede llevarse a cabo de forma cruzada entre distintos individuos o dentro del mismo individuo (autofertilización).

5.2 La clase Cestoda.

Esta clase está compuesta por organismos endoparásitos los cuales tienen por hospederos, en la mayoría de los casos, a organismos vertebrados. En estos organismos (al igual que los demás organismos de vida parasitaria del phylum), la epidermis ciliada característica de los organismos de vida libre (turbelarios) está reemplazada por un tegumento que es un sincicio formado por las extensiones citoplásmicas de células del parénquima. En la base del tegumento se encuentra una membrana basal que lo delimita del parénquima

celular. La superficie externa del tegumento presenta proyecciones citoplásmicas llamadas microtricas (tipo borde de cepillo) que son un aumento en la superficie celular que hacen mas eficiente la obtención de nutrientes mediante ósmosis y pinocitosis (Smyth y McManus, 1989; Rugeiro y Noemi, 1999) y como mecanismo de evasión inmune. El parénquima puede variar de células mesenquimatosas empacadas densamente hasta redes sinciciales y fibrosas con espacios llenos de fluido (Brusca y Brusca 2003).

La clase Cestoda incluye dos subclases: la subclase Cestodaria (organismos alargados sin escólex y sin proglótidos) y la subclase Eucestoda (organismos con un escólex bien desarrollado y con proglótidos). A esta clase última subclase pertenece *Taenia crassiceps* que es el organismo que sirvió de modelo para realizar la presente tesis.

5.3 Biología de *Taenia crassiceps*.

La clasificación de *T. crassiceps*, según Pechenick (2000), es la siguiente:

División: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia*

Especie: *Taenia crassiceps*

El estado adulto es alargado, adaptado al aparato digestivo del hospedero vertebrado. El cuerpo esta dividido en zonas claramente diferenciadas: a) un escólex que es un órgano de fijación que puede presentar estructuras como ganchos y ventosas. Inmediatamente detrás del escólex se localiza una pequeña región diferenciada denominada cuello b) la cual es una zona germinativa que da origen a un segmento alargado denominado estróbilos c), compuesto por proglótidos individuales. Cada proglótido esta provisto de

aparatos reproductores masculinos y femeninos; existen proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, en función de su madurez sexual (Brusca y Brusca, 2003).

La forma larvaria o cisticerco (también denominada metacéstodo) es una vesícula ovoide, llena de un fluido opalescente y en algunas cepas contiene un escólex invaginado identificable. La vesícula consiste en una capa interna (parénquima celular) y en una capa externa (tegumento) similares a las descritas anteriormente. El tegumento tiene un rol protector y también sirve para absorber nutrientes. Entre la capa interna y externa hay fibras musculares, células en flama, corpúsculos calcáreos, una red neural sencilla y un grupo de células germinales no diferenciadas, entre otros constituyentes. Cualquier cambio en la presión osmótica causa la evaginación del escólex (Pawlowski, 2002).

El ciclo de vida del céstodo *Taenia crassiceps* se inicia con la maduración y posterior expulsión de **proglótidos grávidos** a través de las heces por parte del zorro que es el hospedero definitivo. Los **huevos fértiles** se liberan al medio al desintegrarse el proglótido. Durante este tiempo, cada cigoto se ha desarrollado a un estadio denominado **oncósfera**, rodeada por una cubierta resistente llamada embrióforo, la cual permite al embrión permanecer en el medio hasta por dos o tres meses. Usualmente seis pequeños ganchos son evidentes en el embrión; debido a esto la oncósfera también es conocida como hexacanto. Si un roedor pequeño ingiere los huevos, la oncósfera es liberada de su cubierta y se fija a la pared del tracto digestivo del hospedero. Posteriormente atraviesa la pared intestinal y migra al peritoneo (o a otros órganos o tejidos) para ahí desarrollarse en una forma larvaria denominada **cisticerco**. En el caso de *T. crassiceps*, los cisticercos pueden reproducirse asexualmente solo limitados por el espacio físico en el tejido donde se encuentran. En algunas cepas, cada cisticerco puede contener un escólex desarrollado invaginado. Finalmente, si el hospedero intermediario es ingerido por el hospedero definitivo: el zorro (*Vulpes vulpes*) (Saeed, *et.al.* 2006) el escólex evagina para anclarse al intestino del hospedero definitivo, donde la forma adulta ó **tenia** crecerá, madurará y producirá proglótidos grávidos cerrando así el ciclo (Kassal, 1999 ; figura 8).

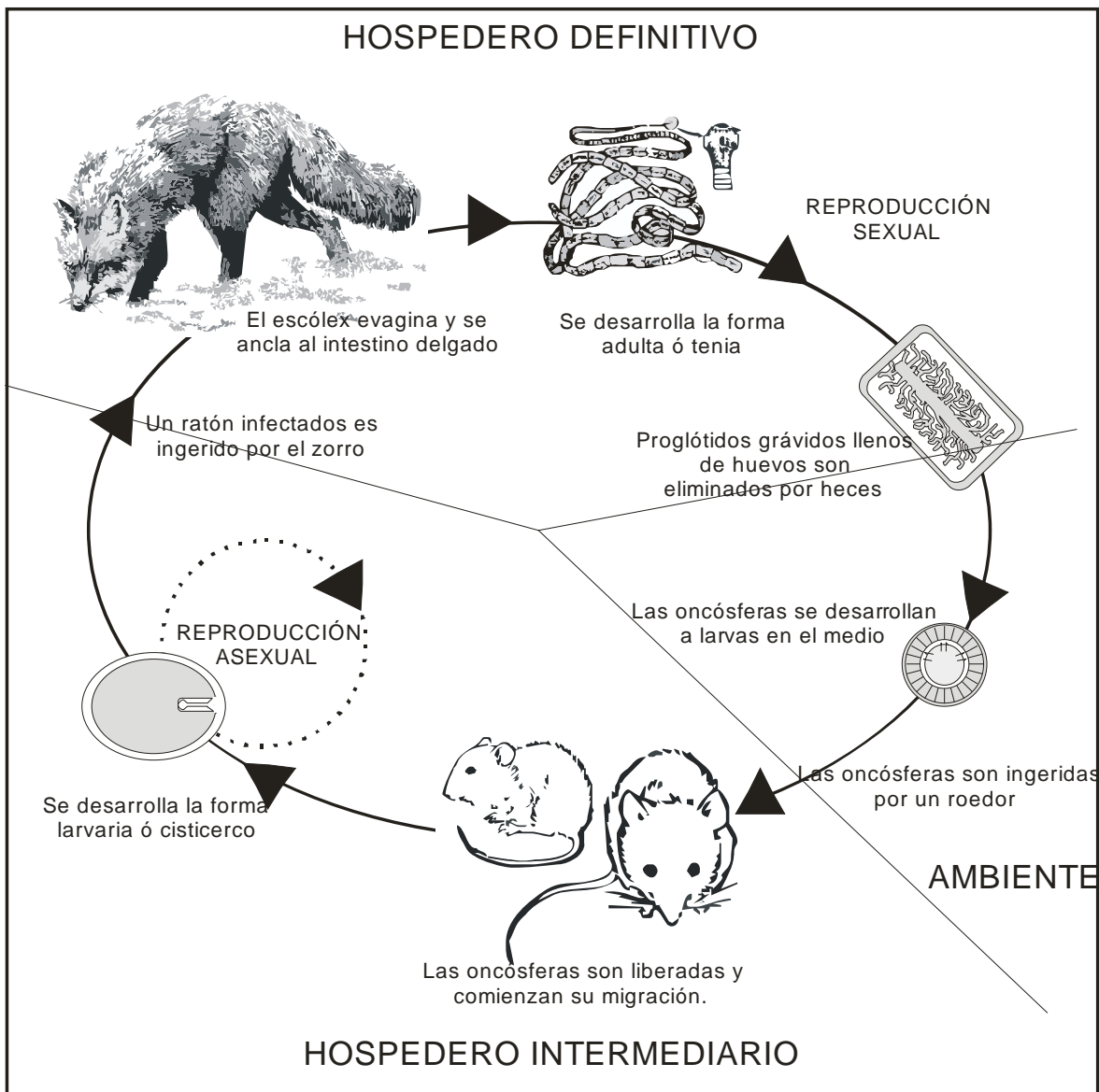


Figura 8. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

La parasitosis causada por la forma adulta de éste parásito se denomina **teniasis** mientras que la parasitosis ocasionada por su forma larvaria se le conoce como **cisticercosis**.

En México se estima que en año de 2002, la incidencia de la teniasis ocasionada por *Taenia solium* (la tenia del cerdo) en humanos fue entre 0.2% y 0.4% mientras que la cisticercosis humana fue de 4.9 – 10.9%; afectando predominantemente a la población económicamente activa (Sarti, 2002). Sin embargo, se cree que estas cifras pueden ser subestimadas dado que muchos casos no son diagnosticados. Actualmente se sabe que los cisticercos pueden

permanecer viables por una cantidad considerable de tiempo, durante el cual provocan una infección asintomática mediante la evasión activa y/o supresión de la respuesta inmune así como la ausencia de inflamación en el tejido circundante (Flisser, 2002).

5.4 La TGR y los céstodos

Como se mencionó anteriormente, la TGR se ha encontrado en diversos platelmintos de la clase Cestoda, particularmente en *Echinococcus granulosus* y en dos especies del género *Taenia* (*T. crassiceps* y *T. solium*). Al comparar la secuencia de 63 residuos de aminoácidos distribuidos en 5 péptidos de TGR obtenidos del cisticerco de *T. crassiceps* (*tcTGR*; Rendón, *et. al.* 2004 y Guevara-Flores, *et.al.* en proceso de publicación), correspondientes al 11 % de la secuencia total estimada, se observa un 95.2 % de identidad con respecto a la TGR mitocondrial de *E. granulosus* (*egTGR*). Por otro lado, al analizar la secuencia deducida de 290 residuos distribuidos en 3 péptidos de TGR provenientes de *T. solium* (*tsTGR*; Proyecto Genoma de *Taenia solium*, comunicación personal), equivalentes al 46.5 % total de la secuencia esperada, encontramos un 95.2 % de identidad con respecto la *egTGR* (Figura 9). Estos resultados son acordes a la cercana relación filogenética entre estos céstodos. Cabe mencionar que las pequeñas diferencias entre las tres reductasas antes mencionadas se localizan principalmente en la región N - terminal.

Debido a que la tiorredoxina reductasa, la glutatión reductasa y la tiorredoxina glutatión reductasa se consideran parte de los sistemas redox más importantes en los animales y siendo la TGR la única reductasa encontrada en estos platelmintos parásitos, esta enzima se ha propuesto como un blanco atractivo para el diseño de fármacos inhibidores de la TGR (Salinas, *et.al.* 2004).

5.5 Efecto del auranofín en la TGR de T. crassiceps

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la actividad de la TGR aislada del cisticerco de *T. crassiceps* se inhibe completamente con 10 nM de auranofín (Rendón, *et.al.* 2004), concordando con lo reportado para la TGR purificada de *Schistosoma mansoni* (Alger y Williams, 2002).

