



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
DE LA TIORREDOXINA GLUTATIÓN REDUCTASA
DEL TREMATODO *Fasciola hepatica*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

MAURICIO MIRANDA LEYVA

ASESOR: Dr. JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ.





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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
DE LA TIORREDOXINA GLUTATIÓN REDUCTASA
DEL TREMATODO *Fasciola hepatica*

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIOLOGO

PRESENTA

MAURICIO MIRANDA LEYVA

Comité Tutorial:

Dr. Juan Luís Rendón Gómez

Dr. Sergio González Moreno

Dr. Roberto Velasco García

Dr. Hugo V. Perales Vela

Dr. Rafael Villalobos Molina

La presente Tesis fue realizada en el Departamento de bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y fue apoyada con una beca del proyecto IN236002-3 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

JURADO:

PRESIDENTE: Dr. Sergio González Moreno

VOCAL: Dr. Roberto Velasco García

SECRETARIO: Dr. Juan Luís Rendón Gómez

SUPLENTE: Dr. Hugo V. Perales Vela

SUPLENTE: Dr. Rafael Villalobos Molina

DEDICATORIA

El presente trabajo quiero dedicárselo primeramente a mis queridos padres, por el cariño y el apoyo que me brindaron durante todos mis estudios, por creer y confiar en mí desde el momento en que ingresé a la universidad.

A mis queridos hermanos Jaime, Leonardo, Manuel y Analy, por confiar en mi y por su gran apoyo en todos los ámbitos, lo cual me permitió continuar mis estudios hasta lograr concluir la carrera.

A mis queridos familiares, en especial a mis tíos Gonzalo Miranda Sánchez., José Miranda S., Roberto Miranda S., Javier Miranda S., Alfonso Miranda S., Rafael Leyva S., Salvador Leyva S., Enrique Leyva S. y Juan Monroy Leyva; por el apoyo familiar, el mutuo aprecio y por la convivencia que día con día permite fortalecer la armonía en la familia, lo cual me llena de felicidad...

A mis amigos Juan Velázquez C., Francisco Reyes L., Juan Garrido y Miguel García B., por la amistad y los momentos de alegría que vivimos durante nuestra adolescencia.

A mis amigos de la Preparatoria Jesús Gutiérrez, Ulises Sánchez, José Luís Máximo y Jonán Mejía, por la amistad, el apoyo y por los logros reconocidos que en algún momento obtuvimos. A José Guadalupe por la amistad y por mostrarme su buen ejemplo a seguir.

A mis amigos de la Facultad Moisés, Mario, Alberto, Roberto, Eduardo, Rafael, Vicky y Enrique Becerril, por el apoyo, su compañía y amistad. A Areli Cruz C., por su apoyo durante la carrera y por el cariño que alguna vez compartimos.

A mis amigos del trabajo LCB. Edgar Neri C., IBQ. Ricardo Calvillo., IBT. Vicente Rivera y QBP. Miriam Delgadillo M., QFB. Guadalupe Guzmán y Tec. Alberto Gómez H., por la amistad y su apoyo laboral. Al M. en C. Gabriel Rosas R., por permitir que seamos buenos amigos y por la enorme confianza y aprecio.

A mis amigos Joel, Sergio Bautista y Ulises Ocaña, por la confianza, el gran aprecio y por los muchos momentos de alegría que hemos compartido, lo cual han hecho momentos inolvidables en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres por todo el apoyo que me proporcionaron, sus buenos consejos, por tenerme siempre en un buen criterio y por quererme tanto como yo a ellos... A mis hermanos Leonardo y Jaime de quienes también recibí mucho apoyo y siempre confiaron en mí...

De manera especial a mi querida universidad (U.N.A.M), por haberme dado la oportunidad de formar parte de ella y darme una formación profesional científica, lo cual hizo que se cumpliera uno de mis más grandes sueños...

A mi facultad (FES-I) por todos los recursos invertidos en mi formación profesional y por los conocimientos y valores que me proporcionaron.

De manera especial a mi director de Tesis Dr. Juan Luis Rendón Gómez, por todo su apoyo en la realización del presente proyecto, por su paciencia, por el tiempo dedicado en mí y por sus conocimientos transmitidos.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, por el apoyo proporcionado durante la realización el presente proyecto de investigación.

A mis sinodales Dr. Sergio González Moreno, Dr. Hugo V. Perales Vela, Dr. Rafael Villalobos Molina; quienes contribuyeron de manera importante en la revisión del presente. En especial al Dr. Roberto Velasco García por sus valiosas sugerencias a fin de mejorarlo.

A todos los profesores que participaron en mi formación y que se esmeraron por transmitir sus valiosos conocimientos. En especial al Biól. Nicolás Sánchez y Biól. Arnulfo Reyes M., M. en C. Luis Barbo Hernández P., IBQ. Gustavo Valencia del toro, Biól. Arturo Tovar M., Biól. Héctor Barrera E., M. en C Teresa Ramírez, Biól. José Luis Tello M., Biól. José Antonio Martínez y Biól. José Felipe Cruz L., Biól. Alberto de la Concha P., Biól. María del Pilar Villeda C. y M. en C. Sergio Stanford C., Biól. Adrian Tizóc Altamirano, M. en C. Rafael Chávez L., Biól. Ángel Morán S. y Dr. Sergio Cházaro O., M. en C. David de los Cobos y Dra. Beatriz Vásquez C., M. en C. Gloria Paniagua, M. en C. Laura Castañeda., M. en C. Leonor Abundis, M. en C. Ana Lilia Muñoz y QFB. Esperanza Robles.

