



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Facultad de Medicina**

**EFFECTO DEL AURANOFÍN EN LOS PROCESOS  
REDOX DE PLATELMINTOS PARÁSITOS**

**TESIS**

**(MODALIDAD POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ORIENTACIÓN EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**BIÓL. JOSÉ DE JESÚS MARTÍNEZ GONZÁLEZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA**

**DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ**

**MÉXICO, D.F**

**AGOSTO, 2011**



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.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de mayo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **MARTÍNEZ GONZÁLEZ JOSÉ DE JESÚS** con número de cuenta **99216580** con la tesis titulada **"EFECTO DEL AURANOFÍN EN EL ESTADO REDOX DE PLATELMINTOS PARASITOS. (MODALIDAD ARTÍCULO)"**, realizada bajo la dirección de la :  
**DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA**

|             |      |                                    |
|-------------|------|------------------------------------|
| Presidente: | DR.  | JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ  |
| Vocal:      | DR.  | JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI              |
| Secretario: | DRA. | EDDA LIDIA SCIUTTO CONDE           |
| Suplente:   | DRA. | ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ |
| Suplente:   | DRA. | EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA         |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 01de julio de 2011

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido (Beca de maestría).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo otorgado al proyecto PAPIIT IN-220710-3.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Dra. Irene Patricia del Arenal Mena

## APOYO TÉCNICO

Agradezco a la Técnico Académico Asociada Dra. Georgina Álvarez Fernández por su ayuda en el desarrollo de la técnica de detección de la actividad de la TGR en gel.

Agradezco al M. en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez y a la candidata a Dra. Deyamira Matus Mares su asesoría en el establecimiento de la técnica para la cuantificación de glutatión.

Agradezco a la Dra. Kaethe Willms Manning la donación de diversas líneas de la cepa WFU del cisticerco de *Taenia crassiceps* así como al Técnico Académico Asociado MVZ José Agustín Jiménez Rodríguez su apoyo en el establecimiento del protocolo para la obtención del estado adulto de *T. crassiceps*.

Agradezco a la Técnico Académico Asociado Biól. Luz Gisela Martínez García su apoyo en el tratamiento de los hámsteres y en la implementación de la Técnica Faust.

Agradezco a mis sinodales la revisión crítica de mi manuscrito así como sus comentarios y propuestas.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

*A Dios;* quien siempre me ha dado no lo que quiero (ni cuanto quiero) sino solo lo que necesito.

*A mis hermanos y a mi familia;* pues ustedes son la fuerza que me impulsa para luchar y tratar de ser mejor cada día. Siento no estar tan cerca como quisiera pero siempre están presentes en mi corazón.

*A J.A.;* por apoyarme y estar ahí durante toda esta etapa. Luchemos hasta donde Dios quiera...

*A todos mis amigos;* sé que no los frecuento como quisiera pero es alentador saber que siempre están ahí. Yo los llamo...

*A la Dra. Patricia del Arenal y al Dr. Alberto Guevara;* quienes me han ayudado y apoyado en todos los aspectos que es posible ayudar a alguien. Hacemos un buen equipo.

*A los alumnos de licenciatura Miguel Cuéllar y Omar Huerta;* por permitirme transmitir algo de lo poco que se me ha dado y participar en su formación como médicos. Espero no haber sido tan mal guía. Hay que ir por unas pizzas...

*A mis amigos (y uno que otro conocido) de la Tuna del Centro Universitario Cultural.* Luchando es posible superar la adversidad. No vean al pasado ni intenten regresar a lo que fue sino den la cara al sol y contemplen todo aquello que puede ser. Es su momento, es su Tuna... no lo olviden.

## **PENSAMIENTOS**

### **SUEÑO IMPOSIBLE**

Con fe lo imposible soñar,  
al mal combatir sin temor,  
triunfar sobre el miedo invencible;  
en pie, soportar el dolor.

Amar la pureza sin par,  
buscar la verdad del error,  
vivir con los brazos abiertos;  
creer en un mundo mejor.

Es mi ideal,  
la estrella alcanzar  
no importa cuán lejos  
se pueda encontrar,  
luchar por el bien sin dudar ni temer  
y dispuesto al infierno llegar si lo dicta el deber.

Y yo sé,  
que si logro ser fiel  
a mi sueño ideal,  
estará mi alma en paz al llegar  
de mi vida el final.

Será este mundo mejor,  
si hubo quien despreciando el dolor,  
combatió hasta el último aliento.

Con fe lo imposible soñar  
y la estrella alcanzar...

DON QUIJOTE

EL HOMBRE DE LA MANCHA (MUSICAL)

Paciencia y fe...

ABUELA

EN LAS ALTURAS (MUSICAL)

| <b>Contenido</b>   | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| ÍNDICE   | 1             |
| NOTA INTRODUCTORIA   | 4             |
| LISTA DE ABREVIATURAS  | 5             |
| LISTA DE FIGURAS   | 8             |
| RESUMEN  | 9             |
| ABSTRACT   | 10            |
| INTRODUCCIÓN   | 11            |
| 1. La homeostasis redox en los sistemas biológicos   | 11            |
| 1.1 El sistema dependiente de GSH  | 13            |
| 1.2 El sistema dependiente de la Trx   | 14            |
| 1.3 Diferencias entre los sistemas dependientes de GSH y Trx   | 15            |
| 1.4 El sistema de la TGR   | 16            |
| 2. Selenoproteínas   | 19            |
| 3. Auranofín   | 20            |
| 4. <i>Taenia crassiceps</i> como modelo de estudio de biología redox. Uso de cepas para la obtención de los modelos experimentales de cisticercosis y teniasis | 21            |
| 4.1 Platelminetos  | 21            |
| 4.2 Los céstodos   | 22            |
| 4.3 Biología de <i>Taenia crassiceps</i>   | 22            |

|  |    |
|--|----|
| ANTECEDENTES   | 28 |
| HIPÓTESIS  | 29 |
| OBJETIVOS  | 29 |
| 1. General   | 29 |
| 2. Particulares  | 29 |
| ARTÍCULO   |    |
| DISCUSIÓN  | 32 |
| 1. Mecanismo de inhibición del auranofín sobre selenoproteínas   | 32 |
| 2. El auranofín tiene un efecto letal dosis y tiempo - dependiente en los cisticercos de <i>T. crassiceps</i>  | 33 |
| 3. El auranofín inhibe <i>in vivo</i> a la TGR   | 35 |
| 4. El auranofín disminuye la concentración de GSH total en el cisticerco y disminuye la relación GSH / GSSG  | 36 |
| 5. El auranofín puede alterar la homeostasis redox en el cisticerco debido a la inhibición de la TGR   | 40 |
| 6. El auranofín como antihelmíntico  | 41 |
| 7. El auranofín tiene un posible efecto en el modelo experimental de cisticercosis ocasionado por la forma larval (cisticerco) de <i>T. crassiceps</i> | 43 |
| 8. El auranofín tiene un posible efecto en el modelo experimental de cisticercosis ocasionado por la forma adulta (tenia) de <i>T. crassiceps</i>      | 43 |
| RESUMEN DE RESULTADOS  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| CONCLUSIÓN   | 46 |
| PERSPECTIVAS   | 47 |
| BIBLIOGRAFÍA   | 48 |
| ANEXO I. Protocolo para la cuantificación de glutatión total y disulfuro de glutatión por el método de Akerboom modificado.  | 57 |
| ANEXO II. Protocolo para el tratamiento de organismos parasitados con la forma larval y adulta de <i>Taenia crassiceps</i> . | 59 |

## NOTA INTRODUCTORIA

El nuevo plan de estudios autorizado por el Consejo Técnico del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM contempla una nueva modalidad para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas. Dicha modalidad, denominada “Titulación por artículo científico”, contempla la elaboración de una tesis que centre su contenido y discusión en un artículo científico el cual es producto del trabajo de investigación que el alumno realizó durante sus estudios de maestría. Debido a esto, este trabajo presenta características particulares:

- El sobretiro del artículo publicado sustituye a las secciones “Materiales y métodos” y “Resultados” debido a que estas secciones ya se incluyen en el cuerpo del artículo.
- Las imágenes presentes en el artículo se muestran de forma independiente al final de éste y se enlistan numéricamente mientras que las figuras que no están presentes en el sobretiro se enlistan de forma alfabética.
- En la discusión de este trabajo escrito se amplía la discusión realizada en el artículo científico. Para tal fin, se utilizan diversos resultados que no fueron publicados. Los materiales y métodos utilizados para su obtención se describen en los anexos al final de la tesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                      |  |
|----------------------|--|
| $^1\text{O}_2$       | oxígeno en singulete   |
| AA                   | ácido ascórbico  |
| AFS (PBS)            | solución amortiguadora de fosfato salina (del inglés <i>phosphate buffer saline</i> )            |
| 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<br>(del inglés <i>reactive nitrogen species</i> ) |
| ERO (ROS)            | especie(s) reactiva(s) derivadas del oxígeno<br>(del inglés <i>reactive oxygen species</i> )     |
| FAD                  | flavina adenina dinucleótido   |
| $g$                  | fuerza centrífuga relativa   |
| GPx                  | glutación peroxidasa   |
| GR                   | glutación reductasa  |
| Grx $-(\text{S}_2)$  | glutarredoxina (forma oxidada)   |
| Grx $-(\text{SH})_2$ | glutarredoxina (forma reducida)  |
| GSH                  | glutación (forma reducida)   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| GSSG                          | disulfuro de glutati3n (forma oxidada)                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | per3xido de hidr3geno   |
| HO <sup>-</sup>               | i3n hidroxilo   |
| HO <sup>•</sup>               | radical hidroxilo   |
| IC <sub>50</sub>              | constante de inhibici3n media                                       |
| MTT                           | bromuro de tetrazolio azul de tiazolil                              |
| NADP <sup>+</sup>             | $\beta$ -nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato (forma oxidada)  |
| NADPH                         | $\beta$ -nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato (forma reducida) |
| nat O <sub>2</sub>            | nano3tomos de ox3geno   |
| nm                            | nan3metros  |
| •NO                           | 3xido n3trico   |
| NOS                           | 3xido n3trico sintasa   |
| NOX                           | NADPH oxidasa   |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>  | radical super3xido  |
| ONOO <sup>-</sup>             | peroxinitrito   |
| PMSF                          | fenil-metil-sulfonil-fluoruro                                       |
| Prot -SH                      | prote3na reducida   |
| Prot -SSG                     | prote3na glutacionilada   |

|                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| Prx                   | peroxirredoxina                  |
| redox                 | reducido / oxidado               |
| $\text{RO}^\bullet$   | radical alcoxilo                 |
| $\text{RO}_2^\bullet$ | radical peroxilo                 |
| Sec , U               | selenocisteína                   |
| SOD                   | superóxido dismutasa             |
| TGR                   | tiorredoxina glutatión reductasa |
| TRIS                  | tris (hidroximetil) aminometano  |
| $\text{Trx -S}_2$     | tiorredoxina (forma oxidada)     |
| $\text{Trx -(SH)}_2$  | tiorredoxina (forma reducida)    |
| TrxP                  | tiorredoxina peroxidasa          |
| TrxR                  | tiorredoxina reductasa           |

## LISTA DE FIGURAS

### *Figuras del artículo.*

Figura 1. El auranofín tiene un efecto letal dosis- y tiempo- dependiente en los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Figura 2. Zimograma.

### *Figuras adicionales.*

Figura A. Diagrama comparativo de las reductasa de los sistemas de glutatión y tiorredoxina.

Figura B. Dibujo esquemático de la molécula de auranofín.

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

Figura D. Efecto del Auranofín en la concentración de GSH total y en la relación GSH/GSSG en cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Figura E. Efecto del Auranofín en las parasitosis ocasionadas por *Taenia crassiceps*.

## RESUMEN

Los principales mecanismos para mantener la homeostasis redox en los organismos dependen del sistema de glutatión y el sistema de la tiorredoxina; los cuales constan de una reductasa que transfiere electrones provenientes del NADPH a su respectivo sustrato (glutatión o tiorredoxina). Sin embargo, se ha reportado la existencia de una reductasa que es capaz de reducir a ambos sustratos. Esta enzima, la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR), se ha reportado en diversos platelmintos parásitos por lo que se ha propuesto como un blanco farmacológico ya que es la única enzima con esta función en estos organismos.

La TGR posee un centro activo redox en su extremo carboxilo en el cual presenta un residuo de selenocisteína, fundamental para su función catalítica. Por otro lado, se ha demostrado que el auranofín (una sal derivada de oro), tiene alta afinidad por la selenocisteína y debido a esta característica es un potente inhibidor de selenoproteínas, incluyendo a la TGR.

La TGR del cisticerco de *Taenia crassiceps*, purificada a homogeneidad se inhibe irreversiblemente con auranofín 10 nM. En este trabajo se reportan los resultados obtenidos *in vitro*, cuando se expone a auranofín el cisticerco de *T. crassiceps*. Se encontró un efecto letal dosis-dependiente. El 100% de la población de cisticercos mueren después de 12 h de exposición al auranofin (10  $\mu$ M). Se corroboró la inhibición de esta enzima al medir la actividad de la TGR. Estos resultados se publicaron en 2010 en la revista *Parasitology Research*.

Una consecuencia de la inhibición *in vivo* de la TGR es la acumulación de sus sustratos en su forma oxidada; lo que alteraría la relación reducido/oxidado de estos. Se observó que el auranofín disminuye la cantidad de glutatión total y que reduce el cociente GSH/GSSG de 7:1 en condiciones basales a 2:1 en cisticercos tratados lo que favorece un ambiente intracelular más oxidante que promovería la muerte del parásito. En el caso del modelo de cisticercosis, cuando a ratones infectados con cisticercos se les administró éste fármaco el número de cisticercos no aumentó con respecto al control.

## ABSTRACT

The principal mechanisms that maintain the redox homeostasis in organisms depend of the glutathione and the thioredoxin systems which consist of a reductase that transfers electrons from NADPH to the respective substrate (glutathione and thioredoxin). However, the existence of a reductase that is capable of reducing both substrates has been reported. This enzyme, thioredoxin-glutathione reductase (TGR) has been reported in various parasitic flatworms so it has been proposed as a drug target because it is the only enzyme with this function in these organisms.

TGR has a selenocysteine residue in the C-terminal active redox site that is central for its catalytic activity. It has been also demonstrated the auranofin (a gold-derivate salt) has a great affinity for selenocysteine, been for this reason a potent inhibitor of selenoproteins including TGR.