Figura 9. Alineación de secuencias de aminoácidos de la tiorredoxina glutatión reductasa de *Echinococcus granulosus* (Eg), *Taenia solium* (Ts) y *T. crassiceps* (Tc). El péptido señal se muestra en cursivas mientras que el residuo de selenocisteína (U) se muestra en negritas. En todos los casos, el análisis de las secuencias fue hecho con el programa Blast (2.0) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) haciendo la búsqueda por homología en el GeneBank. Las secuencias fueron obtenidas de las siguientes fuentes: *Eg* TGR, The echinobase, base de datos EST de *E. granulosus* <http://www.nematodes.org/Lopho/LophDB.php> ; *Ts* TGR, Proyecto Genoma de *Taenia solium*, UNAM http://132.248.32.30/karel/Taenia_Data/ y *Tc* TGR, Rendón, *et.al.* 2004 y Guevara-Flores, en proceso de publicación.

```

E.g. MFGCHCLRRRA CTPLSAIACF FNPVRTAMAP IGGSAEQVEK LRNKINNAAV LVFAKSFPCPY CKKVMERFNN 70
T.s. MFACHCLRRRA CAPLSAIACF FNPVISTLKK I-----
T.c. -----AP IGGSTEQI-R L---INNAAV LVFAK-----

E.g. LKIPFGYLDL DLKKNQSDYQ KMLQEITGRT TVPQVFFRGE FIGGCDDVMA IDD-TIVKKA NEMKYDYDMV 140
T.s. ----- --GGCDDVMA IDDETIVKKA NEMKYDYDMV
T.c. -----MLQEITGRT TVPQVFFR-----

E.g. II-----LA LAKESAKSGA KVALLDFFVVP TPMGTTWGLG GTCVNVGCIP KKLHQAALL NHYMEDAKSF 210
T.s. IIGGGSGGLA LAQESAKSGA KVALLDFFVVP TPMGTTWGLG GTCV-----
T.c. -----

E.g. GWDVDKGPFD VVKMVEGIQD HIHALNFGYR SSMNANVKY LNALGEIVDP HTIKTTNKQG IVKNITNTI 280
T.s. -----
T.c. -----Y LNALGEIVDP HTIK-----

E.g. IVATGERPRY PPIPGAKEYG ITSDDLFTLD HNPCKTLCVG ASYVSLECAG FLSSIGCDVT VMVRSIFLRG 350
T.s. -----
T.c. -----Y PPIPGAK-----

E.g. FDQQMAGLIS DYIAKYGVKF VRPCVPTSVR CLEEYDPESG KLAIYEVEGK HEDGTPFKDT FNTVLFVAVGR 420
T.s. ----- --VLFVAVGR
T.c. -----

E.g. DPCTTNIGLQ NVDVKTNGR VVVDDEERTN VPNIYAIGDV SNAGYQLTPL AIQAGKNLAR RLYTADDCRT 490
T.s. DPCITNIGLQ NVDVKTSSGR ISVDDEECTN VPNIYAIGDV NNAGYQLTPL AIQAGKNLAR RLYTADDCQT
T.c. -----

E.g. DYTNPPTVF TPLEYGCIGL SEENAIKFG EDNIEVFHSY FQPLEWTVPH RPDNTCYAKL IINKQDDNRV 560
T.s. DYTNPPTVF TPLEYGCIGL SEENAITKFG KDNIEVFHSA FQPLEWTVPS RPNNTCYAKL IINKQDDNRV
T.c. -----

E.g. VGFHVFGPNA GEVTQGYAVA MHLGARKEDF DRTIGIHPTC SETFTTLRVT KSSGASATVT GCUG 624
T.s. VGFHVFGPNA GEVTQGYAVA MRLGARKEDF DRTIGIHPTC SE-----
T.c. -----

```

5.6 El cisticerco de *Taenia crassiceps* como modelo de estudio

Este trabajo se realizó utilizando al cisticerco de *T. crassiceps* como modelo de estudio y el cual ofrece diversas ventajas:

- a) A diferencia de *T. solium*, el cisticerco de *T. crassiceps* puede reproducirse asexualmente en el peritoneo del ratón, lo que
- b) permite la obtención de grandes cantidades de material biológico en poco tiempo y de una manera económica dada la facilidad para propagar la infección en ratones de una manera segura.
- c) El hombre no es susceptible a la parasitosis ocasionada por *T. crassiceps*.
- d) La cercanía filogenética entre *T. solium* y *T. crassiceps* (Ito, *et.al.* 2002) permite extrapolar nuestros resultados a los distintos organismos pertenecientes al género *Taenia* (Figura 9).
- e) La cisticercosis experimental en ratón permite tener un modelo de estudio de la cisticercosis humana (Cardona y Teale, 2002).

ANTECEDENTES

- Los seres vivos tienen mecanismos enzimáticos para evitar el daño por ERO y mantener su homeostasis redox celular.
- En los platelmintos se ha propuesto a la TGR como la única enzima antioxidante que regula este equilibrio redox.
- La TGR del cisticerco de *T. crassiceps* se purificó y secuenció parcialmente. Comparando su secuencia con la reportada para *E. granulossus* y *T. solium* (Figura 9) encontramos un 95% de identidad entre las enzimas de los tres céstodos.
- La actividad de la TGR de *T. crassiceps* purificada a homogeneidad se inhibe totalmente con auranofín 10 nM.
- El auranofín es un compuesto usado en la clínica como un medicamento contra la artritis reumatoide desde 1976. Los efectos secundarios producidos por su administración son leves y bien tolerados por los mamíferos por lo que puede ser usado por largos periodos de tiempo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Siendo el auranofín un inhibidor de la TGR pura y considerando que ésta es la única enzima que participa en la regulación del estado redox celular de la tiorredoxina y el glutatión en el cisticerco de *Taenia crassiceps*, el efecto *in vivo* del auranofín debe ser letal.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Probar el efecto del auranofín en la viabilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

2.2 Objetivos particulares

- Implementar las condiciones para el mantenimiento de los cisticercos.
- Determinar parámetros de viabilidad de los cisticercos en condiciones basales.
- Determinar si el auranofín tiene un efecto letal en los cisticercos.
- Determinar el tiempo y la concentración de auranofín necesarias para tener un efecto letal en los cisticercos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro; GSSG: disulfuro de glutatión; EDTA: ácido etilenoaminotetraacético; HEPES: N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico); TRIS-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico; MTT: bromuro de tetrazolio azul de tiazolil; (Sigma). Auranofin (ICN Biomedicals). DMSO: dimetilsulfóxido (Merck). Na₂CO₃: Carbonato de sodio (J.T. Baker).

2. Obtención del material biológico

Se usaron ratones hembra de la cepa Balb/c de entre 6 a 8 semanas de edad con un peso promedio de 18g. Cada ratón fue inoculado intraperitonealmente con 20 cisticercos con el escólex poco desarrollado de *T. crassiceps* de la cepa HYG. Aproximadamente cuatro meses después, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los cisticercos del peritoneo, en condiciones estériles, se lavaron de 3 a 4 veces con una solución amortiguadora estéril de fosfato-salina (PBS) 10 mM, pH 7.4 (del Arenal, *et.al.* 2005).

3. Selección y mantenimiento de los cisticercos

Los cisticercos obtenidos fueron muy heterogéneos en tamaño (0.5 – 5 mm). Para homogeneizarlos se siguieron dos métodos distintos: a) tamizaje por una malla estéril con un poro de 1.0 mm de diámetro y b) selección manual con ayuda del microscopio estereoscópico para obtener cisticercos de alrededor de 3 mm de diámetro.

Para el mantenimiento de los cisticercos se preparó medio RPMI 1640 (Gibco) con 2.2 g de HEPES, 2.2 g de Na₂CO₃ y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma). El pH final del medio se ajustó a 7.0.

4. Parámetros de viabilidad

4.1 Determinación de la viabilidad por motilidad

Se tomaron algunos de cisticercos y se colocaron en una caja Petri y se indujo el movimiento mediante su exposición a agua destilada a una temperatura de 37 °C, durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se observaron los cisticercos a través del microscopio estereoscópico para determinar el porcentaje de vivos y muertos de acuerdo a la motilidad. En este caso, solo aquellos cisticercos que respondieron a la inducción de movimiento se consideraron como vivos.

4.2 Determinación de la viabilidad por colorantes vitales

Se colocó una alícuota de cisticercos de cada uno de los tratamientos en una caja de Petri y se expusieron durante 10 minutos a una solución de azul tripano al 0.02% en PBS y se observaron al microscopio estereoscópico para determinar el porcentaje de vivos (no teñidos) y muertos (teñidos).

4.3 Determinación del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido por el método polarimétrico con un electrodo para medir O₂ tipo Clark usando un monitor de oxígeno YSI-53 y membranas de Teflón ultrafinas de alta sensibilidad (Yellow Springs Instruments). El consumo de oxígeno de los cisticercos se evaluó siguiendo el método descrito por del Arenal y colaboradores (2005): se determinó la actividad respiratoria a 37 ° en 1.8 mL de PBS previamente saturado de oxígeno. Los cisticercos se lavaron vigorosamente con PBS antes de la determinación del consumo de oxígeno. Para calibrar se utilizó como referencia PBS aireado por agitación vigorosa durante 30 segundos.

5. Efecto del auranofín en la viabilidad de los cisticercos

Los cisticercos se incubaron en matraces de 50 mL con medio en una proporción de 9 mL por cada mililitro de cisticercos, a una temperatura de 37 ° C, en agitación (126 rpm) durante tres horas antes de iniciar el tratamiento.

Se agregó al medio, en condiciones estériles, distintas cantidades de una solución stock de auranofín 10 mM en DMSO al 100% para obtener una concentración final de 0, 0.1, 1.0 y 10.0 μM en un volumen final de 20 mL. Posteriormente, los cisticercos se incubaron a 37 °C y en agitación (126 rpm). Transcurridas 24 horas, se recuperaron los cisticercos, se lavaron con PBS dos veces, se decantaron perfectamente y se separaron porciones para evaluar los distintos parámetros de viabilidad antes descritos.

5.1 Efecto del tiempo

Ya determinada la concentración letal de auranofín, se incubaron los cisticercos durante distintos intervalos de tiempo (0 , 2 , 4, 8 , 12 , 16 , 20 y 24 hrs.) en medio con auranofín 10 μM . A continuación, se recuperaron los cisticercos y se procedió a evaluar los distintos parámetros de viabilidad de la manera antes descrita.

5.2 Efecto de la concentración

Después de determinar el tiempo mínimo al cual se observaba el máximo daño, se probó éste tiempo con concentraciones crecientes de auranofín (de 0 a 12 μM).

En todos los casos el porcentaje de cisticercos vivos se determinó en función del control. Adicionalmente, se realizó un control del disolvente (DMSO) utilizado, usando el volumen necesario para disolver la máxima concentración de auranofín ocupada en los experimentos.

5.3 Infectividad

Se inocularon ratones Balb/c con cisticercos tratados con 10 μM de auranofín por 24 horas. Se dejaron a los ratones durante tres meses y se sacrificaron para recuperar a los cisticercos y evaluar el avance de la infección.