A todos ellos..... muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
0.- Resumen.....	1
1.-Introducción	3
1.1- La Fasciolosis y su distribución	3
1.2.- Generalidades de <i>Fasciola hepatica</i>	4
1.2.1.- Sistemática.....	4
1.2.2.- Morfología	5
1.2.3.- Ciclo biológico.....	8
1.3.- Papel del oxígeno.....	10
1.4.- Radicales libres	11
1.5.- Especies reactivas de oxígeno (EOR).....	11
1.5.1.- Anión superóxido.....	11
1.5.2.- Peróxido de hidrógeno.....	12
1.5.3.- Radical hidroxilo.....	12
1.6.- Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.....	13
1.6.1.- Vitaminas y β - Carotenos	13
1.6.2.- Glutación (estructura química).....	14
1.6.2.1.- Biosíntesis del glutación	15
1.6.2.2.- Funciones del glutación.....	15
1.7.- Mecanismos antioxidantes enzimáticos	16
1.7.1.- Superóxido dismutasa.....	16
1.7.2.- Catalasas	16
1.7.3.- Glutation peroxidasa.....	16
1.7.4.- Glutación reductasa.....	17
1.7.5.- Tiorredoxina peroxidasa.....	17
1.8.- Tiorredoxina	17
1.8.1.- La tiorredoxina de <i>Fasciola hepatica</i>	19
1.8.2.- Tiorredoxina reductasa.....	20
1.8.3.- Glutarredoxina	20
1.9.- Tiorredoxina glutación reductasa (TGR).....	21
1.9.1.- Estructura de la TGR	21
1.9.2.- Mecanismo catalítico de la TGR	21
1.9.3.- Comportamiento histérico.....	23
1.9.4.- Regulación de la biosíntesis.....	23
2.- Justificación	24
3.- Hipótesis	24

4.- Objetivos	24
4.1.- General	24
4.2.- Particular	24
5.- Material y métodos	25
5.1.- Purificación de la TGR	25
5.1.1.- Obtención de adultos de <i>Fasciola hepatica</i>	25
5.1.2.- Obtención del extracto crudo	25
5.1.3.- Obtención de la fracción citosólica	26
5.1.4.- Precipitación de proteínas	26
5.1.5.- Diálisis	26
5.1.6.- Cromatografía	27
5.1.6.1.- Cromatografía de intercambio iónico	27
5.1.6.2.- Cromatografía de afinidad	28
5.1.7.- Ultrafiltración	28
5.1.8.- Cuantificación de proteína (Método de Bradford)	28
5.1.9.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
5.2.- Caracterización cinética	29
5.2.1- Actividad de tiorredoxina reductasa	29
5.2.2.- Actividad de glutatión reductasa	30
5.2.3.- Actividad de glutarredoxina	30
5.2.4.- Cinética histérica	31
5.2.5.- Parámetros cinéticos (K_m y V_{max})	32
5.2.6.- pH optimo	32
5.3.- Caracterización molecular	32
5.3.1.- Masa molecular de la subunidad	32
5.3.2.- Pruebas de inhibición enzimática	33
5.3.3.- Concentración inhibitoria al 50% ($CI_{50\%}$)	33
5.3.4.- Secuencia del extremo N- terminal	33
5.3.5.- Análisis <i>in silico</i>	34
6.0.- Resultados	35
7.0.- Discusión	51
8.0.- Conclusiones	60
9.0.- Bibliografía	61

RESUMEN

MIRANDA LEYVA MAURICIO. Purificación y caracterización bioquímica de la tiorredoxina glutatión reductasa del trematodo *Fasciola hepatica*. (Bajo asesoría del Dr. Juan Luis Rendón Gómez).

Fasciola hepatica es el agente etiológico de la fasciolosis, infección que se caracteriza por causar edema y destrucción del tejido hepático. Esta parasitosis afecta a una variedad de vertebrados incluyendo al hombre, por lo que ocasiona problemas de salud pública y pérdidas económicas importantes en el sector pecuario. El parásito se encuentra expuesto a especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la respuesta inmune del hospedero, e incluso producidas por su propio metabolismo. Entre sus mecanismos de protección se conocen la tiorredoxina (trx), superóxido dismutasa (SOD) y una tiorredoxina reductasa (TR); sin embargo, en otros parásitos altamente emparentados (*Echinococcus granulosus*, *Schistosoma mansoni* y el metacéstodo de *Taenia crassiceps*) se ha descrito la existencia de la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) que participa activamente en la defensa antioxidante contra las ERO, y dado su emparentado filogenético se sugirió la posible existencia en *Fasciola hepatica*.

En el presente estudio se logró extraer una proteína catalítica a partir de la fracción citosólica del adulto de *F. hepatica*. La enzima se obtuvo en un 40-80% de saturación con $(\text{SO}_4)_2 \text{NH}_4$. La fracción resultante fue dializada y separada por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-sef) y cromatografía de afinidad (2',5'-ADP). La muestra obtenida tuvo la capacidad de ejercer actividad de tiorredoxina reductasa (34 U mg^{-1}) y glutatión reductasa (31 U mg^{-1}) con DTNB y GSSG respectivamente. El análisis de pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) reveló la presencia de una banda con masa molecular de $63 \pm 2 \text{ kDa}$. Se obtuvo una K_m $100 \mu\text{M}$ (DTNB) y $42 \mu\text{M}$ (GSSG), K_{cat} monomérica 35.7 seg^{-1} (DTNB)

y 32.55 seg^{-1} (GSSG), y eficiencia catalítica de $357000 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ y $775000 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ respectivamente.

La enzima ejerció actividad de glutarredoxina (54 U mg^{-1}) e interesantemente efectuó una cinética histórica que fue dependiente de la concentración de GSSG en el ensayo. La enzima mostró actividad óptima a pH 6.4 (DTNB) y 7.8 (GSSG). Las pruebas de inhibición mostraron su bloqueo total con auranofin. Se determinó una $\text{CI}_{50\%}$ 1 nM (DTNB) y 0.63 nM (GSSG). La secuencia del extremo N-terminal efectuado por la degradación de Edman mostró el 52% de homología con la TGR de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*, dado que no se detectó similitud con ninguna tiorredoxina reductasa, se llegó a la conclusión de que la enzima descrita se trata de una TGR, la cual pudiera ser la responsable de regenerar el estado reducido de la tiorredoxina y glutatión, y que podría estar sustituyendo a la TR y GR convencionales en *Fasciola hepatica*.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- La fasciolosis y su distribución.

Las infecciones provocadas por protozoos y helmintos causan el 30% de todas las parasitosis en el mundo, siendo responsables de una morbilidad y mortalidad superior a cualquier otra clase de patógenos. En la actualidad los problemas de salud pública y veterinaria se han incrementado debido a la generación de resistencia a los fármacos, por lo que se ha despertado gran interés en la comunidad científica por desarrollar vacunas y fármacos más potentes, selectivos, seguros e inocuos (Abbas *et al.*, 2004; citado por Naranjo, 2009). *Fasciola hepatica* o duela del hígado, es el agente que causa la fasciolosis, infección que se caracteriza por destruir los conductos biliares y formar microabscesos necróticos que se convierten en nódulos amarillentos, caseosos y con signos de inflamación crónica (Romero, 1993). En algunos casos el parásito también ha llegado a infectar los pulmones (Urquhart *et al.*, 2001). Entre los principales hospederos se encuentran bovinos, ovinos, caprinos, equinos, porcinos y accidentalmente el hombre (García, 1987).