In *Taenia crassiceps* cysticerci, TGR has been purified to homogeneity, this is inhibited in an irreversible way with 10 nM auranofin. Here we report the *in vitro* results obtained when the *T. crassiceps* cysticerci is exposed to auranofin. A lethal effect dose-dependent was found with 10  $\mu$ M auranofin and 100% of this larvae died after 12 h exposition to this drug, after auranofin treatment, no TGR activity was detected. These results were published in 2010 in the journal Parasitology Research.

As a consequence of the *in vivo* inhibition of TGR is the accumulation of both substrates in its oxidized form altering the reduced/oxidized ratio. The GSH/GSSG ratio was determined in the presence of auranofin, under this condition the total glutathione was diminished and the ratio is lower from 7:1 (basal) to 2:1 (with auranofin), conditions that could promote the parasites dead. In addition, when auranofin was administered to mice infected with cysticerci, the parasites number not increase.

## INTRODUCCIÓN

### 1. La homeostasis redox en los sistemas biológicos

El término especie reactiva de oxígeno (ERO) es un término colectivo que describe a las especies químicas que son formadas de la reducción incompleta del oxígeno e incluyen a los radicales anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), peroxilo ( $RO_2^{\cdot}$ ) y alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ), así como las especies no radicales derivadas del oxígeno como por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno en singulete ( $^1O_2$ ) [1].

De manera similar, el término especies reactivas de nitrógeno (ERN), engloba a las especies químicas derivadas del nitrógeno como son el radical óxido nítrico ( $ON^{\cdot}$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) entre otros [2].

Las ERO (así como las ERN) son una consecuencia de la vida en condiciones aerobias pues ambas son productos del metabolismo celular normal (Lushchak, 2011) y han sido reconocidas por jugar un papel dual, ya que pueden ser dañinas o benéficas para los sistemas vivos [3]:

- El efecto dañino de las ERO y ERN ocurre por un fenómeno denominado estrés oxidante. Esto ocurre en sistemas biológicos donde hay una sobreproducción de ERO/ERN ó un deficiente sistema de depuración de las mismas.
- Los efectos benéficos de ERO y ERN ocurren a bajas o moderadas concentraciones y participan en diversos procesos fisiológicos como la diferenciación celular, la defensa contra agentes patógenos y en múltiples mecanismos de señalización celular [4, 5].

En este sentido, las células deben mantener un equilibrio en su estado reducido/oxidado (redox) para evitar el daño de sus componentes por una oxidación excesiva debida al estrés oxidante. El delicado balance entre efectos

benéficos y dañinos de las ERO es un aspecto muy importante en los seres vivos por lo que existen múltiples mecanismos dirigidos a mantener dicho balance al interior de las células, manteniendo con ello la *homeostasis redox*.

De acuerdo a esto, Drogüe [6] expone que la homeostasis redox se logra, en principio, mediante un balance entre la tasa de producción de especies reactivas y la tasa de eliminación de éstas, 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 de defensas antioxidantes, los cuales pueden ser enzimáticos y no-enzimáticos. Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen entre otras, a la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y peroxirredoxinas (Prx). Los antioxidantes no enzimáticos están representados por el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (predominantemente en forma de vitamina E), el glutatión, carotenoides, flavonoides y otros. Bajo condiciones normales, hay un balance entre su actividad detoxificante y los niveles intracelulares de estos antioxidantes. Este balance es esencial para la sobrevivencia de los organismos y su salud.

El estado redox de una célula se mantiene dentro de un rango estrecho de forma similar a la manera en como un sistema biológico regula su pH. Bajo condiciones patológicas el estado redox puede ser alterado a valores inferiores o superiores. Es importante señalar que el estado redox es particular al tipo celular así como la función que ésta lleve a cabo [3].

La homeostasis redox intracelular está principalmente orientada a mantener la relación red/ox del glutatión (GSH) y la tiorredoxina (Trx) [7]. Los sistemas dependientes de GSH y de Trx, constituyen los principales sistemas redox en la célula.

### *1.1 El sistema dependiente de GSH*

El GSH es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina que contiene un inusual enlace  $\gamma$ -peptídico entre el glutamato y la cisteína. Dicho enlace lo hace resistente a la acción de muchas peptidasas. Debido a su residuo de cisteína, el GSH puede sufrir oxidación por lo que lo podemos encontrar en su forma oxidada, el disulfuro de glutatión (GSSG). En muchos organismos es el tiol intracelular más abundante (0.2 - 10 mM). Es mantenido en su forma reducida por la glutatión reductasa (GR), una oxidorreductasa dependiente de NADPH. Participa como coenzima y está involucrado en el transporte de aminoácidos, en el metabolismo y en el mantenimiento de tioles en proteínas y en otros compuestos de bajo peso molecular, como la cisteína, la coenzima-A y el ácido ascórbico. Puede también reaccionar enzimáticamente (a través de la glutatión-S-transferasa) con compuestos tóxicos para la célula y formar conjugados de glutatión y proteger contra el daño oxidante por especies reactivas de oxígeno que pueden ser formadas durante el metabolismo reaccionando directamente o ayudando en su depuración a través de la GPx [8]. Adicionalmente puede transferir sus electrones a las glutarredoxinas (Grx) que son proteínas de bajo peso molecular (9-14 kDa) que tienen por finalidad formar (o disociar) complejos entre el GSH y tioles proteicos o proveer de equivalentes reductores a la ribonucleótido reductasa [9].

Bajo condiciones de estrés oxidante, el contenido de GSSG aumenta, esto a su vez puede incrementar el contenido de disulfuros mixtos en proteínas. Un gran número de proteínas involucradas en señalización, tienen tioles en sus sitios funcionales (receptores, protein-cinasas y algunos factores de transcripción) que al formar disulfuros mixtos, pueden alterar su función [10].

## 1.2 Sistema dependiente de la Trx

La Trx es una proteína de bajo peso molecular (12 kDa) que contiene un sitio activo tiol/disulfuro y posee actividad de óxido-reductasa. Su localización es principalmente citoplásmica aunque también puede encontrarse en algunos organelos e incluso, puede ser excretada [11].

Las Trx sirven como un cofactor de una serie de enzimas como las peroxirredoxinas (las cuales detoxifican peróxidos y son muy abundantes en el citosol), la ribonucleótido reductasa y la metionina sulfóxido reductasa (una enzima encargada de revertir la oxidación de residuos de metionina), están involucradas en la reparación del ADN.

La Trx participa en reacciones redox a través de la oxidación reversible de tioles en su sitio activo, por lo que puede existir en su forma oxidada ( $\text{Trx} - [\text{S}_2]$ ) o reducida ( $\text{Trx} - [\text{SH}]_2$ ). Las Trx son reducidas por la tiorredoxina reductasa (TrxR).

Las TrxR son flavoproteínas homodímeras con actividad de óxido-reductasa, que transfieren electrones del NADPH al sitio activo (disulfuro) de la  $\text{Trx} - [\text{S}_2]$ . La masa molecular de las subunidades de TrxR es de 55-65 kD en mamíferos y 35 kD en procariontes, plantas y levaduras.

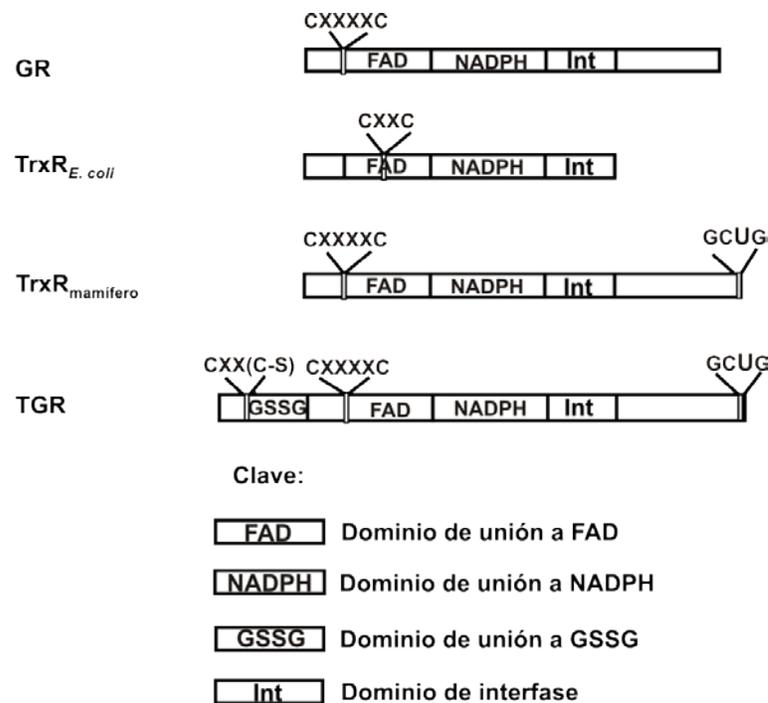
Existen tres isoformas de TrxR humanas: citoplásmica (TrxR1), mitocondrial (TrxR2) y una TrxR capaz de reducir tanto al glutatión como a la tiorredoxina oxidados. Dicha reductasa se denomina tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) y se encuentra en altos niveles en testículos. Las tres isoformas poseen los mismos dominios estructurales y están caracterizadas por la presencia de selenocisteína (Sec) in el centro redox carboxilo terminal (Gli-Cis-Sec-Gli-COOH). Existe un dominio adicional similar a glutarredoxina en el extremo amino en el caso de la TGR.

### *1.3 Diferencias entre los sistemas dependientes de GSH y Trx*

Tanto el sistema del GSH como el de la Trx, tienen componentes similares: un sustrato (GSH ó Trx – [SH]<sub>2</sub>) que transfiere sus electrones a su respectiva peroxidasa para llevar la detoxificación de peróxidos (GPx ó TPx) y una reductasa (GR o TrxR) encargada de regenerar al sustrato a su forma reducida, ambos sistemas trabajan de forma paralela y no son redundantes en cuanto a sus funciones [12]. De hecho, debido a que la concentración de GSH es mucho más alta que la concentración de la Trx (de 100 a 1,000 veces más bajas que la de GSH), la poza GSH/GSSG dentro de la célula domina el ambiente redox intracelular y comprende el principal amortiguador (e indicador del estado redox) de la célula [13]. Por otro lado, la Trx tienen por función mantener (o reestablecer) la estructura ditiol/disulfuro de las proteínas que han sufrido oxidación [14]. Una función importante de la Trx es mantener reducidos residuos de cisteína críticos presentes en los dominios de unión a ADN de varios factores de transcripción sensibles a oxidación para mantenerlos funcionalmente activos [9]. Finalmente, se sabe que durante el ciclo celular estos sistemas el del GSH y el de la Trx, responden de manera diferente e independiente [15].

### 1.4 El sistema de la TGR

La TGR fue descrita por el grupo de Gladyshev y colaboradores [16]. Esta enzima al igual que la TrxR clásica forma parte de la familia de las piridin-nucleótido-disulfuro óxido-reductasas 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 en su extremo amino. Adicionalmente, la TGR posee un centro activo redox ditiol/disulfuro en su extremo C-terminal, común a las TrxR de alto peso molecular (Figura A). En el caso de las TrxR de mamífero (y las TGR de platelmintos), se ha encontrado que este centro activo redox posee un residuo de selenocisteína (como parte del motivo conservado Gli-Cis-Sec-Gli) por lo que se forma un enlace selenol-tiol / selenenuro-sulfuro.



**Figura A. Diagrama comparativo de las reductasas de los sistemas de glutatión y tiorredoxina. Modificado de [17].**

La TGR se aisló inicialmente de testículo de ratón y se identificó por secuencia en el genoma de distintos organismos vertebrados, incluyendo el hombre, evidencia experimental señala su participación en la maduración de las espermátidas y que su expresión cesa en el espermatozoide maduro [18]. También ha sido posible identificar y purificar esta enzima de varios platelmintos parásitos: *Schistosoma mansoni* (smTGR) [19], *Echinococcus granulosus* (egTGR) [20], *Taenia crassiceps* (tcTGR) [21] y recientemente en *Fasciola hepatica* (fhTGR) [22]. En estos organismos se sugiere que la unión de la unión de los dominios de TrxR y Grx puede representar una ventaja evolutiva pues solo es necesario sintetizar una enzima capaz de reducir sustratos pertenecientes a dos sistemas redox independientes [16].

Sin embargo, existen diferencias entre la TGR de mamíferos y platelmintos:

- a) En las TGR de mamíferos se ha encontrado el motivo monotiol CXXS dentro del dominio de glutarredoxina [16] mientras que en las TGR de *S. mansoni* y *E. granulosus* este motivo es un ditiol CXXC [19, 20].
- b) Aunque es posible localizar la expresión de TGR en diversos tejidos, esta es muy abundante en el testículo, en mamíferos que la expresión de TrxR-1 y TrxR-2 es prácticamente la misma en todos los tejidos. En el caso de los platelmintos parásitos 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 [19, 20, 21].

El mecanismo básico de acción de la TGR propuesto por Sun y colaboradores [16] 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 del extremo amino, dejando reducido al otro residuo.

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

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 del extremo carboxilo.

## 2. Selenoproteínas

Las selenoproteínas, son denominadas así por contener uno o más residuos de selenocisteína (*Sec* en el código de una letra y *U* en el código de una letra). Fueron descubiertas en 1973 y desde entonces, ha sido posible identificarlas en los tres dominios de la vida, incluyendo en los humanos, en los cuales ha sido posible caracterizar a nivel de secuencia a 25 de éstas [23].

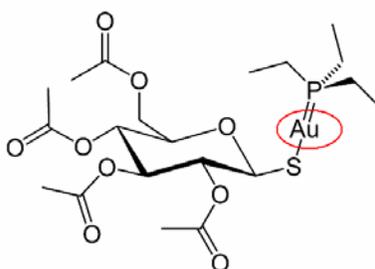
La síntesis de selenoproteínas es un fenómeno complejo el cual consiste en muchos pasos e involucra diversos elementos especializados [24]. Brevemente:

- i) Producción del precursor selenofosfato. Dicho compuesto se forma a partir de una especie reducida altamente reactiva derivada de selenio: el selenuro de hidrógeno. La síntesis de selenofosfato es dependiente de ATP y está mediada por la enzima selenofosfato sintetasa.
- ii) Síntesis de la selenocisteína. Un RNA de transferencia es cargado en un primer momento con serina para después ser transformada a selenocisteína por incorporación del selenofosfato. En arqueas y en eucariontes, la serina debe ser fosforilada como paso previo a la síntesis de selenocisteína.
- iii) Inserción cotraduccional de la selenocisteína. El tRNA cargado con *Sec* reconoce el codón UGA, el cual es normalmente un codón de paro. Sin embargo, para que dicho codón sea reinterpretado como *Sec* se requiere un contexto específico el cual es dado por factores de traducción especializados que puedan reconocer e interactuar con una estructura secundaria tipo tallo-horquilla en el extremo 3' del mRNA para reclutar el tRNA *Sec* al ribosoma. Dicha estructura se denomina secuencia de inserción de selenocisteína (SECIS, selenocysteine insertion sequence). Este elemento se encuentra en *cis* inmediatamente después del codón UGA dentro de la región codificante en procariontes mientras que en arqueas y eucariontes el elemento SECIS se localiza en la región no-codificante 3' del mensajero.