6. *Obtención de extractos crudos*

Se tomaron alícuotas de 120 cisticercos correspondientes a cada uno de los tiempos y concentraciones de auranofín utilizados. Se lavaron con PBS, se decantaron y se congelaron a -20 °C para almacenarlos hasta el día siguiente.

Se homogeneizaron manualmente con un pistilo de teflón Bel Art (ICA) en presencia de PMSF (86 µM). Estos extractos crudos se centrifugaron a 38,800 g durante 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se dializó usando una membrana de diálisis con corte de peso molecular de 3.500 kDa (Spectrum) contra una solución Tris 50 mM EDTA 1mM pH 7.8 a 4°C durante toda la noche. Se realizaron cambios de 2 horas cada uno antes de recuperar el dializado para su medición.

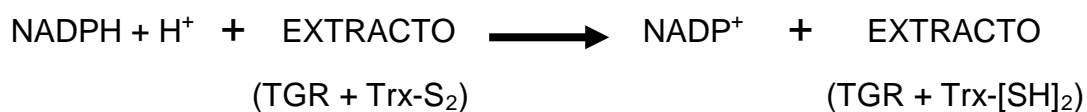
6.1 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951) modificado por Markwell (1978).

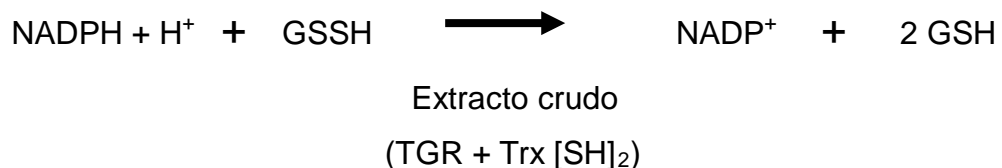
7. Determinación de la actividad de la TGR

7.1 Por espectrofotometría

La actividad de la TGR se midió en los extractos crudos. Para realizar los ensayos se utilizó TRIS 100 mM EDTA 2 mM (pH 7.8) y 120 µM de NADPH obteniendo la línea basal. Se inició la reacción agregando 100 µL del extracto crudo y se midió a 340 nm la velocidad de reacción causada por la disminución de la absorbancia del NADPH al ser oxidado como se muestra en la siguiente reacción:



Para evaluar la actividad de Glutación reductasa se adicionó al ensayo 4 µM de GSSG y se midió nuevamente la velocidad de la reacción por la desaparición del NADPH a 340 nm :



7.2 Por zimograma

Para evaluar la actividad de la TGR por zimografía se corrió un gel de poliacrilamida al 10 % a 20 mA en condiciones no desnaturizantes, durante dos horas a 4 °C; en el cual se aplicaron alícuotas con 80 µg de proteína de los distintos homogenados obtenidos de los cisticercos tratados con distintas concentraciones de auranofín. Como marcador, se corrieron 3.8 µg de *T.c.*TGR purificada en el laboratorio. Al finalizar la electroforesis, el gel se transfirió a un amortiguador de lavado el cual contenía Tris – HCl 10 mM pH 7.4 y se dejó en agitación aproximadamente 20 minutos. Posteriormente, se eliminó el amortiguador de lavado y se agregó la solución reveladora (TRIS – HCl 10 mM pH 7.8, NADPH 0.2 mM y MTT 0.25 mg/mL), se incubó el gel en agitación suave y en oscuridad hasta la aparición de las bandas que corresponden a los lugares donde se llevó a cabo la siguiente reacción:



Un duplicado del gel revelado para la actividad de la TGR, se tiñó con azul de Coomassi como control.

8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se muestran como el promedio de tres experimentos \pm el error típico. Para calcular dicho estadístico se empleó la siguiente fórmula (Sierra-Bravo, 1991):

$$\sigma_x = \sigma (N)^{-1/2}$$

donde:

σ_x = error típico de la media

σ = desviación estándar

N = número de muestras utilizadas

En el caso de la validación de los controles correspondientes a la evaluación del efecto del tiempo en la viabilidad de los cisticercos se utilizó un análisis de varianza simple (ANOVA) con el programa estadístico OriginPro 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de parámetros de viabilidad

1.1 Motilidad

Para determinar este parámetro se realizó un ensayo para evaluar la motilidad de los cisticercos a distintas temperaturas y se observó que los cisticercos vivos presentaron movimiento poco perceptible a temperatura ambiente mientras que, al exponerlos a una temperatura de 37 °C se observó un aumento considerable en las contracciones musculares de los cisticercos fácilmente distinguibles. Por otro lado, se observó que los cisticercos muertos no presentaban movimiento ni a temperatura ambiente ni al inducirlos mediante un incremento de temperatura. Por lo tanto, en el caso de la viabilidad estimada por motilidad se definió como el porcentaje de cisticercos que presentaron contracciones inducidas después de ser incubados 5 minutos a 37 °C.

1.2 Uso de colorantes de vitales

Para la determinación de este parámetro se utilizó el ensayo de exclusión del colorante azul tripano. Estos ensayos se hicieron incubando cisticercos vivos y muertos en presencia del colorante para determinar el patrón de tinción. En los cisticercos muertos se observó una coloración azul intenso, resistente al lavado, mientras que los cisticercos vivos no se tiñeron (Figura 10). La reactividad de este colorante se basa en el hecho que el cromóforo está cargado negativamente y no reacciona con las células a menos que la membrana se encuentre dañada. En este caso, las células vivas no incorporan el colorante mientras que las células muertas si lo hace por lo que estas últimas se tiñen profusamente. En el caso de los cisticercos de *T. crassiceps*, su tegumento esta compuesto por un sincicio (del Arenal, *et.al.* 1998) por lo que la integridad de éste puede ser un indicador del daño del cisticerco

En todos los casos se observó adicionalmente que los cisticercos vivos presentaron motilidad y no se tiñeron mientras que los cisticercos muertos no era posible inducirles movimiento y se teñían intensamente. Existe una

correspondencia del 100% entre los parámetros de motilidad y tinción (n= 20) por lo que reportamos estos dos parámetros de viabilidad de manera conjunta denominándolo en este trabajo como AT-M (azul tripano – movimiento).

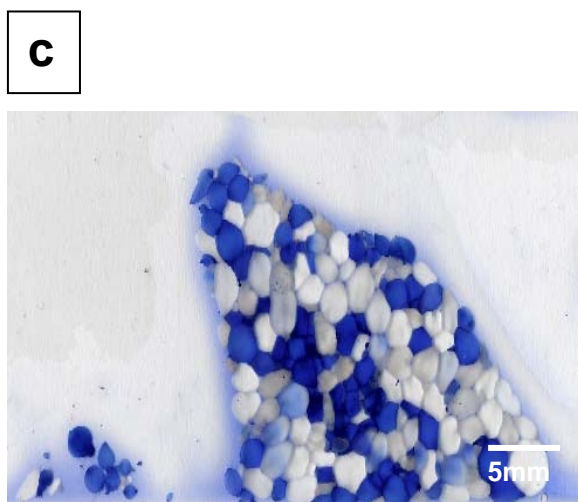
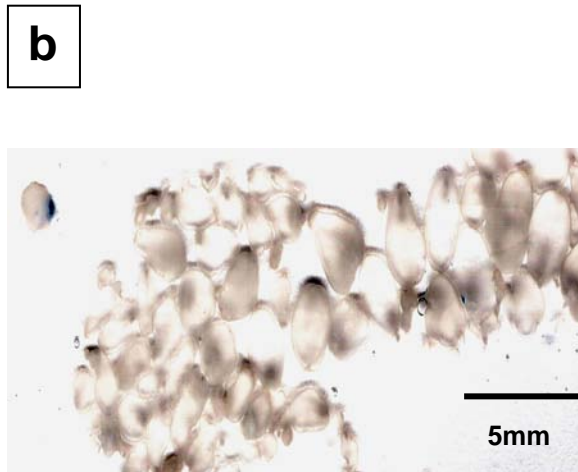
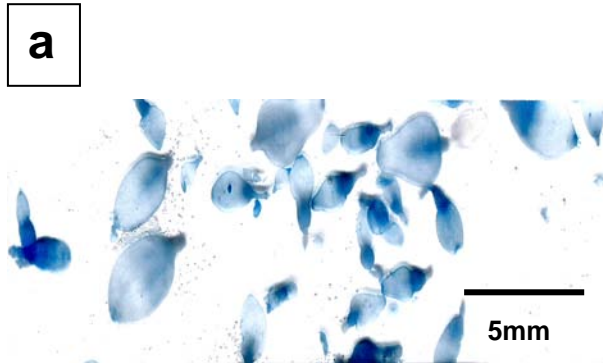


Figura 10. Evaluación de la viabilidad de los cisticercos por colorantes vitales. Se muestra en la imagen: cisticercos muertos (a) y cisticercos vivos (b) después de incubarlos con azul-tripano 0.02%; así como la tinción diferencial entre cisticercos vivos (no teñidos) y muertos (teñidos) se mezclaron para mostrar las diferencias en tinción (c).

1.3 Consumo de oxígeno

Inicialmente, se midió el consumo de oxígeno a un volumen determinado de cisticercos (200, 300 y 400 μL) obteniendo una gran dispersión al realizar distintas mediciones (cuadro 3). Al analizar la composición de la muestra se observaron cisticercos de distintos tamaños por lo que cada muestra variaba en número de cisticercos y los resultados no eran reproducibles. Este problema se solucionó al homogeneizar a la población mediante el tamizaje de los cisticercos con una malla de un poro definido, para eliminar a los cisticercos con un tamaño menor a 3 mm de diámetro y mediante la eliminación manual de cisticercos de gran tamaño. Al realizar dicho procedimiento, se pudo obtener una población más homogénea en tamaño que nos dio valores reproducibles sobre el consumo de oxígeno (cuadro 4), por lo que se determinó usar 200 μL , correspondientes a 22.5 cisticercos en promedio equivalentes a 2.286 ± 0.047 mg de proteína y que tuvieron un consumo de oxígeno de 8.03 ± 0.545 nAt O_2 / min / mg prot. Estos resultados son producto de la medición de 23 ensayos independentientes.

Cuadro 3. Consumo de oxígeno y determinación de proteína de distintos volúmenes de cisticercos sin tamizar.

Volumen (μM)	N° cisticercos	Proteína Total (mg/mL)	Consumo de oxígeno (nAt O_2 / min)	
			Sustratos endógenos	Succinato (15 mM)
200	42.33 ± 2.08	1.474 ± 0.2305	16.42 ± 0.0923	16.48 ± 0.08
300	69.00 ± 13.52	2.333 ± 0.165	45.78 ± 12.47	46.01 ± 12.35
400	67.66 ± 1.52	2.684 ± 0.346	52.74 ± 12.94	46.01 ± 12.35

Cuadro 4. Consumo de oxígeno y determinación de proteína de distintos volúmenes de cisticercos tamizados.