La fasciolosis en los humanos ha sido un problema de salud pública en casi todo el mundo, se estima que afecta aproximadamente a 17 millones de personas en 51 países del mundo (Mas-Coma *et al.*, 2005). Entre los países latinoamericanos con mayor abundancia se encuentra Chile, Argentina, Ecuador, Bolivia y Perú (Botero *et al.*, 2003). En México existen casos documentados en la mayoría de las entidades; sin embargo, el Estado de Puebla ha sido el de mayor número de diagnósticos (Lamothe *et al.*, 1988).

La fasciolosis bovina es una de las parasitosis más costosas en la ganadería a nivel mundial, ya que un bovino infectado disminuye su producción (carne y leche), provoca infertilidad o alto riesgo de aborto, ocasiona trastornos digestivos y desnutrición que conducen finalmente a la muerte, y en un bovino infectado se decomisan las vísceras a nivel de mataderos, lo que crea la necesidad de adquirir medicamentos cada vez más costosos (Naranjo, 2009). Esta infección se distribuye con mayor frecuencia en el Norte de África, Oeste de Europa y toda Hispanoamérica (Mas-Coma *et al.*, 2005). En México se ha detectado en toda la república (Lamothe *et al.*, 1988); sin embargo, las cuencas lecheras del Estado de Hidalgo han sido zonas de alta endemia (Romero, 1993).

1.2.- Generalidades de *Fasciola hepatica*.

1.2.1.- Sistemática (Tomado de Mehlhorn *et al.*, 1993 & Gallego, 1969).

REINO: Animalia

PHYLLUM: Platyhelminthes

CLASE: Trematoda

SUBCLASE: Digenea

ORDEN: Echinostomida

SUBORDEN: Fasciolata

FAMILIA: Fasciolidae

GÉNERO: *Fasciola*

ESPECIE: *hepatica*

1.2.2.- Morfología de *Fasciola hepatica*.

El adulto se caracteriza principalmente por su aplanamiento dorsoventral, presenta forma foliácea y el extremo anterior termina en cono. Mide 2.0- 3.0 cm de largo x 1.0 cm de ancho y muestra una pigmentación café claro debido a la pigmentación biliar (Botero *et al.*, 2003) (Fig. 1).



Fig. 1. Morfología externa de *Fasciola hepatica* (Biodidac, [http: www.//images.google.com.mx](http://www.//images.google.com.mx)).

En la parte ventral del extremo anterior se encuentra la boca que está rodeada por una ventosa oral, la cual es seguida del gonoporo (poro genital) por el cual expulsa los huevecillos. En la parte ventral media se encuentra el acetábulo que le sirve como estructura de fijación. En el extremo posterior se localiza el poro excretor (Ruppert *et al.*, 1996) (Fig. 2).

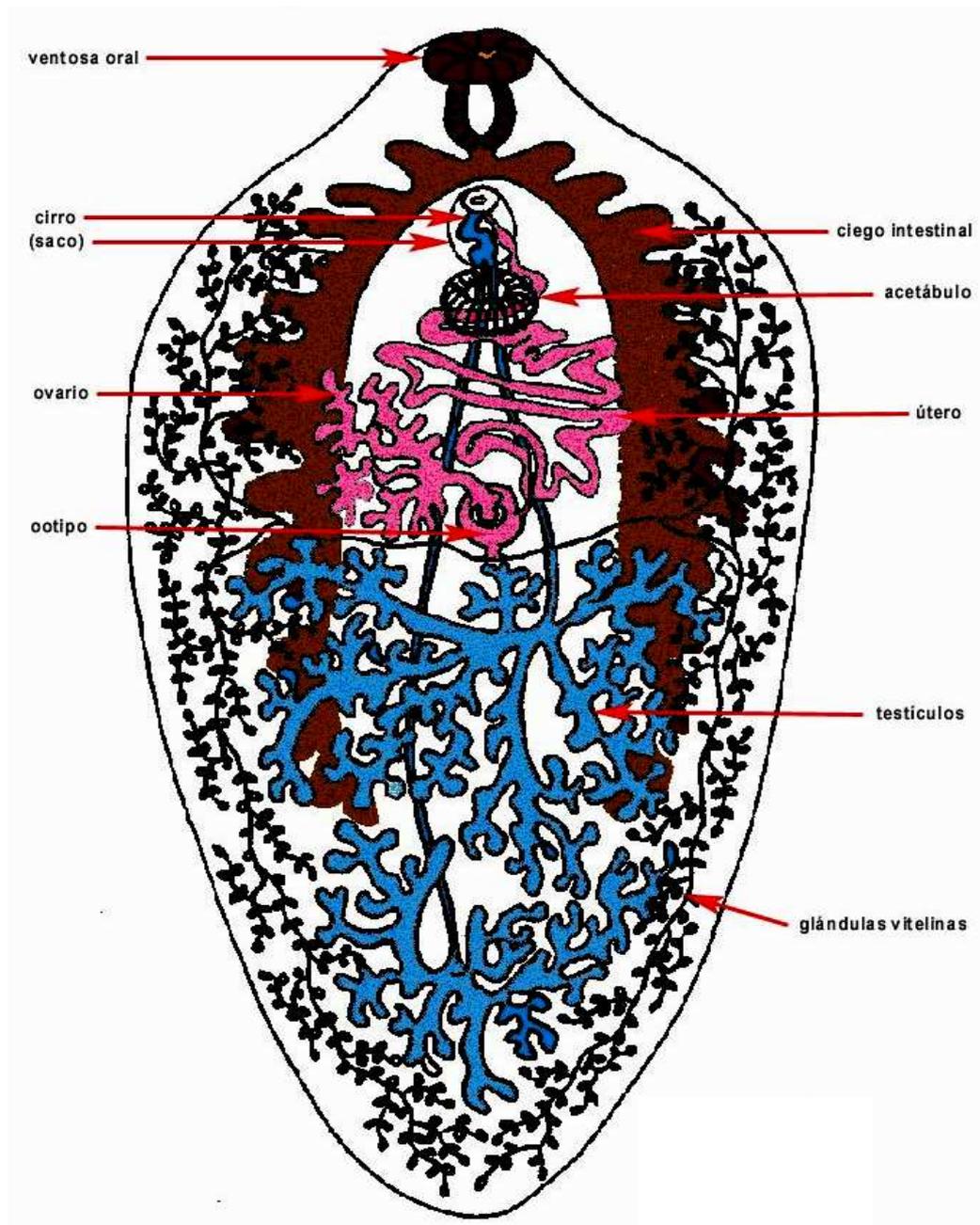


Fig. 2. Morfología interna de *Fasciola hepatica* adulto (Tomado de Biodidac, <http://www.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/images/fasciolastruc-b.jpg>).