### 3. Auranofín

El auranofín (trietilfosfina (2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-1-D-tiopiranosato-S) de oro (I) fue el primer complejo de fosfina-metal introducido en la práctica clínica de la crisoterapia (tratamiento anti-reumatoide basado en el uso de sales derivadas de oro) siguiendo los tratamientos pioneros con compuestos derivados de aurotiolatos [25]. En contraste con la naturaleza polimérica de otras sales áureas, el auranofín es un complejo monomérico discreto compuesto por una fosfina terciaria y una tioglucosa coordinados por un átomo de oro; las distancias y ángulos de dichos enlaces son similares a los compuestos derivados de oro (I) doble coordinados típicos (Figura B) [26].

La dosis terapéutica recomendada para un adulto de 70 kg es de dos dosis de 3 mg por día, administrada por vía oral durante 12 meses pudiéndose extender de manera indefinida el tratamiento si no se observan efectos secundarios [27]. 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 [28].



**Figura B. Dibujo esquemático de la molécula de auranofín**

#### *4. Taenia crassiceps como modelo de estudio de biología redox. Uso de cepas para la obtención de los modelos experimentales de cisticercosis y teniasis*

##### *4.1 Platelminetos*

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 [29]. 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 [30].

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).

## 4.2 Los céstodos

Esta clase incluye 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 [31, 32]. El parénquima puede variar de células mesenquimatosas empacadas densamente hasta redes sinciciales y fibrosas con espacios llenos de fluido [30].

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 se utilizó como modelo para realizar la presente tesis.

## 4.3 Biología de *Taenia crassiceps*

*Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) es un platelminto que en su forma adulta, parasita zorros árticos y rojos, lobos y perros. La infección natural con cisticercos ha sido reportada en topes de campo y marmotas así como en ratones de campo que la obtienen de consumir alimentos contaminados con heces de cánidos con teniasis. En infecciones naturales, los cisticercos de *T. crassiceps* son generalmente encontrados en el tejido subcutáneo de roedores silvestres y en las cavidades pleural y peritoneal.

La clasificación de *T. crassiceps*, según Pechenick [29], es la siguiente:

División: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: Taenia

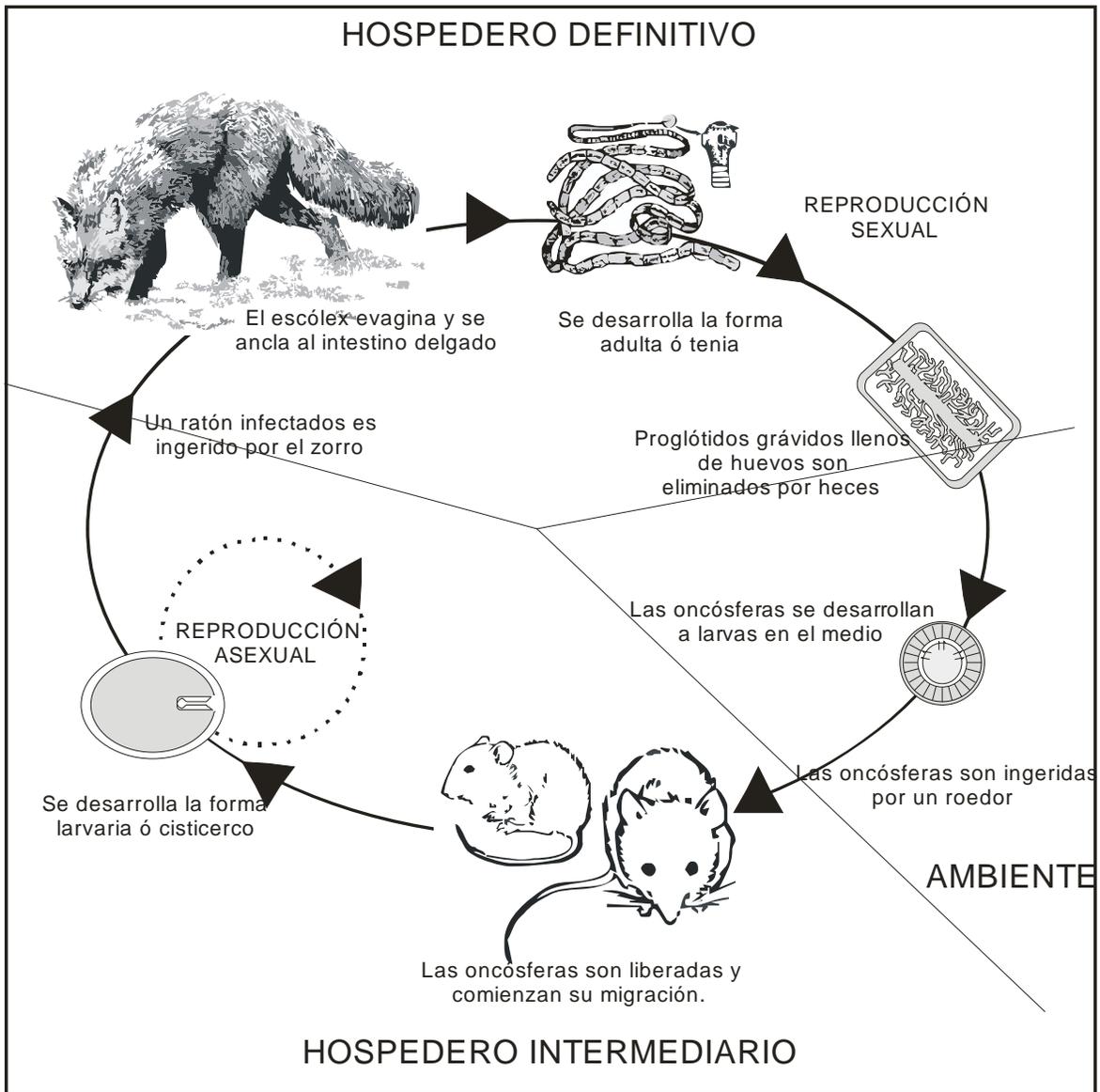
Especie: *Taenia crassiceps*

El estado adulto es alargado, adaptado al aparato digestivo del hospedero vertebrado. El cuerpo está dividido en zonas claramente diferenciadas: un escólex que es un órgano de fijación que puede presentar estructuras como ganchos y ventosas (a). Inmediatamente 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 estróbilo (c), compuesto por proglótidos individuales. Cada proglótido está provisto de aparatos reproductores masculinos y femeninos; existen proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, en función de su madurez sexual [30].

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 [33].

El ciclo de vida del céstodo *Taenia crassiceps* (Figura C) incluye la maduración y posterior expulsión de *proglótidos grávidos* a través de las heces del hospedero definitivo. Los *huevos fértiles* se liberan al medio al desintegrarse el proglótido. Durante este tiempo, en 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 la forma larvaria denominada *cisticerco*. En el caso del modelo experimental de cisticercosis de *T. crassiceps*, los cisticercos pueden reproducirse asexualmente limitados su capacidad infectiva y por el espacio físico en el tejido donde se encuentran; además de múltiples factores como son la carga genética, sexo y la madurez del sistema inmune del hospedero, entre otros. En algunas cepas, cada cisticerco puede contener un escólex desarrollado invaginado. Finalmente, si el hospedero intermediario es ingerido por el hospedero definitivo [34] el escólex evagina para anclarse al intestino del hospedero definitivo, donde la forma adulta ó *tenia* puede crecer, madurar y producir proglótidos grávidos completando el ciclo del parásito [35].



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

Existen diversas cepas de *T. crassiceps* que han sido utilizadas, ya sea para obtener cisticercos u obtener organismos adultos. Algunas de estas son [36]:

- ORF. La cepa más vieja aislada en 1952 por Freeman. Es aneuploide por lo que es estéril e incapaz de formar un escólex.
- TOI. Aislada en 1961 de una marmota infectada naturalmente.

- c) KBS. Aislada por Esch en 1965.
- d) DEB. Aislada de un ojo humano en 1972 por Freeman
- e) HYG. Aislada en 1974. Fue obtenida por administrar a ratones blancos huevos de un céstodo recuperado de un zorro infectado naturalmente.
- f) WFU. Aislada de un ratón silvestre (*Peromyscus spp.*) capturado en el estado de Michigan, E.U., en 1999 por Kuhn. La cepa fue denominada en honor de la Wake Forest University.

La mayoría de las cepas han sido mantenidas por medio de series de pases intraperitoneales en ratones blancos siendo considerada la cepa ORF la más modificada y las cepas HYG y la recién aislada cepa WFU, que conservan el escólex; esta última conserva la capacidad para generar la forma adulta de *Taenia crassiceps* [37].

Los cisticercos del género *Taenia* han sido ampliamente estudiados debido a su significado médico y veterinario. En la actualidad, hay 42 especies del género *Taenia* reconocidas ampliamente en mustélidos, vivéridos, felinos, cánidos y humanos hospederos. Los hospederos intermediarios son conservados evolutivamente y la reproducción asexual en cisticercos es relativamente rara, ocurriendo en solo 10 especies de la familia *Taeniidae*

El establecimiento de modelos experimentales para la producción de la forma adulta de *T. crassiceps* y *T. solium* en hámsteres dorados ha ayudado a la descripción de importantes características ultraestructurales, biológicas y de la interface hospedero-parásito [38].

Los parásitos que causan infecciones crónicas, como los helmintos, son organismos modelos para estudiar defensas antioxidantes debido a que ellos no solo están sujetos a oxidantes endógenos, sino también están bajo estrés oxidante por las células de su hospedero [17].

Datos obtenidos hasta la fecha refuerzan el concepto de que los sistemas de tiorredoxina y glutatión unidos por la TGR juegan un rol central en la defensa

antioxidante en platelmintos [39, 40, 41]. La actividad de catalasa es indetectable y la de GPx es baja [42] y la información disponible de los transcriptomas de los géneros *Schistosoma* y *Echinococcus* apoyan esta propuesta [43].

## ANTECEDENTES

Los sistemas dependientes del glutatión y de la tiorredoxina son fundamentales para mantener la homeostasis redox en los organismos [3, 44, 45]. Diversos estudios han demostrado que la arquitectura de sistemas dependientes de glutatión y tiorredoxina en platelmintos parásitos difieren de los sistemas redox de sus hospederos siendo la principal diferencia la ausencia de la TrxR y GR clásicas y la sustitución de éstas por una única reductasa TGR expresada durante todo el ciclo de vida de los parásitos [43].

La TGR pertenece al grupo de las selenoenzimas, las cuales presentan un residuo de selenocisteína (Sec) siendo éste residuo fundamental para la reducción de sus sustratos [46]. Debido a la alta accesibilidad y reactividad de Sec, la TGR (al igual que la TrxR de mamífero) puede ser fácilmente inhibida por muy diversos compuestos como son los metales y metales de transición, agentes alquilantes, dinitrohalobenzenos, quinonas, flavonoides y otros polifenoles [47]. En particular, los complejos derivados de oro son potentes inhibidores actuando a bajas concentraciones [48] siendo el auranofín uno de los más potentes inhibidores de selenoproteínas. Sin embargo, la concentración necesaria para inhibir a las distintas selenoenzimas no es igual pues se ha demostrado que para inhibir a las TrxR (de las cuales, la TGR forma parte) se requieren concentraciones en el orden nanomolar mientras que para inhibir a otras selenoproteínas (como la GPx) u otras enzimas relacionadas estructuralmente como la glutatión reductasa (GR) se requieren concentraciones en el orden micromolar [26].

El auranofín tiene una ventaja importante como fármaco antihelmíntico debido a que ha sido usado en la clínica para tratar la artritis reumatoide desde hace 25 años así que presenta un bien conocido y muy seguro perfil toxicológico [49]. Recientemente, se ha analizado el papel de la TGR en la viabilidad en otros platelmintos parásitos y se ha observado que el auranofín tiene efecto letal sobre los parásitos [39, 40].

## **HIPÓTESIS**

El auranofín inhibirá a la TGR del parásito lo que afectará la homeostasis redox del platelminto y por consecuencia, se observará un efecto letal en el céstodo en condiciones *in vitro* y en los modelos experimentales de cisticercosis y teniasis.

## **OBJETIVO**

### GENERAL

Caracterizar el efecto del auranofín en la homeostasis redox de platelmintos parásitos.

### PARTICULARES

Probar si el auranofín tiene un efecto letal en los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Evaluar si el auranofín inhibe a la TGR *in vivo* en los cisticercos de *Taenia crassiceps*

Determinar la relación [GSH] / [GSSG] en cisticercos de *T. crassiceps*, tratadas con auranofín.

Evaluar el efecto del auranofín en organismos parasitados intraperitonealmente con cisticercos de *T. crassiceps*.

Evaluar el efecto del auranofín en organismos parasitados con la forma adulta de *T. crassiceps* (teniasis).

## In vitro killing action of auranofin on *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) and inactivation of thioredoxin–glutathione reductase (TGR)

José J. Martínez-González · Alberto Guevara-Flores ·  
Georgina Álvarez · Juan Luis Rendón-Gómez ·  
Irene P. del Arenal

Received: 28 September 2009 / Accepted: 1 April 2010 / Published online: 30 April 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Control of cellular redox homeostasis is a central issue for all living organisms. Glutathione and thioredoxin enzymatic redox systems are the usual mean used to achieve such a control. However, parasitic platyhelminths studied to date possess a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent thioredoxin–glutathione reductase (TGR) as the sole redox control system. Thus, TGR is considered as a potential therapeutic target of parasitic platyhelminths, and based on this assumption, the gold compound auranofin is a potent inhibitor of TGR. The aim of this research was to investigate the effect of auranofin on metacestode (cysticerci) of *Taenia crassiceps* in culture. Accordingly, the time course for viability and respiration of cysticerci in culture was evaluated in the presence of this compound. After 4 h at 10  $\mu\text{M}$  auranofin, 90% of cysticerci were alive, but respiration activity had declined by 50%. After 12 h, neither survivors nor respiration was detected; a  $\text{LD}_{50}$  for auranofin of 3.8  $\mu\text{M}$  was calculated. Interestingly, crude extracts of cysticerci pretreated with 3  $\mu\text{M}$  auranofin nearly nil TGR activity ( $\text{IC}_{50}=0.6 \mu\text{M}$ ). Zymography for TGR in polyacrylamide gel electrophoresis was conducted because the previously mentioned extracts clearly showed a dose–response inactivation of TGR toward auranofin. The killing of cysticerci by this gold compound is most likely

related with TGR inactivation. Therefore, further research on the suitability of auranofin as a therapeutic tool in the treatment of cysticercosis in animals and humans is sustained.