Volumen (μM)	N° cisticercos	Proteína Total (mg/mL)	Consumo de oxígeno (nAt O_2 / min)	
			Sustratos endógenos	Succinato (15 mM)
200	22.5 ± 2.08	2.34 ± 0.324	18.58 ± 2.07	19.26 ± 3.14
300	33 ± 2.64	4.105 ± 0.440	27.42 ± 5.78	29.46 ± 5.86
400	44.66 ± 2.08	5.77 ± 1.425	34.00 ± 6.8	36.49 ± 10.09

2. Mantenimiento en medio de cultivo

Aunque varias especies de *Taenia* son de considerable importancia médica o veterinaria, los intentos para cultivarlas *in vitro* han resultado insatisfactorios. A la fecha, no se han encontrado especies que hayan podido desarrollar la forma adulta a partir del cisticerco en condiciones de laboratorio aunque muchas larvas ciclofilideas sobreviven perfectamente en medios simples (Smyth y McManus, 1989).

Se determinó las condiciones óptimas para lograr la máxima viabilidad de los cisticercos a través del tiempo. Se utilizó el medio RPMI 1640, dado que este es un medio muy utilizado para el mantenimiento y cultivo de diversas líneas celulares en ausencia de suero. La relación utilizada de medio fue de 1:9 (v/v) para asegurar el aporte adecuado de nutrientes a los cisticercos. Adicionalmente a esto se decidió incubarlos en agitación para promover una adecuada aereación del medio y con ello asegurar el suficiente suministro de O₂ a los cisticercos en función de que éstos se sedimentan en un estado de reposo. Finalmente, se decidió utilizar la temperatura de 37 ° C dado que es la temperatura más cercana a la que tienen en el interior de su hospedero. Se hizo también un cambio diario de medio de cultivo, con el fin de evitar el agotamiento de nutrimentos y la acumulación de desechos producto de su metabolismo.

En las condiciones antes mencionadas se observó que es posible mantener cisticercos con 100 % de viabilidad al menos durante 72 horas (fig. 11). Sin embargo, en esta misma figura, observamos que el consumo de oxígeno disminuye gradualmente hasta las 48 hrs. con respecto al consumo medido en cisticercos recién obtenidos. Esto en parte puede deberse al cambio de la presión de oxígeno puesto que en el peritoneo del ratón predominan condiciones microaerófilas (28-40 mm Hg) por lo que el cisticerco debe adecuarse a las condiciones aerobias presentes en el medio de mantenimiento, lo que posiblemente explique porque después de 48 horas el consumo tiende a subir.

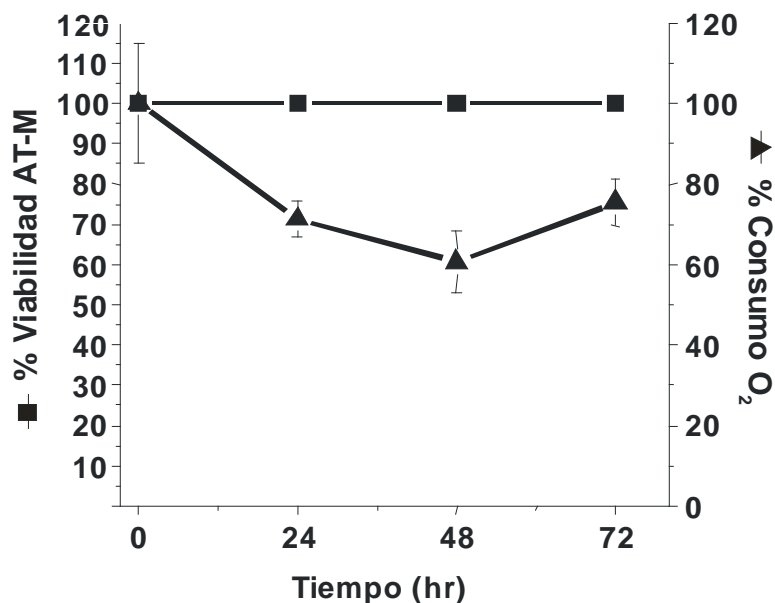


Figura 11. Mantenimiento de los cisticercos en condiciones in vitro. Alícuotas de 200 μ L de cisticercos se mantuvieron en agitación a 37 °C en medio RPMI 1640. La viabilidad AT-M (cuadros) fue determinada a las 0, 24, 48 y 72 hrs. Paralelamente, se determinó el consumo de oxígeno (triángulos). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm error típico de tres experimentos independientes.

3. Efectos del auranofín

Para determinar si el auranofín presentaba algún efecto sobre la viabilidad de los cisticercos se realizó un ensayo inicial en donde se incubaron los cisticercos en presencia de distintas concentraciones de este compuesto (0.1, 1.0 y 10.0 μ M), teniendo en cuenta que la TGR pura se inhibe con auranofín a 10 nM (Rendón, *et.al.* 2004). Los resultados obtenidos indican un efecto letal del 100 % de la población de cisticercos incubados en presencia de 10 μ M de auranofín y que dicho efecto se observa a una concentración mil veces mayor que la reportada para inhibir a la enzima purificada resultados que, están en concordancia con los reportado recientemente para otros parásitos (Kuntz, *et.al.* 2007 ; Bonilla, *et.al.* 2008). En contraste, observamos que los cisticercos incubados con 0.1 y 1.0 de auranofín así como los controles del disolvente utilizado no mostraron efecto en la viabilidad pues en todos los casos la población total se mantenía viva (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del auranofín en la viabilidad de los cisticercos.

Auranofin (μM)	Experimental		Control (DMSO)	
	% viabilidad	% Consumo O_2	% viabilidad	% Consumo O_2
CONTROL	100	100	100	100
0.1	100	105.3	100	77.77
1	100	88.88	100	66.66
10	0	11.11	100	172.22

3.1 Efecto del tiempo

Una vez determinada la concentración que mostró el máximo efecto en viabilidad y consumo de oxígeno de los cisticercos, se procedió a determinar el efecto del tiempo de exposición a 10 μM de AF en las condiciones mencionadas anteriormente. Se observó que el porcentaje de viabilidad de los cisticercos se mantiene con respecto al control durante las dos horas posteriores a haber expuesto a los cisticercos al fármaco, pasado este tiempo, existe un descenso en la viabilidad de los cisticercos el cual es cada vez más acentuado conforme transcurre el tiempo, a las 12 hrs. el 100% se muere (Fig. 12a). El consumo de oxígeno disminuye gradualmente durante las primeras 8 hrs. y, al igual que la viabilidad, el consumo desaparece totalmente a las 12 hrs (Fig. 12b), en tanto que la actividad enzimática de la TGR disminuye en un 90% a las dos hrs. (Fig.12c). Esta diferencia entre la desaparición de la actividad enzimática y la desaparición de los otros parámetros de viabilidad (2 hrs. vs. 12), es posible explicarla si consideramos que los seres vivos cuentan con mecanismos antioxidantes no enzimáticos (REF) que le permitieran al cisticerco contender inicialmente contra el estrés oxidativo generado por la inhibición de la TGR.

Experimentalmente se ha demostrado que los cisticercos, por un lado, generan altas cantidades de peróxido de hidrógeno durante la respiración mientras que, por otro lado, se ha mostrado una baja actividad de CAT y GPx (del Arenal, *et.al.* 2005) por lo que podemos suponer el hecho de que, al

permanecer inhibida una enzima clave en el amortiguamiento redox para estos organismos como la TGR conduzca a los cisticercos a un progresivo acumulamiento de daño oxidativo lo que, eventualmente, los conduce a la muerte. Esto se apoya en la disminución gradual en el consumo de oxígeno, el cual desaparece a las 12 horas de incubación (Fig. 12b). En este tiempo se observa una mortalidad en los cisticercos del 100% y la inhibición total de la TGR.

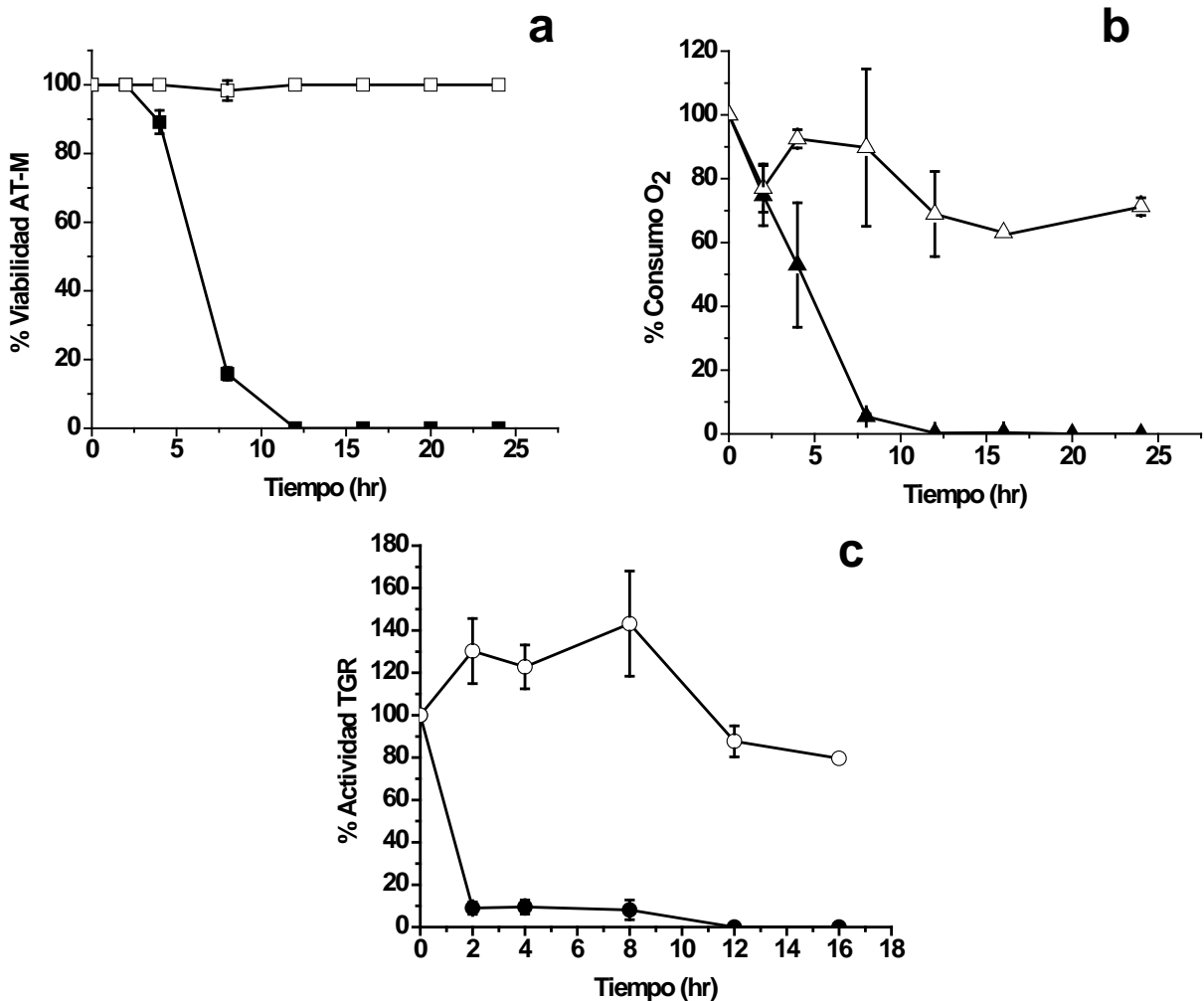


Figura 12. Efecto del auranofín a través del tiempo. Se trató a los cisticercos con una concentración de 10 μ M de auranofín para evaluar el efecto del tiempo en el % de viabilidad AT-M (a), el % de consumo de O₂ (b) y el % de actividad residual de la TGR (c). Los controles de DMSO se muestran con símbolos vacíos. En este caso el 100% representa las variables medidas en ausencia de inhibidores. Los resultados se expresan como porcentajes del control donde el control es el 100% (media \pm error típico ; n=3).