La pared corporal presenta microvellosidades a modo de espinas y se encuentra conformada por una epidermis o tegumento de naturaleza sincitial, el cual realiza las funciones de protección, absorción de nutrientes y excreción de desechos. Los núcleos celulares se encuentran hundidos en una segunda capa llamada parénquima (Meglitsch, 1972) (Fig. 3).

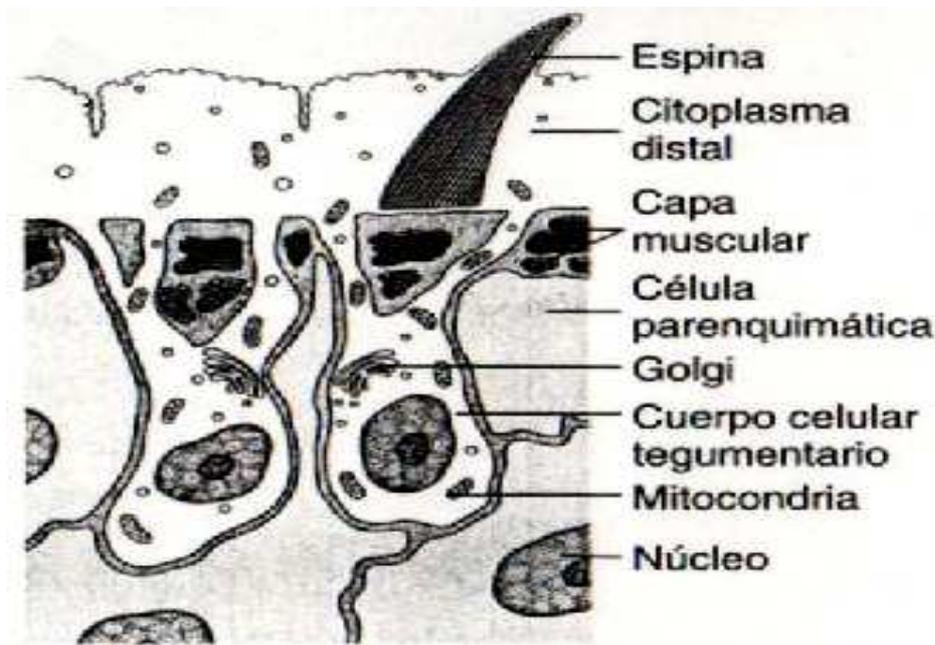


Fig. 3. Pared corporal. En trematodos, cestodos y monogeneos los cuerpos celulares del sincitio tegumental se encuentran hundidos debajo de la capa externa y se comunican a través de prolongaciones que se extienden entre los músculos (Tomado de Ruppert *et al.*, 1996).

El sistema digestivo de trematodos es de tipo incompleto (un solo orificio). La boca continúa en una faringe bulbosa y termina en un esófago corto que se bifurca para formar un par de intestinos ciegos que se extienden a lo largo del cuerpo para transportar el alimento (Fig. 2). Son anaerobios facultativos y presentan sistema excretor protonefridial constituido por células en “flama” (solenocitos) (Ruppert *et al.*, 1996).

Fasciola hepatica es un organismo hermafrodita. El aparato reproductor masculino se encuentra conformado por dos testículos ramificados, cada uno con un conducto deferente que se une a un espermiducto y termina en un cirro (órgano copulador), el cual puede estar retraído en una bolsa y emerger por el gonoporo en el momento de la cópula. El sistema reproductor femenino consta de un ovario ramificado que se continúa en un oviducto y desemboca en una cámara (ootipo) rodeada de células que forman la glándula de Mehlis, la cual se encarga de producir la cáscara de los huevecillos y

lubricar las paredes del útero para expulsarlos por el gonoporo. El parásito puede reproducirse asexualmente en los estadíos de esporocistos y redias, los cuales forman más organismos mediante gemación interna (Ruppert *et al.*, 1996).

1.2.3.- Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

Los parásitos adultos que se localizan en los conductos biliares del ganado y accidentalmente en el hombre, comienzan a autofecundarse y a producir huevecillos, los cuales se caracterizan por su tamaño (150 x 75 μm), tienen forma elíptica y un opérculo o tapa en un extremo (García, 1987). Estos pasan al intestino a través de la bilis y son expulsados al ambiente con las heces (Botero *et al.*, 2003). En el ambiente su maduración se efectúa en el agua dulce a una temperatura de 22-25 °C, y después de 9 a 15 días eclosiona la primera forma larvaria (miracidio), la cual se caracteriza por su tamaño (130 a 180 μm), forma ovalada y se encuentra rodeada de ciliatura (Lamothe *et al.*, 1988). El miracidio se desplaza libremente en el agua en busca de su primer hospedero, el cual es una de las 20 especies de caracoles del género *Lymnaea*. La larva ingresa por el pie del molusco, pierde los cilios y se convierte en un esporoquiste (esporocisto) que se caracteriza por su forma alargada o semiesférica (García, 1987) y en cuyo interior se desarrollan las redias que a su vez contienen a las cercarias, las cuales son más similares al adulto por tener dos ventosas, un intestino bifurcado y un apéndice caudal que les permite desplazarse libremente en el agua (Romero, 1993). Las cercarias abandonan el molusco y se dirigen a la vegetación acuática, en la cual pierden la cola y se enquistan formando a las metacercarias (500 μm) (García, 1987). Cuando un herbívoro o el hombre ingieren esta vegetación, las metacercarias llegan al intestino delgado, pierden su envoltura quística, atraviesan la pared intestinal y emigran por la cavidad peritoneal hasta llegar al hígado para alimentarse de tejido hepático, después penetran y se instalan en los conductos biliares. Al término de dos semanas alcanzan la fase adulta y comienzan a autofecundarse (Lamothe *et al.*, 1988) (Fig. 4).