### Introduction

*Taenia solium* metacestode causes cysticercosis in human muscle and brain, whereas the adult worm causes taeniasis when it becomes established in the intestine (Pawlowski 2002). Both types of parasitosis constitute an important health problem in developing countries (Sarti 2002). *Taenia crassiceps* is a related parasite model, but is not infectious for humans. Because of their ability to multiply asexually by budding in the peritoneal cavity of mice (Freeman 1962; Sciutto et al. 1990), several strains of this metacestode (cysticerci) have been isolated and maintained under laboratory conditions. Among these, the HYG strain was isolated from a naturally infected red fox, and the metacestodes were isolated by feeding white mice with the cestode eggs. This strain is presumably the most normal, with a well-developed scolex, which retains the ability to develop into a full adult worm (Sally et al. 1976).

Living organisms have developed enzymatic systems to maintain reduced intracellular environments and protect macromolecules from oxidative damage; such is the case of the glutathione and the thioredoxin redox systems. In both cases, reducing equivalents are provided by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) via specific disulfide reductases that reduce oxidized glutathione (glutathione reductase, GR), and thioredoxin (thioredoxin reductase). In the majority of aerobic organisms, both systems are present. On the other hand, in the parasitic representatives of platyhelminths mentioned previously, redox enzymes are replaced by a single reductase named

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00436-010-1867-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. J. Martínez-González · A. Guevara-Flores · G. Álvarez ·  
J. L. Rendón-Gómez · I. P. del Arenal (✉)  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
Apartado Postal 70-159,  
México City 04510, Mexico  
e-mail: darenal@bq.unam.mx

thioredoxin–glutathione reductase (TGR) (Alger and Williams 2002; Agorio et al. 2003; Rendón et al. 2004), which was first described in mouse testes (Sun et al. 2001). This enzyme is responsible for the reduction of both glutathione and thioredoxin.

In these parasites, elimination of oxygen radicals produced by their own oxidative pathways and, most importantly, as a result of host defense strategies, is a central matter for parasite colonization of the host. Thus, TGR activity in platyhelminths appears to be instrumental for parasitic success; therefore, this enzyme is most likely a suitable target for drug or vaccine design against parasitic platyhelminths.

Like mammalian thioredoxin reductases, TGR is a selenoprotein with a GCUG structural motif located at the C-terminal side, where U is a selenocysteine residue that transfers electrons to oxidized thioredoxin. In this respect, the gold compound auranofin has been reported as a potent inhibitor that reacts specifically with selenocysteine (Gromer et al. 1998). It is noteworthy that this compound has been used in the treatment of chronic rheumatoid arthritis in humans (Finkelstein et al. 1976).

Considering the previously reported inhibitory action of auranofin on TGR (Rendón et al. 2004), we sought to determine whether this inhibitory action of auranofin on TGR could result in harmful toxicity on living *T. crassiceps* cysticerci. In the light of our results, the potential therapeutic use of auranofin in *T. solium* cysticerci parasitosis in animals and humans is discussed.

## Materials and methods

### Biological material

Female Balb/c mice were inoculated intraperitoneally with 20 cysticerci of the *T. crassiceps* HYG strain kindly donated by Dr. C. Larralde. Three months later, cysticerci were recovered from the peritoneal cavity under sterile conditions and thoroughly rinsed with 10 mM phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. In order to obtain a homogeneous population ca. 3.0 mm diameter, cysticerci were selected by filtration in a sieve (1.0 mm pore).

### Inhibitor administration and survival determination

Cysticerci samples (220 cysticerci/2.0 ml) obtained as described previously were mixed with 18 ml of RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) pH 7.0 supplemented with 1% penicillin–streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a 50-ml flask and

incubated for 3 h in a rotatory shaker (126 rpm) at 37°C prior to the addition of auranofin. A fresh stock solution of 10 mM auranofin (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and was added to the cysticerci at the concentrations and times indicated in the figures. Control cysticerci were treated with equal amounts of DMSO. Results shown represent the average of three experiments and were calculated according to the simple one-way (ANOVA) test and OriginPro v.8 statistical software.

Cysticerci survival was analyzed according to two criteria: First, we counted cysticerci with or without movement, which represented live or dead individuals, respectively. Stereoscopic microscopy was used to observe the movement response induced by a heat treatment at 37°C during 5 min (total death is found by heating cysticerci at 60°C during 5 min). The second criterion was exclusion or a stain by means of a vital dye to count live and dead cysticerci, respectively. For this purpose, the cysticerci sample was exposed to 0.02% trypan blue (in PBS).

### Oxygen uptake

Oxygen uptake was measured by the polarographic method using a Clark electrode and high sensitivity membranes (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) in samples containing 22 larvae as described by del Arenal et al. (1998).

### Samples of crude extracts

Samples (120 larvae) of either control or experimental cysticerci were rinsed with PBS, decanted, and frozen for 24 h at –20°C; afterward, they were mechanically homogenized with a Teflon pestle (Bel-Art) in the presence of 86 µM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 38,800 g for 30 min at 4°C. Supernatants were recovered and dialyzed overnight against 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.8), 1.0 mM EDTA. Protein concentration was determined according to Markwell et al. (1978).

### TGR activity

TGR activity was measured in crude extracts samples by following the decrease in absorbance at 340 nm due to NADPH oxidation as described by Rendón et al. (2004). Reductase activity of TGR was also assayed in native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) through the reduction of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) as follows: Samples of crude extracts (80 µg protein) were analyzed in native PAGE carried out

essentially as described by Davis (1964), containing 4.5% stacking gel and 10% resolving gel. As a control, 3.8  $\mu\text{g}$  of purified TGR (Rendón et al. 2004) was included. After electrophoresis, gels were transferred to 10 mM Tris pH 7.8 and stirred during 20 min; then, 0.2 mM NADPH and 0.025% MTT were added, and incubation was continued in the dark. Activity bands usually appear after 20 min. Duplicates for protein staining were run in parallel.

## Results

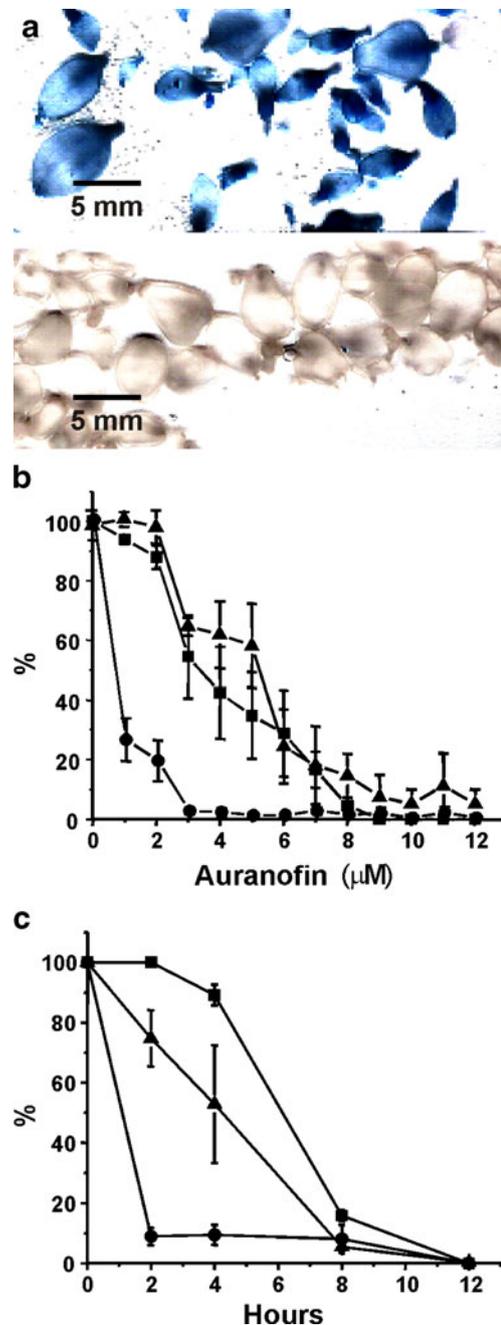
The aim of this work was to evaluate auranofin as a potential therapeutic tool in the control of cysticercosis. Thus, its effect on both cysticerci viability and metabolic activity was assayed, and a reliable method to determine viability of cysticerci was addressed first.

As shown in Fig. 1a, a stain with the blue trypan dye clearly distinguished dead (blue-stained) from living (not stained) larvae; moreover, the motility test showed that blue-stained larvae did not respond to the warming stimulus at 37°C, as compared with those not stained, i.e., living larvae (additional data are given in Online Resource 1). Due to this close correspondence, survival is reported as trypan blue and motility, with 100% of this parameter full survival. DMSO was used as a carrier solvent of auranofin, but there was no appreciable effect on viability when applied alone.

A dose–response experiment (Fig. 1b) showed that both survival and respiration of cysticerci determined 13 h after addition of auranofin declined with similar slopes in response to the gold compound concentration. Total death was achieved with 10  $\mu\text{M}$  auranofin. From survival data, a  $\text{LD}_{50}$  value of 3.8  $\mu\text{M}$  was calculated. Our results are in agreement with those reported for the adult stage of

*Schistosoma mansoni* (Kuntz et al. 2007) and in prostoscolices of *Echinococcus granulosus* (Bonilla et al. 2008), in which total mortality by 10  $\mu\text{M}$  auranofin was reported after 9 and 12 h of incubation, respectively.

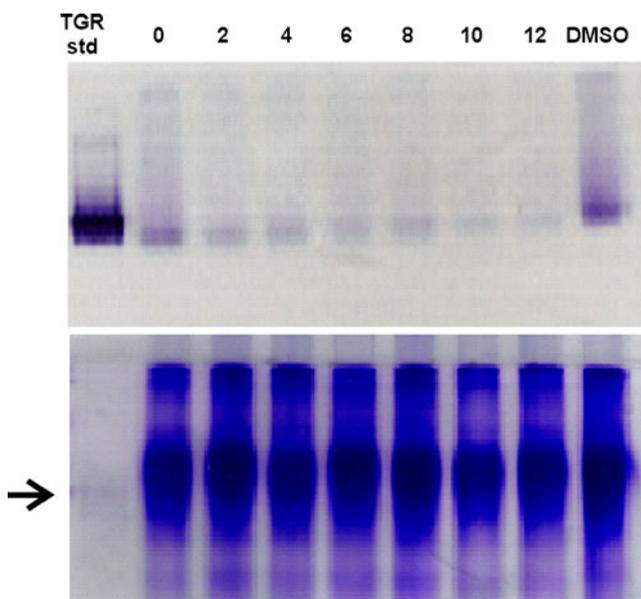
The time-dependent decline of endogenous respiratory activity at 10  $\mu\text{M}$  auranofin was evaluated as shown in Fig. 1c. After 4 h of exposure to auranofin, a significant



**Fig. 1** a Evaluation of cysticerci survival assessed by the exclusion of 0.2% trypan blue in a sample of dead (top) and live parasites (bottom). b Cysticerci were incubated for 13 h at increasing auranofin concentrations. Then, survival was measured and results are shown as a percentage of trypan blue and motility (TB-M) (■—■) and of oxygen uptake (▲—▲). The residual activity of thioredoxin–glutathione reductase (TGR) (●—●) measured in crude extracts obtained from the treated parasites is also presented. Bars illustrate the standard deviation (SD) of three different experiments. c Cysticerci were incubated in the presence of 10  $\mu\text{M}$  auranofin. At the indicated times, evaluation of cysticerci survival was reported as the percentage of trypan blue and motility (TB-M) (■—■) and oxygen uptake (▲—▲). The percentage of thioredoxin–glutathione reductase (TGR) activity (●—●) measured in the crude extracts obtained from the treated parasites is also shown. Bars represent the standard deviation (SD) of three different experiments

decrease of the respiratory activity of the cysticerci (i.e., 50%) had occurred prior to the killing action of the gold compound could be detected in a significant part of the population, as evaluated by the trypan blue stain and the motility test. Longer incubation times (i.e., 12 h) produce total death of the population.

As mentioned previously, TGR is the sole disulfide reductase present in parasitic flatworms, and because auranofin was confirmed as a potent inhibitor of the pure enzyme (Rendón et al. 2004), it appears logical to consider that the lethal action of auranofin correlates directly with the concomitant inhibition of TGR. A dose–response experiment in crude extracts (Fig. 1b) demonstrated that at an auranofin concentration  $>3 \mu\text{M}$ , no TGR activity could be detected; from the data, an  $\text{IC}_{50}$  of  $0.6 \mu\text{M}$  was calculated. On the other hand, after 2 h in  $10 \mu\text{M}$  auranofin, TGR activity was barely detected. In agreement with the previously presented data, a native PAGE-zymographic analysis of crude extracts ( $80 \mu\text{g}$  protein) obtained from auranofin-treated cysticerci clearly showed that the intensity of the TGR activity band diminished as the auranofin concentration increased (Fig. 2, top). A duplicate of crude extracts stained for protein is shown (Fig. 2, bottom).



**Fig. 2** Reductase activity in crude extract samples ( $80 \mu\text{g}$ ) of cysticerci treated with 0–12  $\mu\text{M}$  auranofin were analyzed in native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) by thiozoly blue tetrazolium bromide (MTT) reduction as described in “Materials and methods” section (top). A duplicate gel stained with Coomassie Blue is shown (bottom). Pure thioredoxin–glutathione reductase (TGR;  $3.75 \mu\text{g}$ , arrow) and dimethyl sulfide (DMSO) were used as controls

## Discussion

We previously reported that respiration in *T. crassiceps* cysticerci produces high quantities of hydrogen peroxide (del Arenal et al. 2005); in addition, parasites are normally exposed to reactive oxidants produced by the host (Berggren et al. 2001; Callahan et al. 1988). Surprisingly, no significant activity levels for the detoxifying enzymes catalase and glutathione peroxidase were found in cysticerci (del Arenal et al. 2005). However, the thioredoxin system participates in the defense against oxidative stress via the reduction of peroxiredoxins. These enzymes have been reported in cestodes (Li et al. 2004; Vaca-Paniagua et al. 2009).

Thus, TGR activity apparently represents the sole, or at least, the most important, mechanism for the control of the redox intracellular environment in cysticerci; therefore, TGR activity may be crucial for the successful invasion and establishment of the parasite in the host’s intestine. Moreover, it has been demonstrated that knockout of this enzyme was fatal for *S. mansoni* (Kuntz et al. 2007).