3.2 Efecto de la concentración

Tomando en cuenta que con una concentración de AF 10 μM los cisticercos se mueren a las 12 hrs, y que de acuerdo al experimento inicial mostrado en la tabla 2, resisten 1.0 μM de AF, decidimos probar un rango de concentraciones entre 1.0 a 12 μM . En la figura 13a se observa que el efecto del AF en la viabilidad de los cisticercos de *T. crassiceps* es dosis-dependiente encontrando una constante de letalidad media dentro del rango micromolar (3.8 μM de AF), lo cual concuerda con lo reportado recientemente para *Schistosoma mansoni* (Kuntz, *et.al.* 2007) y *Echinococcus granulosus* (Bonilla, *et.al.* 2008).

El consumo de oxígeno (figura 13b) muestra un patrón similar al de viabilidad aunque en este caso es posible detectar un pequeño consumo de O_2 hasta 12 μM de auranofín. Esto era de esperarse ya que como sabemos las enzimas pueden seguir funcionando por un tiempo después de que no se detecta vida. La actividad de la TGR (figura 13c) no nos fue posible detectarla espectrofotométricamente, más allá de 3.0 μM de auranofín.

La constante de inhibición media de la TGR en condiciones *in vivo* es de 0.6 μM de auranofín. En comparación, se ha reportado que la inhibición de la *tcTGR* en condiciones *in vitro* se encuentra en el rango nanomolar (10 nM, Rendón, 2004). Esto puede explicarse en parte, por la alta afinidad que presenta el auranofín con grupos tioles por lo que del compuesto se pierde al unirse a proteínas de manera inespecífica, principalmente a la albúmina.

Existe en la literatura evidencia experimental que apoya el hecho de que la inhibición de las TrxR (en este caso, la TGR) por auranofín es específica y que dicha inhibición puede tener efectos dañinos para la célula por ejemplo:

- Los complejos derivados de oro (I) como el auranofín son potentes inhibidores de la síntesis de deoxirribonucleótidos (Crooke y Mirabelli, 1983).
- Las distintas isoformas de las TrxR son las selenoproteínas más sensibles a la inhibición por compuestos derivados de oro (I) (Hill, *et.al.* 1997), principalmente el auranofín, en un orden de magnitud tres veces menor que el requerido para inhibir a las GPx (Gromer, *et.al.* 1998; Rigobello, *et.al.* 2004a).
- La administración de los compuestos derivados de oro (I) pueden generar efectos similares a los generados por una deficiencia de selenio y que el uso de dichos compuestos puede generar estrés oxidativo (Smith, *et.al.* 1998) al

alterar el balance redox (por la inhibición de la TrxR) hacia un estado más oxidado (Marzano, *et.al.* 2007) y propiciar con esto la apertura del poro de transición de la mitocondria y la consecuente liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo c (Rigobello, *et.al.* 2002 y 2004b).

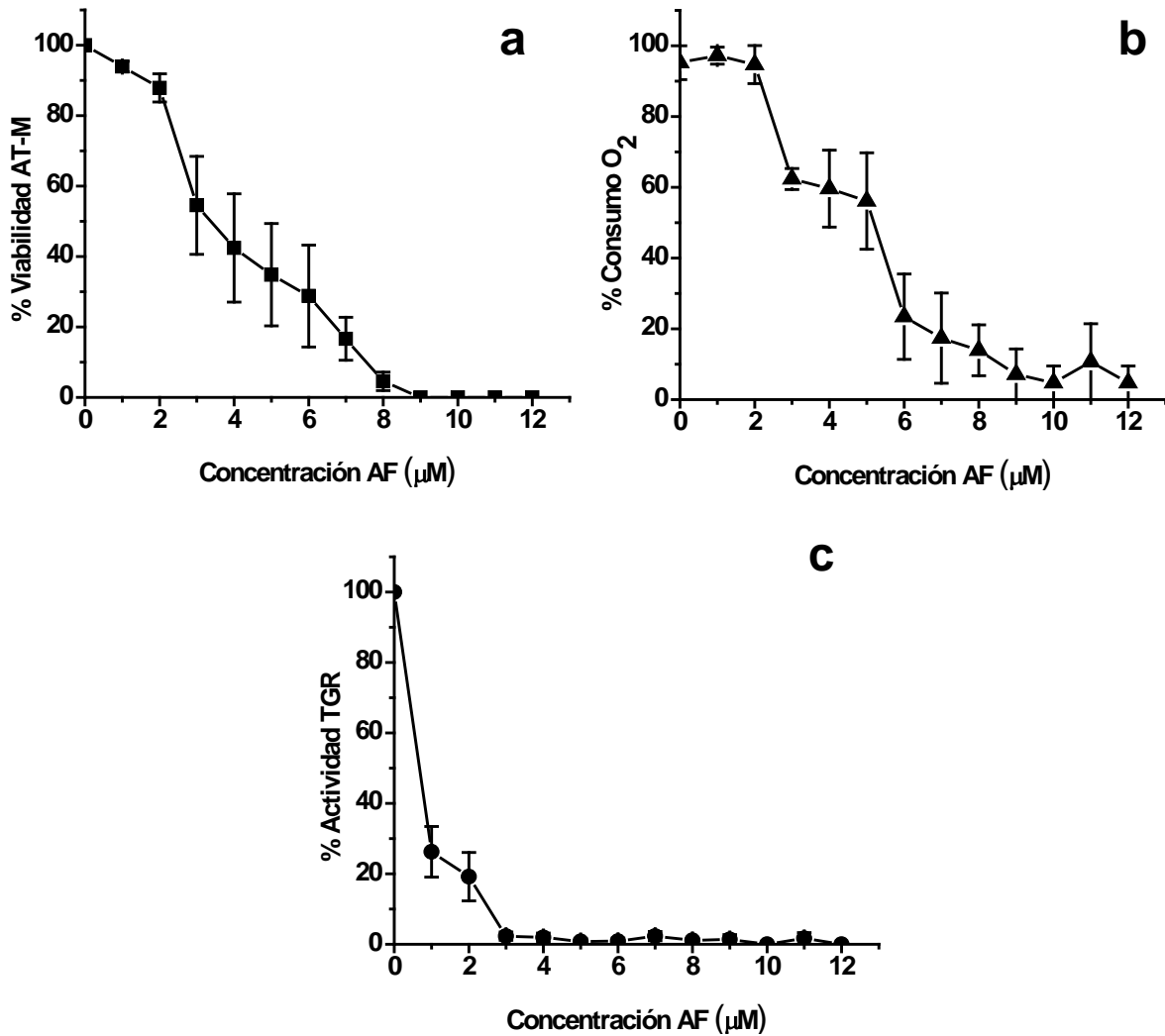


Figura 13. Efecto de la concentración de auranofín. Se incubaron a los cisticercos en concentraciones crecientes de auranofín (1 a 12 μM) durante 13 horas para evaluar el efecto de la concentración en el % de viabilidad AT-M (a), % de consumo de O₂ (b) y el % de la actividad residual de la TGR (c). En este caso el 100% representa las variables medidas en ausencia de inhibidores. Los resultados se expresan como porcentaje del control donde el control es el 100% (media \pm error típico; n=3).

3.3 Validación de los controles.

En este trabajo observamos que los cisticercos control incubados en ausencia de inhibidor (Figura 13) así como aquellos incubados solo con el acarreador (DMSO; Figura 12) no mostraron diferencia significativa en los porcentajes de viabilidad AT-M, consumo de oxígeno y actividad de la TGR; lo que nos permite atribuir los efectos observados al auranofín.

Para corroborar que no existe diferencia significativa entre los distintos controles realizados (sin auranofín al tiempo 0 y a las 13 horas así como el control del disolvente a las 13 horas) se realizó un análisis de varianza y se determinó que no existen diferencias significativas entre los distintos controles con respecto al consumo de oxígeno ($p = 0.62086$) y a la actividad específica de la TGR ($p = 0.24559$) con un nivel de confianza del 95 % (Figura 14). No se realizó el análisis de varianza para la viabilidad AT-M puesto que en todos los casos fue del 100 %.

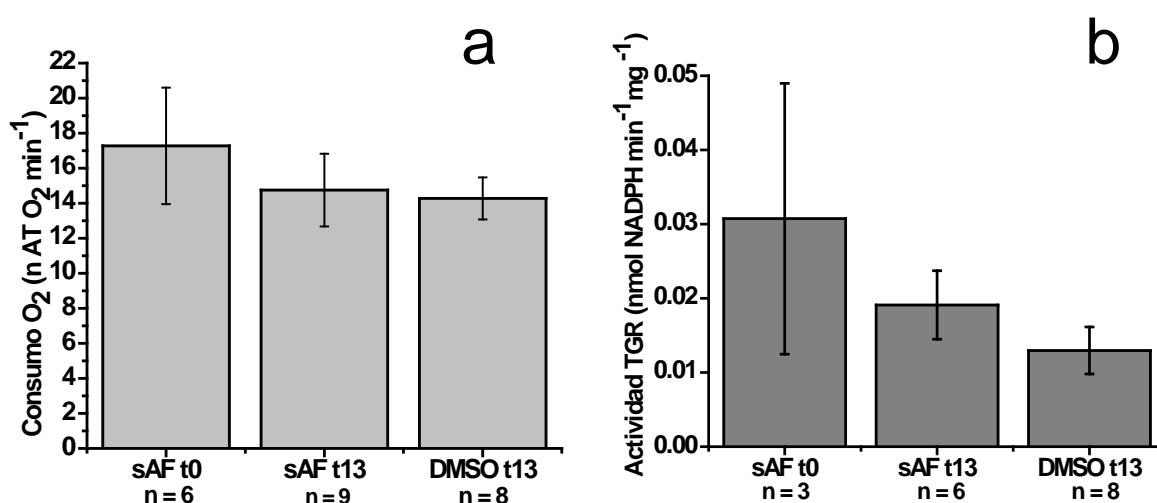


Figura 14. Validación de los controles. Se muestra la representación gráfica de los datos obtenidos en los controles para el consumo de oxígeno (a) y para la actividad específica de la TGR (b). Los resultados se muestran como la media \pm el error típico.