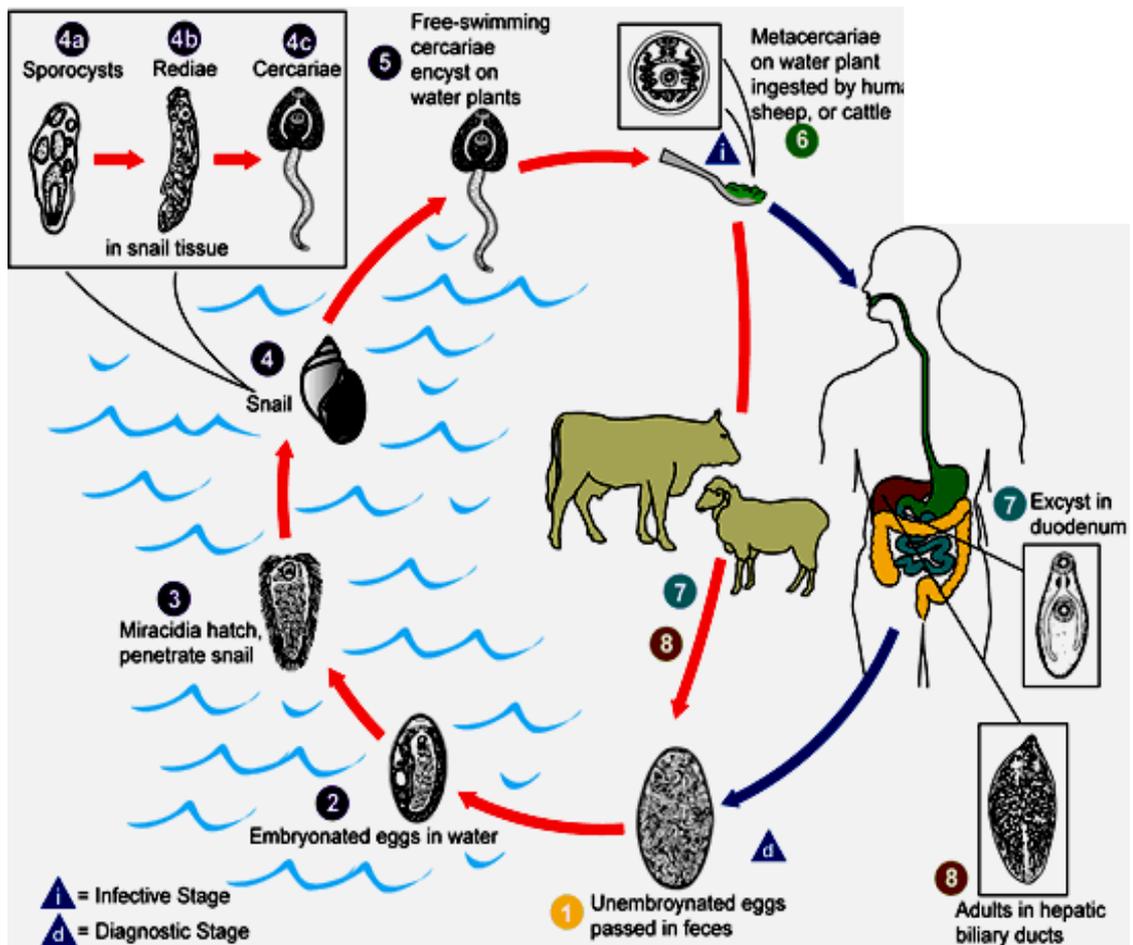


Fig. 4. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica* (CDC, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

El desarrollo y supervivencia de *Fasciola hepatica* requiere de una respuesta adaptativa a los cambios ambientales, en particular a los mecanismos de defensa del hospedero, ya que al igual que otros parásitos debe tener un sistema de protección eficiente contra el peróxido de hidrógeno producido por el sistema inmune del hospedero, e incluso contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por su propio metabolismo (Salazar *et al.*, 2001).

1.3.- Papel del oxígeno.

El oxígeno en los aerobios permite la oxidación completa de las moléculas (carbohidratos, lípidos y aminoácidos) con la finalidad de obtener energía para la síntesis de ATP, lo que resulta una eficiencia energética que es mayor al metabolismo anaerobio. La molécula de oxígeno realiza una oxidación completa al aceptar cuatro electrones en su órbita más externa (reducción tetravalente), produciendo dos moléculas de agua (Tiskow, 1996).



Esta reducción se efectúa mediante la citocromo C oxidasa que transporta protones a través de la membrana interna mitocondrial, lo que genera un gradiente electroquímico que finalmente es utilizado para la síntesis de ATP (Voet *et al.*, 1999) (Fig. 5).

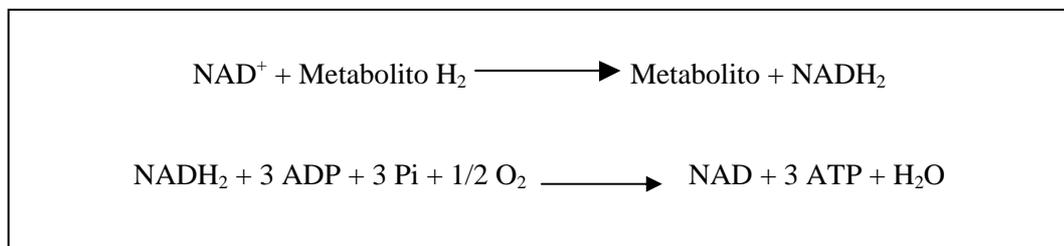


Fig. 5. Reacciones generales para la obtención de ATP durante la fosforilación oxidativa en la membrana interna mitocondrial (Tomado de Burton *et al.*, 1977).

A pesar de que el oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, en ocasiones puede volverse tóxico al formar radicales libres, los cuales son capaces de alterar importantes moléculas en las células (Tiskow, 1996).

1.4.- Radicales libres.

Es cualquier especie química (átomo o molécula) inestable energéticamente y muy reactiva debido a la presencia de uno o varios electrones desapareados, siendo capaces de modificar reversible o irreversiblemente algunas componentes celulares, lo que origina el desarrollo de varias patologías. Se considera que su principal blanco son las insaturaciones de los lípidos de la bicapa, lo que provoca su peroxidación y pérdida de la permeabilidad e integridad de la membrana, además pueden dañar proteínas y ADN, en este último pueden originarse mutaciones que pueden provocar el desarrollo de cáncer y algunas patologías degenerativas como el síndrome de Parkinson, Down, Alzheimer, esclerosis múltiple y aterosclerosis (Tiskow, 1996).