Auranofin as a gold compound acts on the selenium moiety (i.e., selenocysteine) of TGR. The presence of selenocysteine (Sec) is instrumental for TGR activity, as demonstrated in *E. granulosus* (Bonilla et al. 2008) and in rat (Zhong and Holmgren 2000). When Sec was exchanged for cysteine in mutants constructs of rat-TGR, reductase catalytic efficiency dropped abruptly (i.e., from  $7.6 \times 10^8$  to  $3.6 \times 10^7 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ).

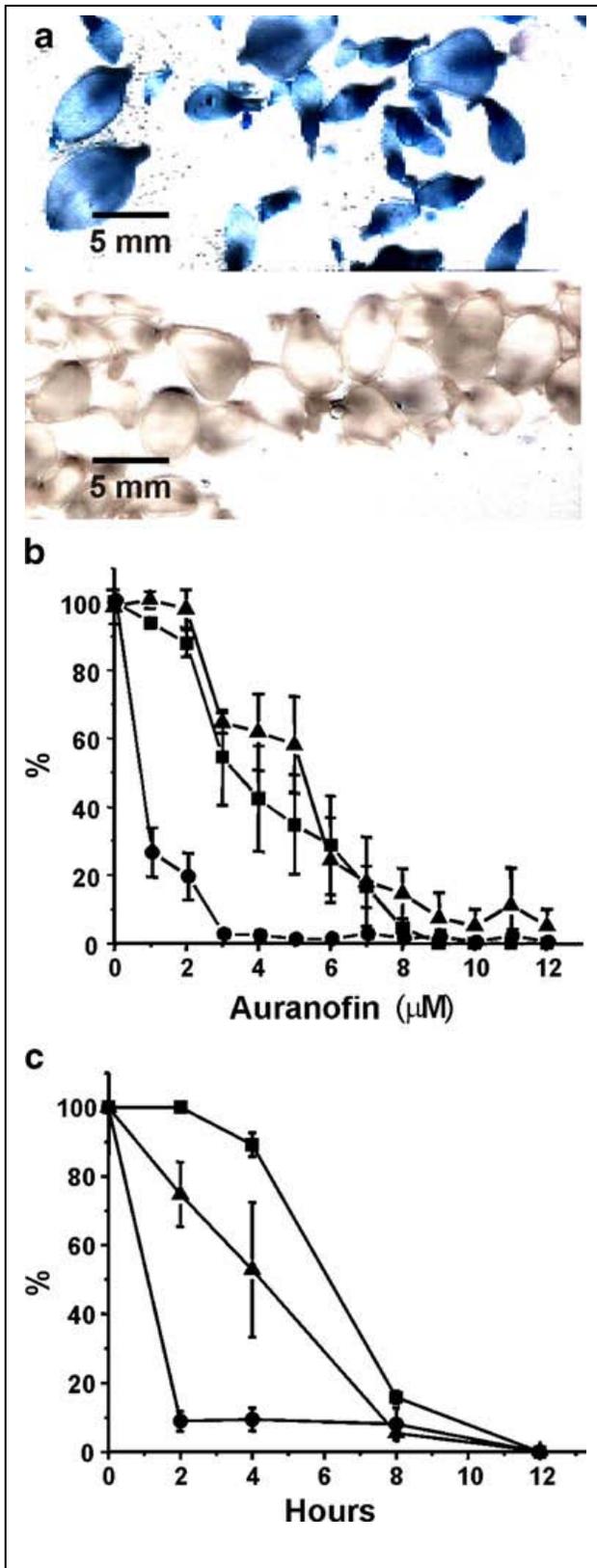
Thus, we have demonstrated that auranofin in vitro is lethal for *T. crassiceps* cysticerci and that this occurred at the low micromolar concentration range of the gold compound. Thus, auranofin could be envisaged as a potential and promising therapeutic tool against *T. solium*, the causative agent of taeniasis and cysticercosis in humans. In this respect, alignment of amino acid sequences of the internal peptides obtained from the purified TGR of *T. crassiceps* (Rendón et al. 2004) with its counterparts in the genome data base of *T. solium* (Taenia Genome Consortium of the Universidad Nacional Autónoma de México: [http://132.248.32.30/karel/Taenia\\_Data/](http://132.248.32.30/karel/Taenia_Data/)) showed an identity of 95.2%. Nearly identical data were obtained by comparison with the *E. granulosus* TGR database (Agorio et al. 2003). This similarity among the previously mentioned TGRs led us to consider that auranofin could exert a similar lethal action on the human parasite; also, the antiparasitic action of this compound on the adult worm may be further explored.

In this respect, it is important to mention that auranofin is currently used in therapy for rheumatoid arthritis in humans, and that its daily administration has been extended for  $>1$  year in patients in whom secondary effects were not detected (Itokazu et al. 1995).

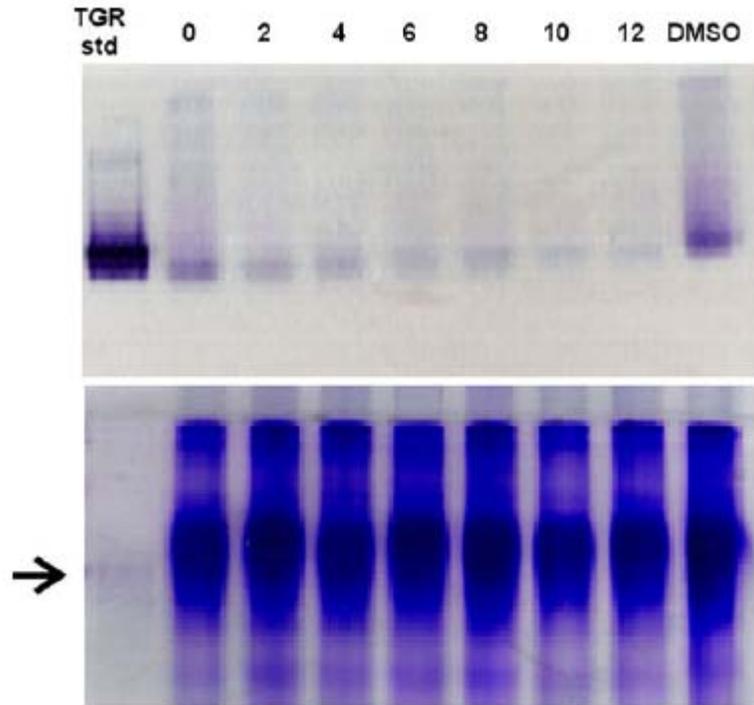
**Acknowledgments** We thank Karel Estrada from the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for assistance in bioinformatics. This work was supported by research grant PAPIIT IN220710-3 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. The authors thank Dr. J. Edgardo Escamilla for helpful discussions and Yoame Escamilla for the video edition. All experiments reported in this work were complied according to the bioethical regulations of the Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- Agorio A, Chalar C, Cardozo S, Salinas G (2003) Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase. *J Biol Chem* 278:12920–12928
- Alger HM, Williams DL (2002) The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Mol Biochem Parasitol* 121:129–139
- Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, Powis G (2001) Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392:103–109
- Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, Izmendi D, Gladyshev VN, Salinas G (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem* 283:17898–17907
- Callahan HL, Crouch RK, James ER (1988) Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitol Today* 4:218–225
- Davis BJ (1964) Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 121:404–407
- del Arenal IP, Cea-Bonilla A, Moreno-Sánchez R, Escamilla JE (1998) A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. *J Parasitol* 84:461–468
- del Arenal IP, Rubio ME, Ramírez J, Rendón JL, Escamilla JE (2005) Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing side-reaction of respiratory complex I with O<sub>2</sub>. *Parasitol Int* 54:185–193
- Finkelstein AE, Walz DT, Batista V, Mizraji M, Roisman F, Misher A (1976) Auranofin: new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 35:251–257
- Freeman RS (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool* 40:969–990
- Gromer S, Arscott LD, Williams CH Jr, Schirmer RH, Becker K (1998) Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem* 273:20096–20101
- Itokazu M, Matsunaga T, Oshita Y (1995) Efficacy and safety of Auranofin in patients with active early rheumatoid arthritis. *Clin Ther* 17:60–73
- Kuntz AN, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, Arnér ESJ, Williams DL (2007) Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target (Abstract). *PLoS Med* 4:e206
- Li J, Zhang W, Loukas A, Lin R, Ito A, Zhang L, Jones M, McManus DP (2004) Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene* 326:157–165
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206–210
- Pawlowski ZS (2002) *Taenia solium*: basic biology and transmission. In: Singh G, Prabhakar S (eds) *Taenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. CABI Publishing, New York, pp 83–90
- Rendón JL, del Arenal IP, Guevara-Flores A, Uribe A, Plancarte A, Mendoza-Hernández G (2004) Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol Biochem Parasitol* 133:61–69
- Sally CY, Chau J, Freeman RS (1976) Intraperitoneal passage of *Taenia crassiceps* in rats. *J Parasitol* 62:837–839
- Sarti E (2002) Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in Mexico. In: Singh G, Prabhakar S (eds) *Taenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. CABI Publishing, New York, pp 83–90
- Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, Govezensky T, Lomelí C, Tapia G, Larralde C (1990) Cysticercosis vaccine: cross-protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 12:687–696
- Sun QA, Kimnarsky F, Sherman S, Gladyshev VN (2001) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3673–3678
- Vaca-Paniagua F, Parra-Unda R, Landa A (2009) Characterization of one typical 2-Cys peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 105:781–787
- Zhong L, Holmgren A (2000) Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J Biol Chem* 275:18121–18128



**FIGURA 1. El auranofín tiene un efecto letal dosis- y tiempo- dependiente en los cisticercos de *Taenia crassiceps*. (a) El ensayo de supervivencia se realizó con azul-tripano al 0.2% en una muestra de cisticercos muertos (arriba) y vivos (abajo). (b) Los cisticercos fueron incubados durante 13 h en concentraciones crecientes de auranofín (gráfico superior). Después, la supervivencia fue determinada y los resultados se muestran como un porcentaje de la supervivencia (cuadros) y del consumo de oxígeno (triángulos). Se muestra además la actividad residual de la tioredoxina-glutación reductasa (círculos) medida en extractos crudos obtenidos a partir de parásitos previamente tratados. (c) Los cisticercos fueron incubados en presencia de auranofín 10  $\mu\text{M}$  y se tomaron muestras a los tiempos indicados en el gráfico para determinar el porcentaje de supervivencia (cuadros), consumo de oxígeno (triángulos) y actividad residual de la TGR (círculos). Todos los gráficos son resultado de tres experimentos independientes.**



**FIGURA 2. Zimograma. Imagen superior.** La actividad de reductasa de la actividad de la TGR en muestras de extractos crudos (80 μg) de cisticercos tratados con auranofín 0- 12 μM fue analizada en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas por medio de la reducción del bromuro de tetrazolio azul de tiazolil (MTT) como se describe en la sección “Materiales y Métodos” del artículo. **Imagen inferior.** Se muestra un duplicado del gel fue teñido con azul de Coomasie. Tiorredoxina-glutación reductasa purificada (TGR; 3.75 μg, flecha) y dimetil sulfoxido (DMSO) fueron usados como controles.

## DISCUSIÓN

### 1. Mecanismo de inhibición del auranofín sobre selenoproteínas

Desde hace mucho tiempo se sabe que el auranofín tiene una alta afinidad por grupos tioles (R-SH) pudiendo formar con dichos grupos un aducto estable. Sin embargo, no todos los grupos tioles son susceptibles de formar complejos con el oro. Por ejemplo, la albúmina sérica presenta 35 residuos de cisteína pero el Auranofín solo es capaz de acomplejarse en el residuo Cys-34 [48]. Esto se debe a que algunas cisteínas son más susceptibles de sufrir oxidación que otras. Asimismo, la forma tiolato ( $R-S^-$ , la base conjugada de la forma tiol) es intrínsecamente mejor nucleófilo y muestra una mayor reactividad con  $H_2O_2$  comparado con su forma tiol (SH). La presencia (o predominio) de la forma tiol sobre la forma tiolato o viceversa está en función del valor de pKa de dicho grupo tiol, el cual puede determinar la reactividad de la cisteína. En proteínas, un residuo típico de cisteína tiene un valor de pKa de 8.5 aproximadamente. Sin embargo, la presencia de un aminoácido polar o cargado positivamente puede estabilizar la forma tiolato a través de interacciones electrostáticas y disminuyendo su valor de pKa tan bajo como 3.5 [50]. En resumen, la modificación oxidante de una cisteína es concebible solo si el microambiente químico en el cual el residuo está localizado determina una disminución en el pKa que favorece la desprotonación de la forma tiol (R-SH) hacia la forma tiolato ( $R-S^-$ ) así como también de la estructura tridimensional de la proteína [51].

En el caso de la selenocisteína se observa que difiere estructuralmente de la cisteína solo en el átomo de azufre, el cual es sustituido por un átomo de selenio. Sin embargo, debido a la configuración electrónica del selenio, la forma selenolato ( $R-Se^-$ ; la base conjugada de la forma selenol, R-SeH) es más estable que la forma tiolato. De hecho, el selenol protonado es más ácido que el tiol de la cisteína ( $pK_{a\text{Sec}} = 5.2$  vs  $pK_{a\text{Cys}} = 8.5$ ) 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 [52] y aumentando con ello su susceptibilidad de ser inhibida por compuestos electrofílicos, como el cisplatino, el trióxido de arsénico y el auranofín en concentraciones nanomolares [24].

*2. El auranofín tiene un efecto letal dosis y tiempo - dependiente en los cisticercos de T. crassiceps.*

Antes de determinar si el auranofín presentaba algún efecto sobre la viabilidad de los cisticercos se procedió a desarrollar un método para evaluar la viabilidad del cisticerco. Los métodos aquí utilizados fueron la motilidad y la tinción por azul de tripano (un colorante vital de exclusión). En todos nuestros ensayos ambos parámetros coinciden al 100% puesto que, los organismos vivos se mueven y no se tiñen mientras que los organismos muertos no se mueven y se tiñen intensamente (**Figura 1a**). El uso simultáneo de ambas técnicas nos permite descartar errores comunes como puede ser una mala interpretación del movimiento del cisticerco o una sub-exposición al colorante (lo que no permitiría una tinción adecuada), por ejemplo. Finalmente, para asegurarnos que un cisticerco estuviera realmente muerto, se procedió a estimular su movimiento con temperatura (elevación a 40°C). Al ser este organismo muy susceptible a los cambios de temperatura se observó un aumento en las contracciones musculares de los cisticercos vivos mientras que en los cisticercos muertos no se observó cambio alguno.