3.4 Efecto en la infectividad

Datos obtenidos en el laboratorio del Dr. Carlos Larralde indican que los cisticercos tienen gran capacidad de regeneración (comunicación personal) por lo que nos interesó saber si el efecto del auranofín en los cisticercos era de tipo citotóxico o citostático para lo cual se utilizaron 22 cisticercos incubados

durante 24 horas con 10 μM auranofín. Dichos cisticercos fueron incubados en ratones para comparar el avance de la infección con respecto a ratones inoculados con cisticercos sin tratar. Nuestros resultados muestran que, en el caso de los cisticercos expuestos a auranofín el efecto es citotóxico (figura 15). Este efecto irreversible es similar al mostrado en otros modelos celulares en los cuales se conserva el efecto letal a pesar de la eliminación de este compuesto (Marzano, *et.al.* 2007). En el caso de los cisticercos, se pierde por completo la capacidad infectiva por lo que se infiere que el daño oxidativo generado por la inhibición de la TGR es tal que la viabilidad y la infectividad del parásito queda comprometida a tal punto que no le es posible recuperarse al eliminar el fármaco. Como consecuencia, los cisticercos tratados no respondieron a la inducción de movimiento, se tiñeron con azul tripano y no presentaron consumo de oxígeno.

En el caso de los cisticercos recuperados de ratones inoculados con cisticercos sin tratar, se encontró el 100 % de viabilidad AT-M por lo que estos cisticercos estaban vivos.

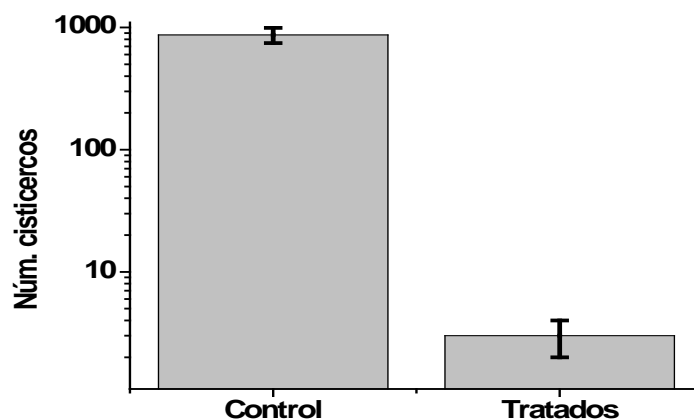


Figura 15. Ensayo de infectividad. Se inocularon ratones tratados con 10 μM de AF por 24 hr y con cisticercos sin tratar para evaluar su capacidad infectiva. En ambos casos se muestra el promedio de cisticercos recuperados, después de 3 meses de haber propiciado la infección. (Ratones tratados, $n=7$; ratones control, $n=6$). Obsérvese que en las ordenadas, la escala es logarítmica.

3.5 Actividad de la TGR.

Adicionalmente a la medición espectrofotométrica de la actividad de la TGR, se hizo un zimograma en un gel de electroforesis nativo.

El MTT es una sal soluble de tretazolio la cual presenta una coloración amarilla en solución por estar oxidado. El MTT es convertido en una molécula de formazan insoluble azul-morado (al reducirse) debido al rompimiento del anillo tetrazolio catalizado por enzimas deshidrogenadas activas (figura 16a).

Este compuesto es utilizado principalmente para la determinación de la actividad enzimática de mitocondrias (Roby, *et.al.* 1994). En este caso lo usamos para determinar el estado de la TGR de cisticercos expuestos a distintas concentraciones de auranofín. Para tal fin, se aprovecho la actividad de deshidrogenada de la TGR la cual cataliza la reducción del MTT, llevándolo a su forma insoluble y precipitándose solo en aquellos lugares donde se llevó a cabo la reacción. Para hacer específica la reacción se empleó como donador de electrones al NADPH, el cual es un sustrato característico de esta enzima.

Los resultados obtenidos indican, por un lado, la alta especificidad y sensibilidad de esta técnica puesto que es capaz de evidenciar la actividad residual de la TGR después de ser incubada con 10 y 12 μM de auranofín (figura 16b, panel superior) al contrario de lo que ocurre con el método espectrofotométrico mediante el cual no es posible detectarla en estas concentraciones. Este resultado sugiere que dicha actividad residual pueda ayudar a los cisticercos a mantener su viabilidad durante su exposición al auranofín hasta el momento que el daño oxidativo acumulado es tal que no les es posible contender con él y comienzan a morir (figura 13).

Por otra parte, se corroboró la inhibición dosis-dependiente de la TGR por auranofín. En este caso, se muestra como disminuye significativamente la actividad de la TGR en los cisticercos tratados con concentraciones crecientes del inhibidor. Se realizó un duplicado del gel utilizado para el zimograma, que fue teñido con azul de Coomassie para evidenciar que la cantidad de proteína que se aplicó, fue equivalente para todos los extractos crudos (80 μg , figura 16b, panel inferior) por lo que podemos deducir que la disminución de la actividad revelada se debe principalmente a la inhibición dosis-dependiente debida al auranofín comparado con nuestros controles utilizados.

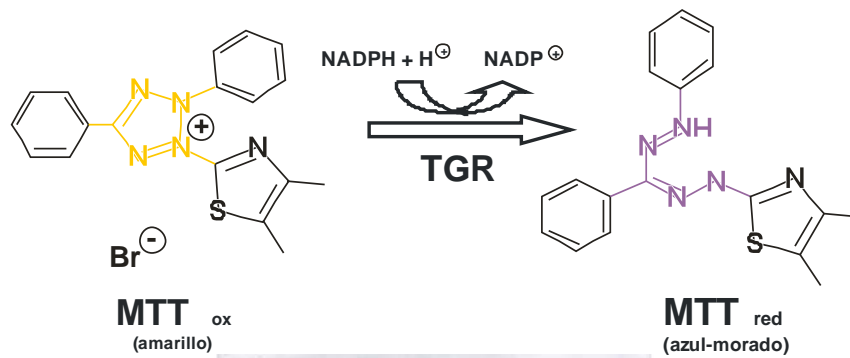
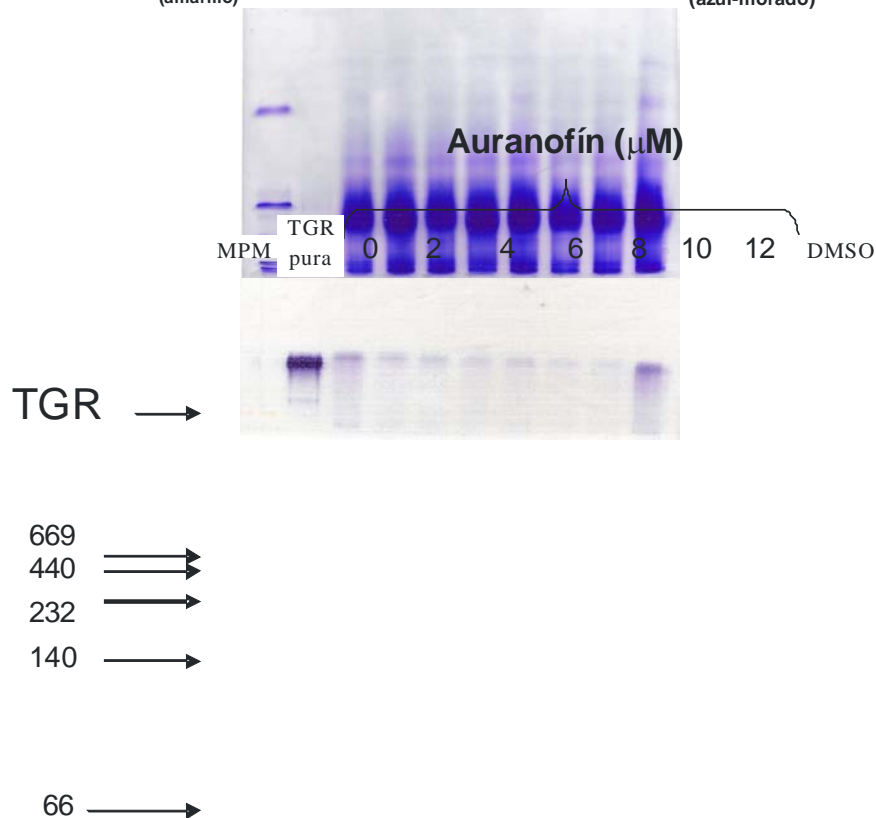
a**b**

Figura 16. Evaluación de la actividad de la TGR en gel. Reacción del MTT que ocurre en presencia de TGR y NADPH, el cual vira su color al ser reducido (**a**); electroforesis no desnaturalizante en poli-acrilamida al 10 % de extractos obtenidos de cisticercos tratados 13 horas con 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μM de auranofín. En la parte superior se muestra el zimograma que muestra la actividad de la TGR, usando como control TGR pura. En la parte inferior se muestra un duplicado del anterior gel teñido con azul de Coomassie. Se corrió el equivalente a 80 μg de proteína en el caso de los extractos crudos y 3.75 μg en el caso de la TGR pura. Adicionalmente, se puso un control de un extracto crudo obtenido de cisticercos incubados con DMSO (**b**).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican, por un lado, que en condiciones de mantenimiento, los diversos parámetros de viabilidad de los cisticercos permanecen constantes mientras que el auranofín presenta un efecto letal dosis-dependiente sobre la viabilidad de los cisticercos y que es capaz de inhibir *in vivo* a la TGR en el cisticerco.

En principio, es necesario hacer notar el hecho de que si bien los resultados de este trabajo sugieren que la inhibición de la TGR en el cisticerco tiene un efecto letal, desconocemos la manera en como se afecte el balance redox en este organismo por lo que es necesario realizar más estudios para caracterizar el estado redox en presencia y ausencia del auranofín para delinear con mayor precisión el papel que juega la TGR en los procesos redox de *Taenia crassiceps*.

Durante la elaboración de este trabajo se publicaron dos artículos en los cuales se muestra este mismo efecto letal del auranofín sobre otros platelmintos parásitos como en el caso de *S. mansoni* (Kuntz, *et.al.* 2007) y en *E. granulossus* (Bonilla, *et.al.* 2008) corroborando nuestra hipótesis sobre la importancia de esta enzima para el mantenimiento de la homeostasis redox en el caso de los platelmintos. Por esta razón, consideramos que la TGR es un blanco atractivo para el diseño de fármacos contra estos organismos parásitos, en nuestro caso contra el género *Taenia*, ya que esta enzima parece ser la única que lleva a cabo la función de reductasa de los sistemas dependientes de tiorredoxina y glutatión en *T. crassiceps* (Rendón, *et.al.* 2004 y Guevara-Flores, *et.al.* en proceso de publicación) y en *T. solium* (Proyecto Genoma *Taenia solium*, comunicación personal) ; a diferencia de su hospedero mamífero el cual posee ambas reductasas (TrxR y GR) de manera independiente, además de la TGR adicionalmente a la presencia de otras enzimas antioxidantes como catalasa y peroxidasas entre otras.

CONCLUSIONES

Es posible mantener a los cisticercos *in vitro* hasta, por lo menos, 72 hrs.