Los radicales libres más comunes son el triclorometilo (CCl_3), óxido nítrico (NO), radicales peróxido (RO_2), alcóxido (RO), el átomo de hidrógeno (H°), hidroxilo (OH°), tiol (RS°), alquil (RO°) y las especies reactivas de oxígeno (Halliwell *et al.*, 1992 citado por Huerta *et al.*, 2005).

1.5- Especies reactivas de oxígeno (ERO).

Se forman cuando el oxígeno sufre una reducción univalente, divalente o trivalente (Yu, 1994). Las principales ERO son el anión superóxido ($\text{O}_2^{\circ-}$), el intermediario peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2^*$) (López, 2000).

1.5.1.- Anión superóxido ($\text{O}_2^{\circ-}$).

Se forma en las células cuando el oxígeno molecular acepta un electrón (reducción univalente) procedente de la cadena respiratoria. Se considera que su principal fuente es la descarga respiratoria (aumento del consumo de oxígeno) en los macrófagos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos, ya que son los encargados de destruir agentes patógenos al producir este radical. Los neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos y

células mononucleares contienen sistemas enzimáticos de membrana como la NADPH oxidasa que al activarse durante la fagocitosis llevan a la producción de potentes agentes oxidantes como el mismo anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales $\cdot\text{OH}$, ácido hipocloroso y óxido nítrico (NO) (Tiskow, 1996). El anión superóxido también puede formarse por reducción del oxígeno durante la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico (por acción de la xantina oxidasa) (Huerta et al., 2005), y a través de la captación de los electrones provenientes de la degradación de catecolaminas (por acción de la monoamino oxidasa) en el proceso de reperfusión tisular posterior a la isquemia (Tiskow, 1996); sin embargo, hay factores externos que también promueven su formación, tal como la radiación ultravioleta, productos de la detoxificación de drogas y toxinas, acción de carcinogénicos, oxidación de alimentos, fotosensibilizadores, contaminantes atmosféricos, humo de cigarro, productos de la combustión de la materia orgánica y pesticidas (Halliwell et al, 1992 & Clifford, 1999 citados por Huerta *et al.*, 2005).

1.5.2.- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

No se considera un verdadero radical debido a que carece de electrones desapareados; sin embargo, cuando capta un electrón procedente del Fe^{+2} o Cu^+ puede formar el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (López, 2000).

1.5.3.- Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

Es muy inestable debido a que contiene un electrón desapareado. Ataca casi todo tipo de estructura celular. Puede formarse por la ruptura de una molécula de agua bajo el efecto de radiación gamma o en el ciclo Haber-Weiss. (Fig. 6).

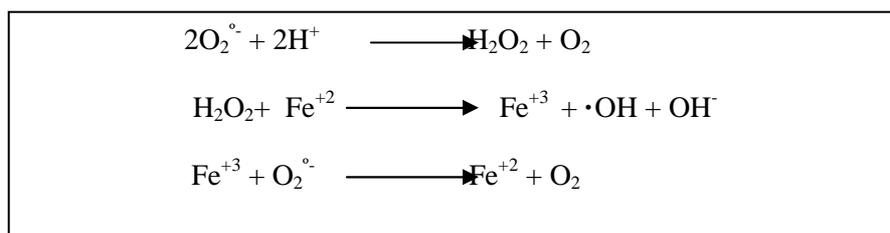


Fig. 6. Formación del radical $\cdot\text{OH}$ a través del ciclo Haber-Weiss (Tomado de López, 2000).

Para controlar los efectos devastadores de los radicales libres, las células cuentan con mecanismos de protección enzimáticos y no enzimáticos que actúan para neutralizar o prevenir la formación de las ERO (Yu, 1994) (Fig.7).

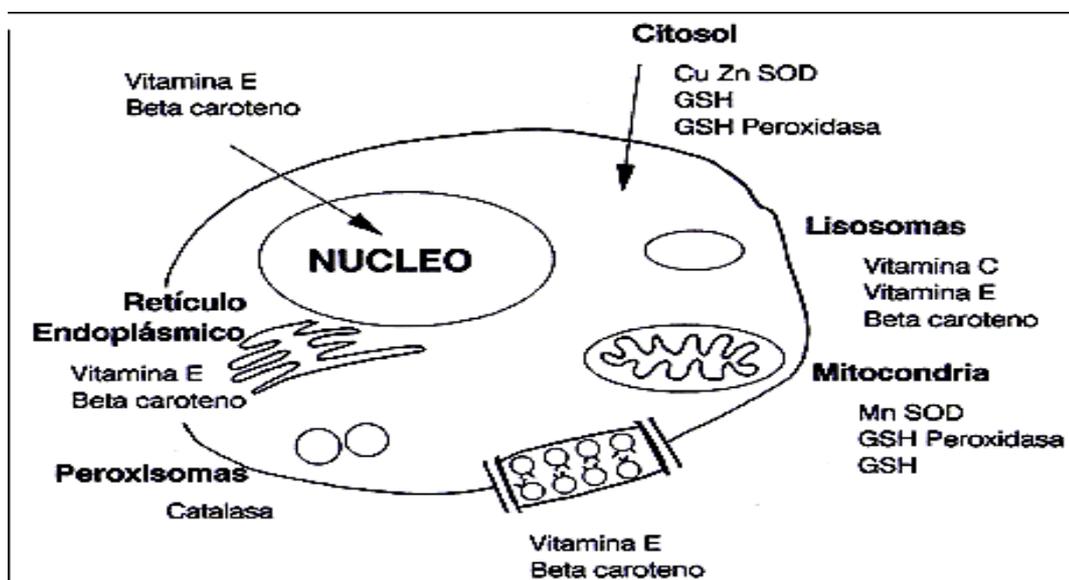


Figura 7. Principales sistemas enzimáticos y no enzimáticos de defensa antioxidante en las células (Tomado de Borzone *et al.*, 1996)

1.6.- Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.

1.6.1.- Vitaminas y otros antioxidantes.

Estas moléculas son capaces de neutralizar o limitar la actividad de los radicales libres.

- a) Tocoferol (Vitamina E). Compuesto liposoluble que al reaccionar con los peróxidos impide la formación de radicales libres en la membrana celular (Tiskow, 1996).
- b) Acido ascórbico (Vitamina C). Reacciona directamente con los superóxidos, singulete de oxígeno y el radical hidroxilo (López, 2000). Este compuesto dona electrones para formar los intermediarios radicales ascórbilos, los cuales son mantenidos en bajas concentraciones en el plasma (Tiskow, 1996).