Ya con la certeza de contar con un método confiable y reproducible para la evaluación de la viabilidad de los cisticercos procedimos a exponerlos a distintas concentraciones de auranofín (**Figura 1b**). Paralelo a esto, se midió el consumo de oxígeno como un indicador del metabolismo y la actividad residual de la TGR en extractos crudos provenientes de los cisticercos tratados.

Como se observa en el gráfico, hay un efecto letal dosis-dependiente al exponer a los cisticercos a concentraciones crecientes de auranofín y que hay un efecto letal del 100% de la población en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de auranofín mientras que por debajo de 1  $\mu\text{M}$  no hay efecto alguno. Dicho efecto se observa a una concentración mil veces mayor que la reportada para inhibir a la enzima purificada [21]. Estos resultados están en el mismo orden de magnitud que los obtenidos al exponer a *Schistosoma mansoni* [39] y *Echinococcus granulosus* [40] al auranofín. En nuestro caso, la dosis letal media es de 3.8  $\mu\text{M}$  de auranofín. Se observó además un efecto en el consumo de oxígeno el cual correlaciona con la viabilidad de la población de cisticercos tratados.

Una vez determinada la concentración que presentó el máximo efecto en viabilidad y consumo de oxígeno de los cisticercos, se procedió a determinar el efecto del tiempo de exposición en 10  $\mu\text{M}$  de auranofín en las condiciones mencionadas en el artículo (**Figura 1c**). Se observó que la actividad enzimática de la TGR cae abruptamente a las dos horas de exposición mientras que el porcentaje de viabilidad de los cisticercos se mantiene con respecto al control. Pasado ese tiempo, se observa una actividad residual estable de la enzima y un descenso constante en el consumo de oxígeno de los cisticercos. Sin embargo, solo puede observarse un descenso drástico en la viabilidad población de los cisticercos a las 8 h de exposición al tratamiento. Esta diferencia entre la desaparición de la actividad enzimática y la desaparición de los otros parámetros de viabilidad (2 h vs. 12 h), es posible explicarla si consideramos que los seres vivos cuentan con mecanismos antioxidantes no enzimáticos que le permitieran al cisticercos contener inicialmente contra el estrés oxidante generado por la inhibición de la TGR. Datos previos en el cisticercos demostraron una baja actividad de CAT y GPx [53], por lo que al permanecer inhibida la TGR y de acuerdo a datos experimentales, el aumento de daño oxidante por la incapacidad para depurar peróxido de hidrógeno debido a la falta de Trx y GSH en sus formas

reducidas y la acumulación en sus formas oxidadas deben comprometer la homeostasis redox del cisticerco, lo que eventualmente lo conduce a la muerte. La premisa de la cual parte este trabajo es que la TGR, al ser una selenoproteína, es susceptible de ser inhibida *in vivo* por el auranofín y al ser dicha enzima clave para el mantenimiento de la homeostasis redox en platelmintos parásitos (como lo es *T. crassiceps*), el auranofín presentaría un efecto letal. En este sentido, se comprobó un efecto letal dosis y tiempo-dependientes por lo que pasaremos a analizar la inhibición de la enzima y el efecto de dicha inhibición en el metabolismo redox del cisticerco.

### 3. El auranofín inhibe *in vivo* a la TGR.

Anteriormente, Rendón y colaboradores [21] describieron que el auranofín a una concentración de 10 nM inhibe totalmente a la TGR del cisticerco de *T. crassiceps* purificada a homogeneidad, mientras que en este trabajo se observó que en condiciones *in vivo* la enzima se inhibe totalmente en un rango micromolar (**Figura 1b**) con una constante de inhibición media ( $IC_{50}$ ) de 0.6  $\mu$ M. Para corroborar la inhibición de la TGR por un método distinto al espectrofotométrico, se desarrolló una técnica para evaluar cualitativamente la inhibición de la enzima mediante un zimograma (**Figura 2**). Para tal fin, utilizamos un compuesto denominado MTT (bromuro de tetrazolio azul de tiazolil) el cual es una sal que tiene en su estructura un anillo tetrazolio y la cual presenta una coloración amarilla en solución cuando se encuentra en su forma oxidada. El MTT es convertido en una molécula de formazán insoluble azul-morado (debido al rompimiento del anillo tetrazolio) al ser reducido por enzimas deshidrogenadas activas. Este compuesto utilizado principalmente para la determinación de la actividad enzimática de mitocondrias [54] fue usado para determinar el estado de la TGR de cisticercos expuestos a distintas concentraciones de auranofín. Para tal fin, se explotó la actividad de deshidrogenasa de la TGR para catalizar la reducción del MTT, que es su forma insoluble lo que origina que se precipite 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.

En este caso, el zimograma corroboró que el Auranofín inhibe a la enzima a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , aunque nos evidencia una actividad residual de la enzima a concentraciones menores. La inhibición de la enzima correlaciona con el aumento de la concentración de auranofín a la que los cisticercos fueron expuestos (**Figura 2**). La actividad residual de la TGR podría ayudar a prolongar la viabilidad de los cisticercos tratados hasta que el daño oxidante fuera tal que esta se viera comprometida.

*4. El auranofín disminuye la concentración de GSH total en el cisticerco y disminuye la relación GSH / GSSG.*

Una consecuencia lógica que se desprende de la inhibición de la actividad de reductasa de la TGR por parte del auranofín es la acumulación de sus sustratos (Trx y GSH) en sus formas oxidadas y un cambio en su relación reducido/oxidado (red/ox). Para evaluar esta hipótesis, cuantificamos el glutatión total en cisticercos tratados con auranofín y determinamos su relación GSH / GSSG con el fin de evaluar como este fármaco altera la homeostasis redox del parásito. La técnica para llevar a cabo la determinación de GSH total (así como la cuantificación de las formas oxidada y reducida) fue el método descrito por Akerboom [55] y se detalla en el Anexo I de este trabajo. Los resultados obtenidos indican que en condiciones basales existen aproximadamente, 977 nmolas de GSH en 2 mL de cisticercos, lo que corresponde a una molaridad de 489  $\mu\text{M}$ .

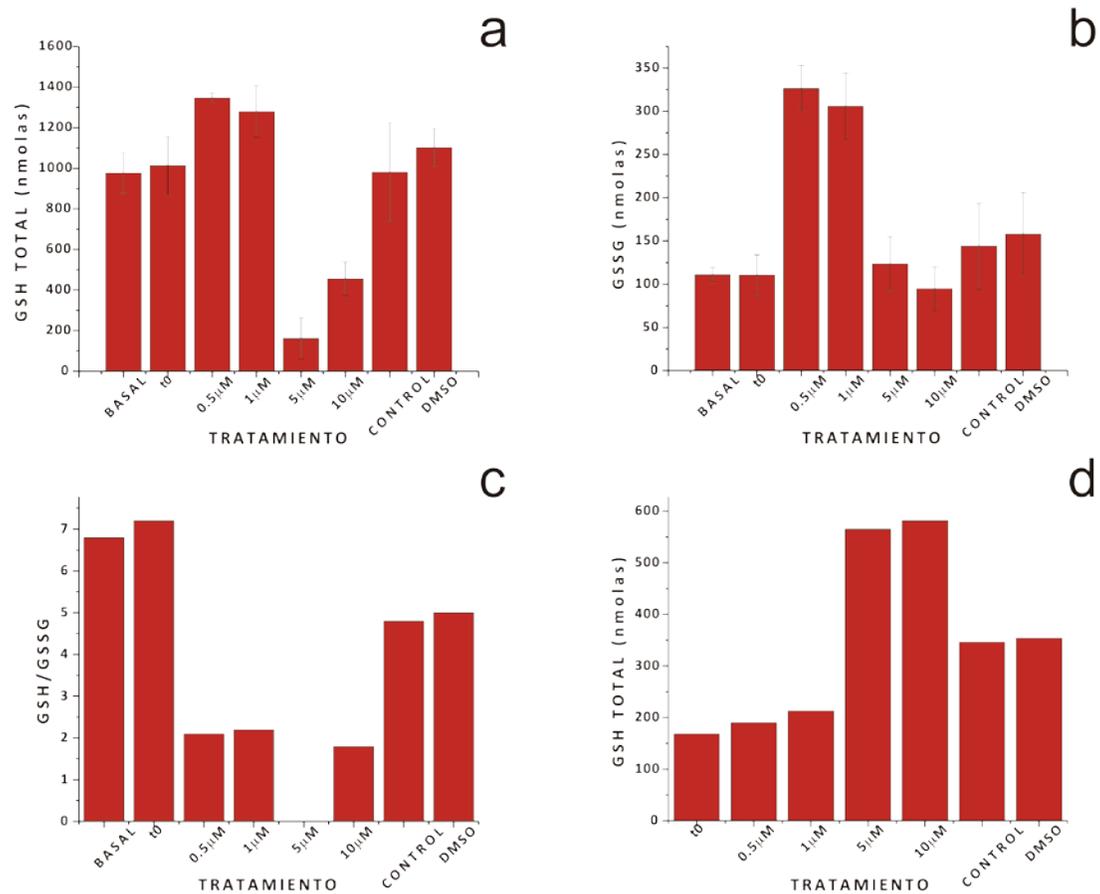
Nuestros resultados señalan que la cantidad de GSH total en condiciones basales (intraperitoneales microaerófilas) es similar a la cantidad determinada en cisticercos que han sido expuestos a condiciones aerobias en el medio de mantenimiento durante 3 horas (tiempo 0) y que dicha cantidad se mantiene

durante 13 h (CONTROL) (Figura Da). Dado que no se observan cambios en dicha determinación en presencia del vehículo (DMSO) y que las únicas variaciones que se observan estuvieron en los cisticercos tratados con auranofín podemos sugerir que el fármaco es el responsable de dichas variaciones en las determinaciones

Debido a que comprobamos que el auranofín inhibe rápidamente a la TGR en cisticercos en condiciones de mantenimiento y que dicha inhibición es dosis-dependiente, esperábamos ver un aumento en la cantidad de GSSG conforme aumentara la concentración de auranofín. Sin embargo, solo se observó un aumento en la cantidad de GSSG en presencia de bajas concentraciones de auranofín (Figura Db).

Dicho aumento estuvo acompañado con un aumento general en la cantidad de GSH total (Figura Da) por lo que podríamos sugerir que este aumento pueda deberse a la activación de la vía de síntesis del glutatión [4]. En el caso de 5 y 10  $\mu\text{M}$  se observó una cantidad de disulfuro de glutatión similar a los diversos controles. Para determinar el efecto que tenían dichas cantidades de GSSG en el estado redox del cisticerco y la falta de incremento de éste calculamos la relación GSH/GSSG y observamos que si bien existe una ligera disminución de dicha relación a través del tiempo, al parecer el auranofín es el principal responsable del cambio de un cociente 7:1 presente en condiciones basales a un cociente 2:1 (Figura Dc).

Esto nos habla de que una de las posibles causas por las que el auranofín provoca la muerte de los cisticercos en condiciones *in vitro* [41] se debe a que la inhibición de la TGR trae consigo una acumulación de GSSG y que esto conduciría a una transición hacia un estado más oxidante, lo que se refleja en una relación GSH/GSSG menor. En este sentido, el estrés oxidante generado sería tal que comprometería la viabilidad del cisticerco. Sin embargo, no observamos la acumulación de GSSG y si el cambio de la relación oxidado/ reducido, acompañado de un aumento de GSH total en cisticercos tratados con 0.5 y 1  $\mu\text{M}$



**Figura D. Efecto del auranofín en la concentración de GSH total y en la relación GSH/GSSG en cisticercos de *Taenia crassiceps*.** La cuantificación se realizó en cisticercos recién obtenidos (BASAL), incubados por 3 horas en medio de mantenimiento (t0) o en cisticercos tratados por 13 horas más, con 0 (CONTROL), 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de auranofín, o con el vehículo (DMSO). La metodología utilizada se detalla en el Anexo I. En los gráficos se presenta (a) la cuantificación de GSH total, (b) del disulfuro de glutatión y (c) la relación GSH/GSSG correspondiente a cada uno de los tratamientos. Adicionalmente, se presenta (d) la cantidad de glutatión total en los respectivos medios de mantenimiento (d) Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos  $\pm$  error estándar con excepción de los valores del gráfico (d) que son producto del promedio de dos mediciones.

de auranofín, seguido por una disminución en cisticercos tratados con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de auranofín. Esto en conjunto nos lleva a suponer que dicha acumulación se da cuando el cisticerco esta en presencia de bajas concentraciones de auranofín (Figura Da), las cuales afectan a la enzima pero no son suficientes para comprometer la viabilidad del cisticerco (**Figura 1b**). Cuando la acumulación de GSSG (debido al estrés oxidante) comprometiera a la viabilidad del cisticerco se tendrían distintos escenarios:

- i) el exceso de GSSG sería expulsado por el cisticerco para tratar de mantener su relación GSH/GSSG en niveles que pudiera manejar,
- ii) conforme ocurre la transición hacía un estado más oxidante, parte del GSH que aún estuviera reducido formaría complejos con tioles protéicos evitando con esto un daño irreversible a dichos tioles,
- iii) el exceso de GSSG (junto con la forma reducida) saldrían del cisticerco por difusión al estar dañado el tegumento debido al estrés oxidante generado por la inhibición de la TGR, ó

También es posible que el glutatión reducido fuese utilizado en el proceso de detoxificación de los cisticercos ya que previamente se ha reportado en *Taenia solium* una glutatión S-transferasa funcional [56]. En todos los casos se observaría una “desaparición” de GSH total al interior del cisticerco.

Para probar el primer punto, se recuperaron los medios de mantenimiento donde fueron tratados los cisticercos para realizar la cuantificación de GSH total en ellos y ver si ocurría un aumento durante el tratamiento con auranofín. En la Figura Dd se observa que en todos los casos hay presencia de GSH total y que el principal aumento se da en el medio de los cisticercos tratados con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de auranofín, lo que corrobora nuestra hipótesis de que el exceso de GSSG puede ser expulsado por el cisticerco a fin de mantener su relación GSH/GSSG.

Para probar el segundo punto es necesario hacer más estudios para determinar la cantidad de GSH que formaría complejos con proteínas. Dicho

proceso se denomina glutationilación y se ha reportado como un mecanismo de respuesta ante el estrés oxidante [57]. En el caso del tercer punto tenemos evidencia indirecta de que la integridad del tegumento de los cisticercos no es responsable de la salida del glutatión. En la **Figura 1b** del artículo se observa que los cisticercos son viables debido a que presentan motilidad y no se tiñeron con el colorante vital (por tanto su membrana está intacta) y, a pesar de esto, es posible detectar un incremento de GSSG en el medio de mantenimiento por lo que inferimos que el cisticerco es el responsable de dicho incremento.