La motilidad, la tinción por azul tripano, el consumo de oxígeno y la infectividad son parámetros confiables para determinar la viabilidad de los cisticercos.

El auranofín tiene un efecto letal dosis-dependiente en los cisticercos de *Taenia crassiceps*

Los datos de actividad medida por espectroscopia y zimograma demuestran que la TGR se inhibe *in vivo* a concentración de 2 μM de auranofín, una concentración 200 veces mayor que la empleada para inhibir a la enzima en condiciones *in vitro* (Rendón, *et.al.* 2004).

La TGR es una enzima muy importante en el mantenimiento de la homeostasis redox y en la viabilidad del cisticerco, por lo que esta enzima es vital para este organismo.

Debido a la alta identidad entre la TGR de distintos céstodos y a su cercanía filogenética, es posible que el auranofín tenga un efecto letal en *T. solium* y posiblemente en otros platelmintos parásitos de importancia médica y veterinaria en donde se haya reportado únicamente la presencia de esta enzima.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ABBAS, A.K., A.H. LICHTMAN y J.S. POBER. 2002. Inmunología celular y molecular. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid, España, pp 564
- 2.- AGORIO, A., C. CHALAR, S. CARDOZO, y G. SALINAS. 2003. Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase. The Journal of Biological Chemistry **278(15)**:12920-12928.
- 3.- ALGER, H.M., y D.L. WILLIAMS. 2002. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. Molecular & Biochemical Parasitology **121**: 129-139.
- 4.- ALLMANG, C., y A. KROL. 2006. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. Biochimie **88**: 1561-1571.
- 5.- ANDERSON, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biological Interactions **111(112)**: 1-14.
- 6.- ANDRICOPULO, A.D., M.B. AKOACHERE, R. KROGH, C. NICKEL, M.J. MCLEISH, G.L. KENYON, L.D. ARSCOTT, C.H. WILLIAMS JR., E. DAVIOUD-CHARVET, y K. BECKER. 2006. Specific inhibitors of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductasa as potential antimalarian agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **16**: 2283-2292.
- 7.- ANESTÄL, K., S. PRAST-NIELSEN, N. CENAS, y E.S.J. ARNÉR. 2008. Cell death by SecTRAPs: thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells. PLoS ONE **3**:4 e1846.
- 8.- ANGELUCCI, F., A.E. MIELE, G. BOUMIS, D. DIMASTROGIOVANNI, M. BRUNORI, y A. BELLELLI. 2008. Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: the structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. Proteins **72(3)**: 936-945.
- 9.- ARNÉR, E.S.J., y A. HOLMGREN. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. European Journal of Biochemistry **267**: 6102-6109.
- 10.- ARNÉR, E.S.J., y A. HOLMGREN. 2006. The thioredoxin system in cancer. Seminars in Cancer Biology **16**: 420-426.
- 11.- BAYNES, J.W., y M.H. DOMINICZAK. 2006. *Bioquímica médica*. Segunda edición. Elsevier, Madrid, España, p. 505-515.
- 12.- BEDARD, K., B. LARDY, y K.H. KRAUSE. 2007. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. Biochimie **89**: 1107-1112.

- 13.- BERNDT, C., C.H. LILLING, y A. HOLMGREN. 2007. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **292**: H-1227-H-1236.
- 14.- BERNDT, C., C.H. LILLING, y A. HOLMGREN. 2008. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**: 641-650.
- 15.- BLOCKA, K. 1983. Auranofin versus injectable gold: comparison of pharmacokinetic properties. *The American Journal of Medicine* **30**: 114-122.
- 16.- BLODGETT Jr., R.C. 1983. Auranofin: experience to date. *The American Journal of Medicine* **30**: 86-89.
- 17.- BLOKHINA, O., E. VIROLAINEN, y K.V. FAGERSTEDT. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.
- 18.- BONILLA, M., A. DENICOLA, S.V. NOVOSELOV, A.A. TURANOV, A. PROTASIO, D. IZMENDI, V.N. GLADYSHEV, y G. SALINAS. 2008. Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *The Journal of Biological Chemistry* **283(26)**: 17898-17907.
- 19.- BROWN, D.M., J.A. UPCROFT, M.R. EDWARDS, y P. UPCROFT. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *International Journal of Parasitology* **28**: 149-164.
- 20.- BRUSCA, R. y G. BRUSCA. 2003. Invertebrates. Segunda edición. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts, Estados Unidos; pp. 285-318.
- 21.- CARDONA, A.E., y J.M. TEALE. 2002. Animal models of *Taenia solium* cysticercosis: role in understanding host-parasite interactions. *en Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. Singh, G., y S. Prabhakar (eds.). CABI Publishing. New York, US pp. 35-45.
- 22.- CASTELLANOS-GONZÁLEZ, A., L. JIMÉNEZ, y A. LANDA. 2002. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology* **32**: 1175-1182.
- 23.- CKOOKE, S.T., y C.K. MIRABELLI. 1983. Molecular mechanism of action of Auranofin and other gold complexes as related to their biologic activities. *The American Journal of Medicine* **30**: 109-113
- 24.- DAS, K.C. 2004. Thioredoxin system in premature and newborn biology. *Antioxidants & Redox Signaling* **6(1)**: 177-184.

- 25.- DAS, K.C., y C.W. WHITE. 2002. Redox systems of the cell: possible links and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* **99(15)**: 9617-9618.
- 26.- del ARENAL, I.P., A. CEA-BONILLA, R. MORENO-SÁNCHEZ, y J.E. ESCAMILLA. 1998. A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. *Journal of Parasitology* **84(3)**: 461-468.
- 27.- del ARENAL, I.P., M.E. RUBIO, J. RAMÍREZ, J.L. RENDÓN, y J.E. ESCAMILLA. 2005. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. *Parasitology International* **54**: 185-193.
28. DIPLOCK, A., J.L. CHARLEUX, G. CROZIER-WILLI, F.J. KOK, C. RICE-EVANS, M. ROBERFROID, W. STAHL, y J. VIÑA-RIBES. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* **80 Suppl. 1**: S77-S112.
- 29.- DRÖGUE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**: 47-95.
- 30.- FILIPPIN, L.I., R. VERCELINO, N.P. MARRONI, y R.M. XAVIER. 2008. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* **152**: 415-422.
- 31.- FINKELSTEIN, A.E., D.T. WALZ, V. BATISTA, M. MIZRAJI, F. ROISMAN y A. MISHER. 1976. Auranofin: new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* **35**: 251-257.
- 32.- FLISSER, A., D. CORREA, y C.A.W. EVANS. 2002. *Taenia solium* Cysticercosis : new and revisited immunological aspects. *en Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. SINGH, G. y S. PRABHAKAR (eds.). CABI Publishing. New York, US, pp.15-24.
- 33.- GARRIDO, E.O., y C.M. GRANT. 2002. Role of thioredoxin in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular Microbiology* **43(4)**: 993-1003.
- 34.- GELHAYE, E., N. ROUHIER, N. NAVROT, y J.P. JACQUOT. 2005. The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**: 24-35.
- 35.- GROMER, S., L.D. ARSCOTT, C.H. WILLIAMS Jr., R.H. SCHIRMER, y K. BECKER. 1998. Human placental thioredoxin reductase: isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds. *The Journal of Biological Chemistry* **273(32)**: 20096-20101.
- 36.- GROMER, S., J.K. EUBEL, L. LEE, y J. JACOB. 2005. Human selenoproteins at a glance. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**: 2414-2437.

- 37.- GUEVARA- FLORES, A. 2004. Caracterización parcial del sistema de glutatión y de tioredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, pag. 31.
- 38.- GUEZZI, P. 2005. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochemical Society Transactions* **33(6)**: 1378-1381.
- 39.- HADDAD, J.J. 2004. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316**: 969-977.
- 40.- HALVEY, P.J., W.H. WATSON, J.M. HANSEN, Y.M. GO, A. SAMALI, y D.P. JONES. 2005. Compartmental oxidation of thiol-disulphide redox couples during epidermal growth factor signaling. *Biochemical Journal* **386**: 215-219.
- 41.- HANSBERG, W. 2008. *El dióxígeno y sus especies reactivas. en Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. Konigsberg, M. (editor) El manual moderno, México, México, p. 26-46.
- 42.- HE, M., J. CAI, Y.M. GO, J.M. JOHNSON, W.D. MARTIN, J. M. HANSEN, y D.P. JONES. 2008. Identification of thioredoxin-2 as a regulator of the mitochondrial permeability transition. *Toxicological Sciences* **105(1)**: 44-50.
- 43.- HILL, K.E., G.W. McCOLLUM, M.E. BOEGLIN, y R.F. BURK. 1997. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**: 293-295.
- 44.- HITCHON, C.A., y H.S. EL-GABALAWY. 2004. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* **6(6)**: 265-278.
- 45.- HUBERMAN, A. 1995. *Biología de los radicales libres. en Bioquímica. Segunda edición*. DIAZ-ZAGOYA, J.C. Y J.J. HICKS-GÓMEZ (eds.). Mc-Graw Hill- Interamericana, México, México, pp. 715-723.
- 46.- ITO, A., M. NAKARO, M. OKAMOTO, Y. SAKO, y H. YAMASAKI. 2002. Mitochondrial DNA of *Taenia solium*: from basic to applied science. *en Taenia solium cysticercosis: from basic to clinical science*. Singh, G., y S. Prabhakar. (eds.). CABI Publishing, New York, US, p. 48.
- 47.- ITOKAZU, M., T. MATSUNAGA, y Y. OSHITA. 1995. Efficacy and safety of Auranofin in patients with active early rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics* **17(1)**: 60-73.
- 48.- JEŽEK, P., y L. HLAVATÁ. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 2478-2503.
- 49.- JOHANSSON, L., G. GAFVELIN, y E.S.J. ARNÉR. 2005. Selenocysteine in proteins – properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta* **1726**: 1-13.

- 50.- KAKKAR, P., y B.K. SINGH. 2007. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Molecular and Cellular Biochemistry* **305**: 235-253.
- 51.- KASSAL, T. 1999. *Veterinary Helminthology*. Butterworth Heinmann. Londres, U.K., pp.27-42.
- 52.- KERN, R., A. MALKI, A. HOLMGREN, y G. RICHARME. 2003. Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal* **371**: 965-972.
- 53.- KRAUTH-SIEGEL, R., y O. INHOFF. 2003. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitology Research* **90**: S77-S85.
- 54.- KRNAJSKI, Z., T.W. GILBERGER, R.D. WALTER, y S. MÜLLER. 2001. The malarian parasite *Plasmodium falciparum* possesses a functional thioredoxin system. *Molecular & Biochemical Parasitology* **112**: 219-228.
- 55.- KRYUKOV, G.V., S. CASTELLANO, S.V. NOVOSELOV, A.V. LOBANOV, O. ZEHTAB, R. GUIGÓ, Y V.N. GLADYSHEV. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**: 1439-1443.
- 56.- KUNTZ, A.N., E. DAVIOUD-CHARVET, A.A. SAYED, L.L. CALIFF, J. DESSOLIN, E.S.J. ARNÉR, y D.L. WILLIAMS. 2007. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Medicine* **4(6)**: e206.
- 57.- LACEY, B.M., y R.J. HONDAL. 2006. Characterization of mitochondrial thioredoxin reductase from *C. elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**: 629-636.
- 58.- LEE, R.L., J. WESTENDORF, y M.R. GOLD. 2007. Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4. *Journal of Cell Communication and Signaling* **1**: 33-43.
- 59.- LOWRY, O., N. ROSENBROUGH, A. LEWIS-FARR y R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- 60.- MADELON, M.M., H. NAKAMURA, S. GRINGHUIS, T. OKAMOTO, S. YOSHIDA, F. KULLMAN, S. LECHNER, E.A.M. Van der VOORT, A. LEOW, J. VERSENDAAL, U. MULLER-LADNER, J. YODOI, P.P. TAK, F.C. BREEDVELD y C.L. VERWEIJ. 1999. Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **42(11)**: 2430-2439.
- 61.- MALPICA, R., B. FRANCO, C. RODRIGUEZ, O. KWON, y D. GEORGELLIS. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* **101(36)**: 13318-13323.