- c) β - Carotenos. Reaccionan con los peróxidos para impedir la formación de radicales. Por su alta liposolubilidad protegen a la membrana celular (López, 2000).
- d) Ceruloplasmina. Proteína circulante que contiene Cu^+ y actúa como antioxidante extracelular (Yu, 1994).
- e) Removedores de Radicales libres (“*Scavengers*”). Se caracterizan por ser fácilmente oxidables. Entre estos se encuentran la cisteína, manitol, tiourea, alopurinol, oxipurinol, hidroxitolueno butilado, desferoxamina, dimetilsufóxido y la dimetiltiourea (Yu, 1994).

1.6.2.- Glutati3n.

Es un tripéptido conformado como L-glutamil-L-cisteinil-glicina, donde el residuo de cisteína contiene un grupo tiol (-SH) que es responsable del estado oxidado (GSSG) y reducido (GSH) del glutati3n (Sies, 1999) (Fig. 8). El tripéptido puede donar electrones para reducir cualquier enlace disulfuro formado entre cisteínas de proteínas citoplasmáticas. El glutati3n es el tiol más pequeño y de mayor abundancia en las células eucariontes (0.01 a 10 mM) (Guevara, 2004).

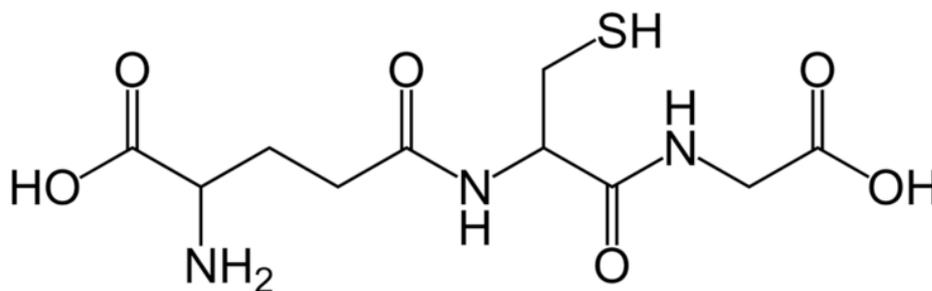


Fig. 8. Estructura molecular del glutati3n.
La cisteína contiene el grupo tiol (-SH) que es responsable del estado redox (Tomado de Sies, 1999).

1.6.2.1.- Biosíntesis del glutatión.

El L-glutamato y cisteína forman el dipéptido γ -glu-cis en una reacción que es catalizada por la γ - glutamil-cisteína sintetasa (GSH1). El dipéptido formado se une a una glicina, y por acción de la glutatión sintetasa (GSH2) se forma el glutatión.

Las enzimas que participan requieren ATP, y los niveles de glutatión son regulados por mecanismos de inhibición por retroalimentación de la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (Fig. 9).

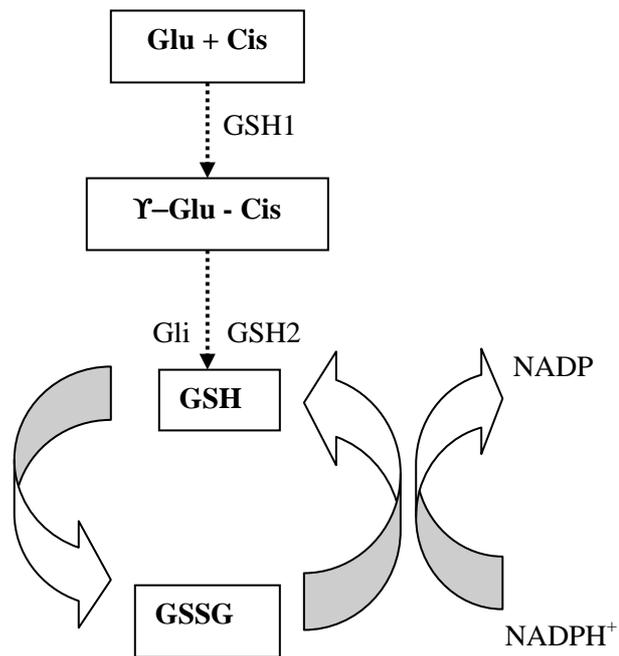


Fig. 9. Biosíntesis y regulación redox del glutatión (Tomado de Grant, 2001).

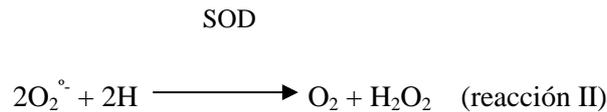
1.6.2.2.- Funciones del glutatión.

El tripéptido participa en la regulación del ciclo celular, la expresión génica, apoptosis, reparación de DNA, producción de citocinas y fitoquelatinas, degradación de xenobióticos y en la depuración del peróxido de hidrógeno a través de la glutatión peroxidasa (Sies, 1999).

1.7.- Mecanismos antioxidantes enzimáticos.

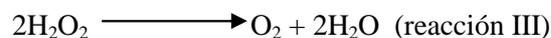
1.7.1.- Superóxido dismutasa.

Es una metaloenzima mitocondrial (SOD Mn^{+2}) y citosólica (SOD Cu^{+2} y Zn^{+2}) que cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Tiskow, 1996).



1.7.2.-Catalasas.

Son un grupo de enzimas localizadas a nivel de peroxisomas. Se encargan de detoxificar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Guevara, 2004). Ante elevadas concentraciones de peróxido, las catalasas se vuelven primordiales en su remoción (Tiskow, 1996).



1.7.3.- Glutatión peroxidasa (Gprx).

Es una enzima dependiente de selenio localizada a nivel citosólico y mitocondrial. Emplea glutatión reducido para depurar el peróxido de hidrógeno en agua y glutatión oxidado colateralmente (Tiskow, 1996).



Para que esta enzima siga funcionando necesita glutatión reducido, el cual puede ser regenerado mediante la glutatión reductasa (GR) que emplea NADPH como agente reductor (Tiskow, 1996) (Fig. 10).

1.7.4.- Glutación reductasa (GR).

Es una flavoproteína citoplasmática y mitocondrial que se encuentra organizada en tres dominios estructurales; el primero se une al FAD, el segundo al NADPH y el tercero contiene un disulfuro reducible que sirve como acarreador intermediario de electrones para la reducción del glutación (Guevara, 2004) (Fig.10).