*5. El auranofín puede alterar la homeostasis redox en el cisticerco debido a la inhibición de la TGR.*

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

- i) Disminución de la reserva de Trx (y GSH en nuestro caso) reducida disponible, lo que conlleva a una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes dependientes de dicho(s) sustrato(s) y por esto promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno y una alteración generalizada de la homeostasis redox [24, 26].
- ii) La formación de un estado modificado de la TrxR en la cual el sitio activo de la enzima se encuentra inhibido irreversiblemente por compuestos electrofílicos (como el átomo de oro proveniente del auranofín). Dicho estado alterado conserva la actividad de NADPH oxidasa lo que promueve la traslocación de los electrones provenientes del NADPH al oxígeno (o compuestos derivados del nitrógeno) generando especies reactivas. Dichas enzimas alterada reciben el nombre de SecTRAP (Selenium-compromised-thioredoxin-reductase-derived-apoptotic proteins) y se ha demostrado su papel pro-oxidante y pro-apoptótico [58].

- iii) La inhibición de la TrxR promueve la apoptosis por disminuir el secuestro de factores pro-apoptóticos por parte de la Trx reducida o por el tránsito hacia condiciones más oxidantes [59, 60, 61].
- iv) La inhibición de la síntesis de deoxirribonucleótidos al disminuir la Trx en su forma reducida. Este sustrato provee de equivalentes reductores a la ribonucleótido reductasa [62].
- v) La disminución de la concentración de glutatión en su forma reducida disminuiría la capacidad de detoxificación del parásito vía la glutatión-S-transferasa [63].

Adicionalmente a esto, se ha demostrado que el auranofín inhibe la síntesis de selenoproteínas lo que junto con el punto ii compromete no solo la actividad de la TGR sintetizada sino que también evita su síntesis *de novo*.

## 6. El auranofín como antihelmíntico

La neurocisticercosis es un enfermedad parasitaria común que ataca el sistema nervioso central y es causada por la forma larval (cisticerco) de *T. solium* existiendo mayor incidencia en países en vías de desarrollo. En México se estima que en año de 2002, la incidencia de neurocisticercosis humana fue de 4.9 – 10.9%; afectando predominantemente a la población económicamente activa [64]. Sin embargo, se cree que estas cifras pueden ser subestimadas dado que muchos casos no son diagnosticados o solo son considerados aquéllos atendidos en una zona específica del país [65]. 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 [66].

Debido a la resistencia que generan diversos platelmintos parásitos contra los tratamientos existentes en la clínica [39] o a la dificultad para que dichos

tratamientos accedan de manera efectiva al sitio donde se localiza el parásito [67], se ha comenzado la búsqueda y diseño de nuevos fármacos. Sin embargo, el diseño de nuevos fármacos es un proceso demasiado largo y costoso por lo que la farmacología ha comenzado a investigar nuevos usos para fármacos ya existentes en el mercado lo que ahorraría considerables sumas de dinero a las compañías farmacéuticas y lo que, potencialmente, se traduciría en menores costos para el paciente y un menor tiempo de espera para sacar el medicamento a la venta [68]. En el caso particular del desarrollo de nuevos medicamentos para tratar las parasitosis ocasionadas por helmintos se debe en parte a la resistencia generada a los medicamentos ocupados actualmente en la clínica, a la búsqueda de compuestos que ataquen al parásito en sus diversos estadios en su ciclo de vida y a la necesidad en que el anti-helmíntico tenga una acción específica contra el parásito y que no tenga (o tenga el menor) efecto en el hospedero [69, 70]. En este sentido, la unión del sistema Trx y el sistema GSH en platelmintos parásitos (como los miembros del género *Taenia*) debido a la presencia de una única reductasa (TGR) capaz de tomar ambos sustratos y el contraste con los sistemas redox de su hospederos mamíferos en los cuales el GSH y la Trx son reducidos por su GR y TrxR, respectivamente, y donde la expresión de la TGR solo es apreciable en testículos [18] y la aparente pérdida de mecanismos redundantes que provean equivalentes reductores para la detoxificación de especies reactivas, síntesis de deoxirribonucleótidos, modulación de señalización redox y otros procesos fisiológicos vitales para el parásito hacen a la TGR un blanco farmacológico contra estos organismos debido a que la inhibición de esta enzima puede conducir a una pérdida en su capacidad para sintetizar ADN y una alteración en la homeostasis redox, lo que podría comprometer en gran medida la sobrevivencia del parásito [17].

Por otro lado, la capacidad del auranofín de inhibir en distintos grados a las selenoproteínas, principalmente a la familia de las TrxR [71, 72], su naturaleza hidrofóbica [26], la buena tolerancia de los humanos a tratamientos largos [27] y todo el conocimiento farmacológico desarrollado desde su introducción a la clínica

[73] han hecho que éste fármaco (y otras moléculas derivadas de oro) sean re-evaluados para estudiar su posible efecto anti-helmíntico. Los materiales y métodos a seguir se detallan en el Anexo II de este trabajo.

*7. El auranofín tiene un posible efecto en el modelo experimental de cisticercosis ocasionado por la forma larval (cisticerco) de T. crassiceps.*

En este caso, es posible observar que el auranofín parece tener un efecto *cisti-estático* y no *cisti-tóxico*; es decir, que el efecto se da en la capacidad para reproducirse asexualmente y no en la viabilidad del cisticerco (Figura Ea). Esto se deduce de observar que no hay diferencia significativa entre cantidad de cisticercos recuperados al inicio y final del tratamiento con auranofín. Esto se apoya en el hecho que la cantidad de cisticercos recuperados en ratones control se duplicó con respecto a los cisticercos obtenidos de ratones al inicio del tratamiento.

Otra posibilidad que se maneja es que el auranofín tenga un efecto *cisti-tóxico* pero que los cisticercos, en vez de calcificarse se hubieran reabsorbido por el hospedero. En ensayos previos observamos que al introducir cisticercos muertos en el peritoneo de un ratón el 95% de estos se reabsorben al cabo de unos días.

Sin embargo, el vehículo parece tener también un efecto *cisti-estático* por lo que se requieren más estudios para dilucidar por completo el papel del auranofín en la disminución de la capacidad reproductiva del cisticerco.

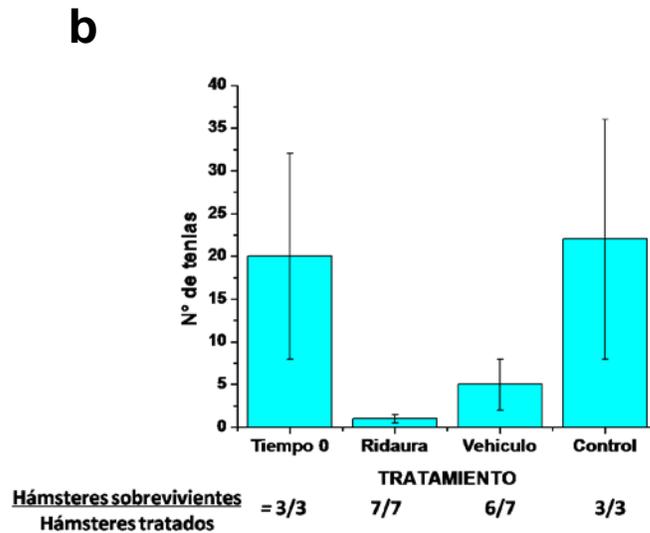
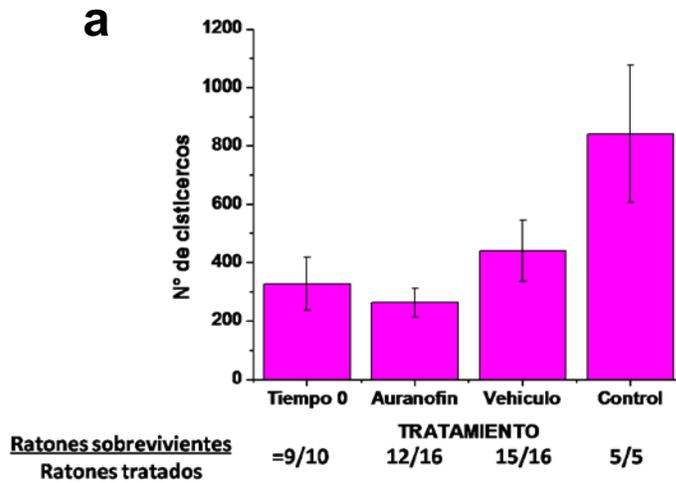
*8. El auranofín tiene un posible efecto en el modelo experimental de cisticercosis ocasionado por la forma adulta (tenia) de T. crassiceps.*

Para poder obtener la forma adulta de *T. crassiceps* se utilizó la cepa WFU en vez de la cepa HYG. Esto se debió a que la cepa HYG ha perdido su capacidad

infectiva en función de la cantidad de pases que ha tenido la cepa en nuestro laboratorio. La cepa WFU, en cambio, es una cepa que fue “regenerada” en el laboratorio de la Dra. Kaethe Willms y que presenta alta capacidad infectiva [37, 38] por lo que decidimos utilizar dicha cepa. En un ensayo previo se validó el uso de la cepa WFU al comparar las actividades de TGR de ambas cepas así como su inhibición con auranofín y se encontrara que no existe diferencia significativa entre la enzima de ambas cepas. El protocolo para la obtención del adulto y para la administración del fármaco se detalla en el Anexo II.

En este experimento podemos ver que el auranofín tiene un efecto letal en la forma tenia del parásito puesto que disminuye drásticamente la presencia de tenias con respecto al control (Figura Eb). Sin embargo, al coleccionar las heces de cada hámster (con una jaula metabólica) y disgregarlas, no se observó que el hámster arrojara tenias por lo que suponemos que al morir, éstas se reabsorben en el intestino del hospedero.

De igual modo al experimento anterior, observamos que el vehículo parece tener también un efecto tóxico en la tenia por lo que se requieren más estudios para definir el papel del auranofín en la teniasis.



**Figura E. Efecto del auranofín en las parasitosis ocasionadas por *T. crassiceps*.** En (a) se muestra el número de cisticercos recuperados de ratones Balb/c con dos meses de infección y tratados durante 14 días con una dosis de 24 mg / kg, mientras que en (b) se muestra el número de tenias recuperadas de hámsteres con un mes de infección y tratados durante 7 días con una dosis de 12 mg / kg. La metodología utilizada se explica en el Anexo II. El vehículo utilizado en el caso del modelo de cisticercosis experimental fue DMSO al 0.1% mientras que el vehículo usado en el modelo de teniasis experimental fue aceite al 50%. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar.

## RESUMEN DE RESULTADOS

El auranofín tiene un efecto letal dosis y tiempo- dependiente en los cisticercos de *T. crassiceps*.

El auranofín inhibe *in vivo* a la TGR.

El auranofín disminuye la concentración de glutatión total en el cisticerco y disminuye la relación GSH / GSSG

El auranofín puede alterar la homeostasis redox en el cisticerco debido a la inhibición de la TGR

El auranofín tiene un posible efecto en el modelo experimental de cisticercosis ocasionado por la forma larval (cisticerco) de *T. crassiceps*

El auranofín tiene un posible efecto en el modelo experimental de cisticercosis ocasionado por la forma adulta (tenia) de *T. crassiceps*.

## CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que el auranofín tiene un efecto letal dosis- y tiempo-dependiente en el cisticerco de *Taenia crassiceps* debido a que dicho fármaco inhibe a la TGR en condiciones *in vivo* y disminuye la concentración de GSH total y la relación GSH/GSSG. Adicionalmente, se sugiere que el auranofín tiene un efecto cisti-estático y tenia-tóxico en las parasitosis ocasionadas por la forma larval y adulta del cisticerco de *T. crassiceps*, respectivamente. Debido a esto, se propone a la TGR como un blanco farmacológico para el diseño de nuevos fármacos contra las parasitosis ocasionadas por el género *Taenia* y otros platelmintos parásitos.

## PERSPECTIVAS

A pesar que diversas enzimas que regulan la homeostasis redox (entre ellas, la TGR) se han propuesto como posibles blancos farmacológicos para controlar y erradicar diversas parasitosis de importancia médica y veterinaria, poco se sabe sobre como dichas enzimas participan en el control de la homeostasis redox del parásito y cuál es el efecto que conlleva su inhibición. Los estudios *in vitro* del efecto del auranofín en los cisticercos nos indicaron que hay una relación dosis-dependiente entre la mortalidad de éstos y la inhibición de la actividad de la TGR, sin embargo, no conocemos los efectos que tiene la inhibición de esta reductasa en el organismo, en particular ¿Cuál es la relación redox del glutatión y la tiorredoxina en el cisticerco de *T. crassiceps* en condiciones basales? ¿Cómo se modifican este equilibrio en presencia de auranofín u otros inhibidores? ¿El desequilibrio en la homeostasis redox ocurre en el cisticerco de manera localizada o generalizada? ¿La muerte del parásito se debe a la pérdida en la capacidad de detoxificar especies reactivas de oxígeno ó a la activación vías de señalización que responden a un alto estrés oxidante? Es en este sentido que este trabajo es un punto de partida para un estudio integral de los sistemas redox con miras a comprender la biología del parásito.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] CIRCU, M.L. y T.Y. AW. 2010. Reactive oxygen species, celular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, **48**: 749-762
- [2] BRANDES, N., S. SCHMITT y U. JAKOB. 2009. Thiol-Based Redox Swiches in Eukaryotic Proteins. *Antioxidants & Redox Signalling*, **11(5)**: 997-1013
- [3] 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
- [4] HANSEN, J.M., Y.M. GO y D.P. JONES. 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**: 215-234
- [5] MEYER, A.J. 2008. The integration of glutathione homeostasis and redox signalling. *Journal of Plant Physiology*, **165(13)**: 1390-1403
- [6] DRÖGUE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**: 47-95
- [7] 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
- [8] ANDERSON, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* **111(112)**: 1-14
- [9] KALININA, E.V., N.N. CHERNOV y A.N. SAPRIN. 2008. Involvement of Thio-, Peroxi-, and Glutaredoxins in Cellular Redox- Dependent Processes. *Biochemistry (Moscow)* **73(13)**: 1493-1510

- [10] D'AUTRÉAUX, B. y M. B. TOLEDANO. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Review Molecular Cell Biology*, **8**: 813-824
- [11] ARNÉR, E.S.J., y A. HOLMGREN. 2006. The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **16**: 420-426
- [12] ZHANG, H., Y.M. GO y D.P. JONES. 2007. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **465**: 119-126
- [13] JEŽEK, P., y L. HLA VATÁ. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 2478-2503
- [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] 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
- [16] 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
- [17] 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