- 62.- MANDIGAN, M.T. , J.M. MARTINKO y J. PARKER. 2004. *Brock: Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson-Prentice Hall, Madrid, España, pp. 164-165, 322-338.
- 63.- MARKWELL, M.A.K., S.M. HAAS, L.L. BIERBER, y N.E. TOLBERT. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* **87**: 206-210.
- 64.- MARZANO, C., V. GANDIN, A. FOLDA, G. SCUTARI, A. BINDOLI, y M.P. RIGOBELLO. 2007. Inhibition of thioredoxin reductase by Auranofin apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine* **42**: 872-881.
- 65.- MISSIRLIS, F., J.K. ULSCHMID, M. HIROSAWA-TAKAMORI, S. GRÖNKE, U. SCHÄFER, K. BECKER, J.P. PHILLIPS, y H. JÄCKLE. 2002. Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability. *The Journal of Biological Chemistry* **277(13)**: 11521-11526.
- 66.- MÜLLER, S., E. LIEBAU, R.D. WALTER, y R.L. KRAUTH-SIEGEL. 2003. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *TRENDS in Parasitology* **19(7)**: 320-328.
- 67.- MUSTACICH, D., y G. POWIS. 2000. Thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal* **346**: 1-8.
- 68.- NARVARTE, I., A.E. DAMDIMOPOLUS, y G. SPYROU. 2004. Human mitochondrial thioredoxin reductase reduces cytochrome *c* and confers resistance to Complex III inhibition. *Free Radical Biology & Medicine* **36(10)**: 1270-1278.
- 69.- NELSON, D.L., y M.M. COX. 2008 *Lehninger: Principles of biochemistry*. Quinta edición. W.H. Freeman and Company, New York, US, pp.29-36.
- 70.- NEWTON, G.L., y R.C. FAHEY. 2002. Mycothiol biochemistry. *Archives of Microbiology* **178**: 388-394.
- 71.- NKABYO, Y.S., T.R. ZIEGLER, L.H. GU, W.H. WATSON, y D.P.JONES. 2002. Glutathione and thioredoxin during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**: G1352-G1359.
- 72.- NORDBERG, J., y E.S. ARNÉR. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin reductase. *Free Radical Biology & Medicine* **31(11)**: 1287-1312.
- 73.- OELZE, M.L., A. KANDBINDER, y K.J. DIETZ. 2008. Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**: 1261-1272.

- 74.- OTT, M., V. GOGVADZE, S. ORRENIUS, y B. ZHIVOTOVSKY. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913-922.
- 75.- PAPP, L.V., J. LU, A. HOLMGREN, y K.K. KHANNA. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling* **9(7)**: 776-793.
- 76.- PAWLOSKI, Z.S. 2002. *Taenia solium*: Basic biology and transmission. *en Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. SINGH, G. y S. PRABHAKAR (eds.). CABI Publishing. New York, US, pp. 9-10.
- 77.- PECHENICK, J.A. 2000. *Biology of the invertebrates*. Cuarta edición. McGraw Hill, New York, US, pp.143-167.
- 78.- RAHMAN, I., S.K. BISWAS, y A. KODE. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology* **533**: 222-239.
- 79.- RENDÓN, J.L., I.P. DEL ARENAL, A. GUEVARA-FLORES, A. URIBE, A. PLANCARTE, y G. MENDOZA-HERNÁNDEZ. 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular & Biochemical Parasitology* **133**: 61-69.
- 80.- RENDÓN, J.L. y O. JUÁREZ. 2008. Glutathione reductase: structural, catalytic and functional aspects. *en Advances in protein physical chemistry*. GARCÍA-HERNÁNDEZ, E., Y A. FERNÁNDEZ-VELASCO. (eds.). Transworld Research Network. Kerala, India, pp. 317-349.
- 81.- RHEE, S.G., S.W. KANG, W. JEONG, T.S. CHANG, K.S. YANG, Y H.A. WOO. 2005. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 183-189.
- 82.- RIGOBELLO, M.P., G. SCUTARI, R. BOSCOLO, y A. BINDOLI. 2002. Induction of mitochondrial permeability transition by Auranofin, a gold(I)-phosphine derivate. *British Journal of Pharmacology* **136**: 1162-1168.
- 83.- RIGOBELLO, M.P., G. SCUTARI, A. FOLDA, y A. BINDOLI. 2004a. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochromo c. *Biochemical Pharmacology* **67**: 689-696.
- 84.- RIGOBELLO, M.J., L. MESSORI, G. MARCON, M.A. CINELLU, M. BRAGADIN, A. FOLDA, G. SCUTARI, y A. BINDOLI. 2004b. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**: 1634-1641.

- 85.- ROBY, K.F., G.P. HAMLIN, M.J. SOARES, y J.S. HUNT. 1994. Differential responses of phenotypically distinct rat trophoblast cell lines to MHC class I antigen-inducing cytokines. *Placenta* **15**: 577-590.
- 86.- RUGEIRO, E., e I. NOEMI. 1999. Teniasis. *en* *Parasitología Médica*. ATIAS, A. (ed.). Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago, Chile pp 194-200.
- 87.- SAEED, I., C. MADDOX-HYTTEL, J. MONRAD, Y C.M.O. KAPEL. 2006. Helminthes of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology* **139**: 168-179.
- 88.- SALINAS, G., M.E. SELKIRK, C. CHALAR, R.M. MIZELS, y C. FERNÁNDEZ. 2004. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *TRENDS in Parasitology* **20(7)**: 340-346.
- 89.- SARTI, E. 2002. Epidemiology of *Taenia solium* Taeniasis and Cysticercosis in Mexico. *en* *Taenia solium cysticercosis: from basic to clinical science*. SINGH, G., y S. PRABHAKAR (eds.). CABI Publishing. New York, US, pp. 83-90.
- 90.- SHARMA, M., S. KHANNA, G. BULUSU, y A. MITRA. 2008. Comparative modeling of thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: a multifunctional target for antischistosomal therapy. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **27**: 665-675.
- 91.- SIERRA-BRAVO, R. 1991. Diccionario práctico de estadística y técnicas de investigación científica. Editorial Paraninfo, Madrid, España; pag. 230
- 92.- SIGLER, J.W. 1983. Parenteral gold in the treatment of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine* **30**: 59-62.
- 93.- SMALL-HOWARD, A.L., y M.J. BERRY. 2005. Unique features of selenocysteine incorporation function within the context of general eukaryotic translational process. *Biochemical Society Transactions* **33(6)**: 1493-1497.
- 94.- SMALL-HOWARD, A., N. MOROZOVA, Z. STOYTICHEVA, E.P. FORRY, J.B. MANSELL, J.W. HARNEY, B.A. CARLSON, X.M. XU, D.L. HATFIELD, y M.J. BERRY. 2006. Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 2337-2346.
- 95.- SMITH, A.D., C.A. GUIDRY, V.C. MORRIS, y O.A. LEVANDER. 1998. Aurothioglucose inhibits murine thioredoxin reductase activity in vivo. *The Journal of Nutrition* **129**: 194-198.
- 96.- SMYTH, J.D., y D.P. McMANUS. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Cambridge, UK pp. 5-21.
- 97.- SU, D., S.V. NOVOSELOV, Q.A. SUN, M. E. MOUSTAFA, Y. ZHOU, R. OKO, D.L. HATFIELD, y V.N. GLADYSHEV. 2005. Mammalian selenoprotein

thioredoxin-glutathione reductasa: roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *The Journal of Biological Chemistry* **280(28)**: 26491-26498.

98.- SUN, Q.A., L. KIRNARSKY, S. SHERMAN, y V.N. GLADYSHEV. 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* **98(7)**: 3673-3678.

99.- SUN, Q.A., D. SU, S.V. NOVOSELOV, B.A. CARLSON, D.L. HATFIELD, y V.N. GLADYSHEV. 2005. Reaction mechanism and regulation of mammalian thioredoxin/glutathione reductasa. *Biochemistry* **44**: 14528-14537.

100.- TROTTER, E.W., y C.M. GRANT. 2003. Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *European Molecular Biology Organization* **4(2)**: 184-188.

101.- VALKO, M., D. LEIBFRITZ, J. MONCOL, M.T.D. CRONIN, M. MAZUR, y J. TELSER. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**: 44-84.

102.- WANG, P.F., J. MARCINKEVICIENE, C.H. WILLIAMS Jr., y J.S. BLANCHARD. 1998. Thioredoxin reductasa-thioredoxin fusion enzyme from *Mycobacterium leprae*: comparison with the separately expressed thioredoxin reductasa. *Biochemistry*. **37(46)**: 16378-16389.

103- WATSON, W.H., X. YANG, Y.E. CHOI, D.P. JONES, y J.P. KEHRER. 2004. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicological sciences* **78**: 3-14.

104.- WINDLE, H.J., A. FOX, D.N. EIDHIN, y D. KELLEHER. 2000. The thioredoxin system in *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry* **275(7)**: 5081-5089.

105.- WINTERBOURN, C.C., y M.B. HAMPTON. 2008a. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **45**: 549-561.

106.- WINTERBOURN, C.C. 2008b. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* **4(5)**: 278-286.

107.- WINYARD, P.G., C.J. MOODY, y C. JACOB. 2005. Oxidative activation of antioxidant defense. *TRENDS in Biochemical Sciences* **30(8)**: 453-461.

108.- WITTE, A.B., K. ANESTAL, E. JERREMALM, H. EHRSSON, y E.S.J. ARNÉR. 2005. Inhibition of thioredoxin reductasa but not of glutathione reductasa by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds. *Free Radicals Biology & Medicine* **39**: 696-703.

109.- WOLIN, M.S., M. AHMAD, y S.A. GUPTA. 2005. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanism: basic concepts, current

controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology **289**: L-159- L-173.

110.- ZHONG, L., y A. HOLMGREN. 2000. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductasa revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. The Journal of Biological Biochemistry **275(24)**: 18121-18128.