- [18] 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
- [19] 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
- [20] 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.
- [21] 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
- [22] GUEVARA- FLORES, A., J.P. PARDO y J.L. RENDÓN. 2011. Hysteresis in thioredoxin-glutathione reductase (TGR) from the adult stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasitology International* 60(2): 156-160
- [23] 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
- [24] JACKSON-ROSARIO, S.E. y W.T. SELF. 2010. Targeting selenium metabolism and selenoproteins: Novel avenues for drug discovery. *Metallomics*, **2(2)**: 112-116
- [25] SIGLER, J.W. 1983. Parenteral gold in the treatment of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine* **30**: 59-62

- [26] GANDIN, V., A.P. FERNANDES, M.P. RIGOBELLO, B. DANI, F. SORRENTINO, F. TISATO, M. BJÖRNSTEDT, A. BINDOLI, A. STURARO, R. RELLA y C. MARZANO. 2010. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochemical Pharmacology* **79**: 90-101
- [27] BLODGETT Jr., R.C. 1983. Auranofin: experience to date. *The American Journal of Medicine* **30**: 86-89
- [28] BLOCKA, K. 1983. Auranofín versus injectable gold: comparison of pharmacokinetic properties. *The American Journal of Medicine* **30**: 114-122
- [29] PECHENICK, J.A. 2000. *Biology of the invertebrates*. Cuarta edición. McGraw Hill, New York, US, pp.143-167
- [30] BRUSCA, R. y G. BRUSCA. 2003. *Invertebrates*. Segunda edición. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts, Estados Unidos; pp. 285-318
- [31] SMYTH, J.D., y D.P. McMANUS. 1989. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press. Cambridge, UK pp. 5-21
- [32] RUGEIRO, E., e I. NOEMI. 1999. Teniasis. *en* *Parasitología Médica*. ATIAS, A. (ed.). Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago, Chile pp 194-200
- [33] 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
- [34] SAEED, I., C. MADDIX-HYTTEL, J. MONRAD, Y C.M.O. KAPEL. 2006. Helminthes of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology* **139**: 168-179
- [35] KASSAL, T. 1999. *Veterinary Helminthology*. Butterworth Heinmann. Londres, U.K., pp.27-42

- [36] CHOU, C-Y. y R.S. FREEMAN. 1976. Intraperitoneal Passage of *Taenia crassiceps* in Rats. *The Journal of Parasitology*, **62(5)**: 837-839
- [37] WILLMS, K., L. ROBERT, J.A. JIMÉNEZ, M. EVERHART y R.E. KUHN. 2004. Ultraestructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps strobilae* WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taennidae) from golden hamsters. *Parasitology Research*, **93**: 262-267
- [38] ZURABIAN, R., L. AGUILAR, J.A. JIMÉNEZ, L. ROBERT Y K. WILLMS. 2008. Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. *Parasitology* **94**:1 1-6
- [39] 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 reductasa from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Medicine* **4(6)**: e206
- [40] 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 reductasa and dependent on selenium and glutathione. *The Journal of Biological Chemistry* **283(26)**: 17898-17907.
- [41] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.J., A. GUEVARA-FLORES, G. ÁLVAREZ, J.L. RENDÓN-GÓMEZ y I.P. DEL ARENAL. 2010. In vitro killing action of auranofin on *Taenia crassiceps* (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). *Parasitology Research* **107(1)**: 227-231
- [42] GUEVARA- FLORES, A. 2004. Caracterización parcial del sistema de glutatión y de tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, pag. 31

- [43] OTERO, L., M. BONILLA, A.V.PROTASIO, C. FERNÁNDEZ, V.N. GLADYSHEV y G. SALINAS. 2010. Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths. *BMC Genomics*, **11**: 237
- [44] 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
- [45] 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.
- [46] ANGELUCCI, F., A.E. MIELE. G. BOUMIS, D. DIMASTROGIOVANNI, M. BRUNORI y A. BELLELI. 2008. *Proteins*, **72**: 936-945.
- [47] RIGOBELLO, M.P. y A. BINDOLI. 2010. Mitochondrial Thioredoxin Reductase: Purification, Inhibitor Studies and Role in Cell Signaling. *Methods in Enzymology*, **474**: 109-122
- [48] BHABAK, K. P., B. J. BHUYAN y G. MUGESH. 2011. Bioinorganic and medicinal chemistry: aspects of gold (I)-protein complexes. *Dalton Transactions* 40(10): 2099-2111
- [49] 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
- [50] PAULSEN, C.E. y K.S. CAROLL. 2010. Orchestrating Redox Signalling Networks through Regulatory Cysteine Switches. *ACS Chemical Biology*. **5(1)**: 47-62
- [51] FILOMENI, G., G. ROTILLO y M.R. CIRIOLO. 2005. Disulfide relays and phosphorylative cascade: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1555-1563

- [52] JOHANSSON, L., G. GAFVELIN, y E.S.J. ARNÉR. 2005. Selenocysteine in proteins – properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta* **1726**: 1-13
- [53] 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing side-reaction of respiratory complex I with O<sub>2</sub>. *Parasitology International* **54**: 185-193
- [54] 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
- [55] AKERBOOM, T.P.M., y H. SIES. 1981. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, **77**: 373-378
- [56] PLANCARTE, A., J.L. RENDÓN y A. LANDA. 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitology Research*, **93**: 137-144
- [57] BISWAS, S., A.S. CHIDA Y I. RAHMAN. 2006. Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling. *Biochemical Pharmacology* **71**: 551-564
- [58] 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
- [59] 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
- [60] RIGOBELLO, M.P., G. SCUTARI, A. FOLDA, y A. BINDOLI. 2004. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and

concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochromo c. *Biochemical Pharmacology* **67**: 689-696

[61] RIGOBELLO, M.J., L. MESSORI, G. MARCON, M.A. CINELLU, M. BRAGADIN, A. FOLDA, G. SCUTARI, y A. BINDOLI. 2004. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**: 1634-1641. CHONG, C.R. y D.J. SULLIVAN Jr. 2007. New uses for old drugs. *Nature* **448(9)**: 645-647

[62] 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

[63] TORRES-RIVERA, A. y A.LANDA. 2008. Glutathión transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica*, **105**: 99-112

[64] 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

[65] FLEURY, A., J.M. GARCÍA, P. VALDEZ- AGUERREBERE, M. SAYVE-DURÁN, P. BECERRIL- RODRÍGUEZ, C. LARRALDE y E. SCIUTTO. 2010. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4(8)**: e805

[66] FLISSER, A., D. CORREA, y C.A.W. EVANS. 2002. *Taenia solium* Cysticercosis : new and revisited inmunological aspects. *en Taenia solium cysticercosis: from basic to clinical science*. SINGH, G. y S. PRABHAKAR (eds.). CABI Publishing. New York, US, pp.15-24

[67] FLEURY, A., R. CARRILLO- MEZO, A. FLISSER, E. SCIUTTO y T. CORONA. 2011. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **9(1)**: 123- 133

- [68] CHONG, C.R. y D.J. SULLIVAN Jr. 2007. New uses for old drugs. *Nature* **448(7154)**: 645-646
- [69] CIOLI, D., C. VALLE, F. ANGELUCCI y A.E. MIELE. 2008. Will new antischistosomal drugs finally emerge? *TRENDS in Parasitology* **24(9)**: 379-382
- [70] SAYED, A.A., A. SIMEONOV, C.J. THOMAS, J. INGLESE, C.P. AUSTIN y D. L. WILLIAMS. 2008. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nature Medicine*, **14**: 407-412
- [71] 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
- [72] GROMER, S., L.D.ARSOTT, 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
- [73] FINKELSTEIN, A.E., D.T. WALZ, V. BATISTA, M. MIZRAJI, F. ROISMAN y A. MISHNER. 1976. Auranofin: new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* **35**: 251-257

## ANEXO I

### PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL Y DISULFURO DE GLUTATIÓN POR EL MÉTODO DE AKERBOOM MODIFICADO.

#### *-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 18 g. Cada ratón fue inoculado intraperitonealmente con 20 cisticercos 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, se lavaron de 3 a 4 veces con una solución amortiguadora estéril de fosfato-salina (PBS) 10 mM, pH 7.4 [53].

#### *-Tratamiento con Auranofín.*

Los cisticercos se incubaron en matraces de 50 mL con medio RPMI 1640 (GIBCO) 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 [Tiempo 0]. El medio de mantenimiento fue preparado acorde a lo reportado en Martínez-González y colaboradores [41]. Posteriormente se agregó al medio, en condiciones estériles, auranofín (Alexis Biochemicals) a partir de una solución stock 10 mM en DMSO (MERCK) al 100% para obtener una concentración final de 0 [tiempo 0], 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0  $\mu$ M en un volumen final de 20 mL y se incubaron horas a 37 °C en agitación (126 rpm). Transcurridas 13 horas, se recuperaron los cisticercos, se lavaron con PBS dos veces, se decantaron perfectamente y se separaron porciones para llevar a cabo las determinaciones de glutatión total o del disulfuro de glutatión. Adicionalmente, una fracción de los cisticercos se procesaron inmediatamente después de ser recuperados de la cavidad intraperitoneal del ratón [Basal].

- *Obtención de extractos neutros de cisticercos para la determinación de glutatión y disulfuro de glutatión.*

Para tal fin, se siguió el método propuesto por Akerboom y Sies [55] con algunas modificaciones: Los cisticercos fueron homogeneizados manualmente con un vástago de teflón en presencia de ácido perclórico 2M (en una proporción 1:1) a 4° C. A continuación, la muestra se centrifugó a 40 000 RPM (Rotor 65 Ti, Beckman) durante 1 hora a 4°C. Se recuperó el sobrenadante desproteinizado, se neutralizó con una solución de 2M KOH, 0.3 ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS, SIGMA) a 4°C a pH 7 y se dejó reposar el extracto en hielo para favorecer la precipitación y eliminación del KCl. Se filtró el extracto neutralizado, se centrifugó a 14 000 g en la microfuga por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante para realizar inmediatamente las determinaciones de GSH<sub>T</sub> y GSSG.

-*Determinación de glutatión total soluble (GSH<sub>T</sub>: GSH + GSSG)*

En una celda se colocó 50 µL del extracto neutralizado y buffer de fosfatos 100 mM + 1 mM EDTA en un volumen final de 1 mL. Adicionalmente, se agregó NADPH y DTNB a una concentración final de 128 µM y 582 µM respectivamente.

La muestra se incubó durante 10 minutos a 25°C. Pasado este tiempo, se agregó 2 µL de glutatión reductasa de levadura (SIGMA, de 25-75 u/mg) para iniciar la reacción y se siguió la aparición de TNB<sup>-</sup> a 412 nm.

- *Determinación del disulfuro de glutatión (GSSG)*

En la cubeta se colocó lo mismo que en la anterior determinación a excepción del DTNB. Se dejó avanzar el ensayo (a 25°C) durante 5 min para obtener la línea basal y se comenzó la reacción al agregar 2 µL de GR de levadura (dilución 4:1). Se registró la desaparición de NADPH a 340 nm.

## ANEXO II

### PROTOCOLO PARA EL TRATAMIENTO DE ORGANISMOS PARASITADOS CON LA FORMA LARVAL Y ADULTA DE *Taenia crassiceps*.

- *Extracción del principio activo de las tabletas de Ridaura.*

Para evaluar el efecto del auranofín en las parasitemias ocasionadas por *T. crassiceps* se tomaron 20 tabletas de Ridaura (Goldshield Pharmaceuticals Ltd; 3 mg/tableta) y se disolvieron en 20 mL de agua y 20 mL de aceite comestible en constante agitación. La suspensión hecha se centrifugó a 15 000 RPM (Rotor SS34, SORVALL) a 4 °C durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se midió el volumen, se volvió a centrifugar en las condiciones antes descritas, se volvió a recuperar el nuevo sobrenadante y se almacenó en un frasco ámbar en refrigeración. Los precipitados fueron resuspendidos en 7 mL de agua y 7mL de aceite procediendo a hacer una reextracción por la metodología antes descrita. El sobrenadante obtenido en esta fase fue adicionado al obtenido en el primer paso manejando la cantidad de auranofín recuperado como el 100 % del presente en las tabletas originalmente.

- *Evaluación del efecto del auranofín en el modelo de cisticercosis de T. crassiceps.*

Se trataron oralmente ratones Balb/c infectados con cisticercos de *T. crassiceps* (dos meses de infección) con el extracto de auranofín con una dosis de 24 mg/ Kg por 14 días mientras que otro lote igual fue tratado con el vehículo (solución de DMSO al 1%) y otros ratones sirvieron de control. Pasado el tiempo de tratamiento los ratones fueron sacrificados y los cisticercos fueron recuperados para evaluar la cantidad de cisticercos obtenidos, el porcentaje de gemación y el porcentaje de calcificación.

- *Evaluación del efecto del auranofín en el modelo de teniasis de T. crassiceps.*

Para evaluar dicho efecto se siguió el protocolo modificado para la obtención de la forma adulta de *T. crassiceps* reportado por Willms y colaboradores [37]. Brevemente: se desparasitaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) machos de tres meses de edad administrando vía oral una suspensión de albendazol (Zentel; 200 mg / tableta) a una dosis de 40 mg por kilogramo de peso por cinco días. Después se suspendió la administración del albendazol y se dejó reposar a los hámsteres por 7 días para permitir la excreción de las reminiscencias del antiparasitario. Pasado el tiempo de reposo, se inmunosuprimió a los hámsteres con 2 mg de metil-prednisolona (Depo-Medrol, Pfizer; 40 mg/mL) vía intramuscular. De aquí en adelante, se inmunosuprimieron los hámsteres cada 14 días para promover el establecimiento y mantenimiento de la infección.

Un día después de la primera inmunosupresión, a cada hámster se administró vía oral 50 cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa WFU (donada generosamente por la Dra. Kaethe Willms) por medio de una cánula para asegurar que todos los cisticercos fueran ingeridos por el hámster. Se dejó a los hámsteres inoculados por 2 semanas para promover la infección y establecimiento de las tenias. Al término de este tiempo los hámsteres fueron tratados con la suspensión de Ridaura a una dosis equivalente de 12 mg/ auranofín por kilogramo de peso durante 7 días. Algunos hámsteres fueron tratados solo el vehículo mientras que otros no fueron tratados a manera de control.

Pasado el tiempo de tratamiento, los hámsteres fueron sacrificados y se les diseccionó el intestino delgado para recuperar las tenias obtenidas, registrando su tamaño, número y viabilidad.