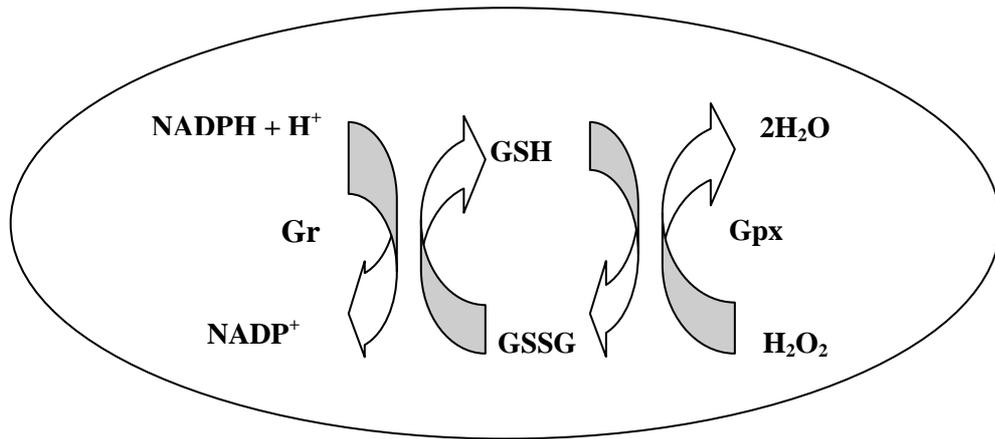


Fig. 10. Regeneración del GSH mediante la Glutación reductasa y NADPH.
(UNAM, <http://bq.unam.mx/~evazquez>).

1.7.5.- Tiorredoxina peroxidasa (Tpx).

Son proteínas con masa molecular de 25 kDa. Contienen 2 residuos de cisteína que captan electrones procedentes de la tiorredoxina para depurar el peróxido de hidrógeno (Salazar *et al.*, 2001).

1.8.- Tiorredoxina (Trx).

Son proteínas con masa molecular de 12 kDa. En el centro activo contienen dos residuos de cisteína que forman un ditiol en el estado reducido (Trx- SH₂) y un puente disulfuro intramolecular (Trx- S₂) en el estado oxidado (William *et al.*, 2002). Su estructura globular se constituye por 5 láminas β - plegadas que forman una región central hidrofóbica rodeada por 4 α -hélices en la superficie (Powis *et al.*, 2001) (Fig.11). El centro activo se encuentra localizado en la proyección de la estructura terciaria, entre una lámina β - plegada y una α -hélice (Holmgren *et al.*, 1995). El centro activo de la

tiorredoxina de *Escherichia coli* contiene la secuencia conservada Trp- Cis- Gli- Pro- Cis (Powis *et al.*, 2001) dentro de una cadena polipeptídica de 108 aminoácidos (Holmgren, 1985).

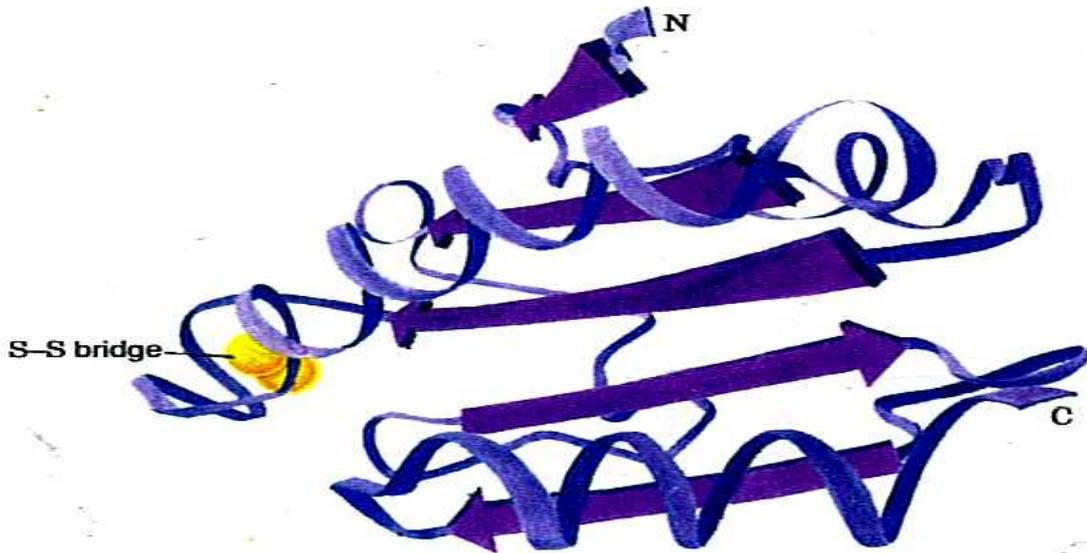


Fig. 11. Estructura tridimensional de la Tiorredoxina-1 de *Escherichia coli*. (Tomado de Holmgren, 1985).

La tiorredoxina en los eucariontes predomina en dos isoformas: la tiorredoxina-1 (citoplasmática y nuclear) y tiorredoxina-2 (mitocondrial). La primera juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, ya que participa en algunas funciones como el crecimiento, inhibición de la apoptosis, regulación de los factores de transcripción y abastece de equivalentes reductores a la ribonucleótido reductasa para la síntesis DNA (Powis *et al.*, 2001), aunque también participa en la regulación de la 1,6 bifosfatasa y malato deshidrogenasa (Holmgren, 1985), forma parte de la subunidad de la DNA polimerasa del fago T7, favorece el ensamblamiento del fago F1, reduce a la insulina, coriogonadotropina y fibrinógeno (Holmgren *et al.*, 1995) y depura el peróxido de hidrógeno por acción de la tiorredoxina peroxidasa (Guevara, 2004) (Fig. 12).

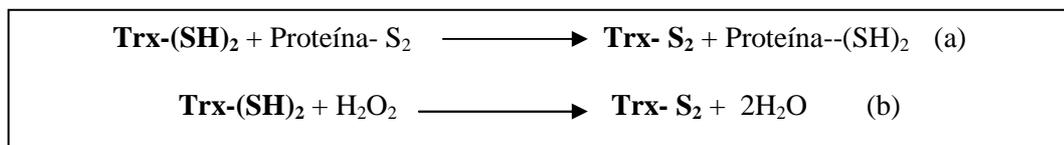


Fig. 12. Participación de la tiorredoxina en la reducción de disulfuros (a), y depuración del peróxido de hidrógeno (b) (Tomado de Guevara, 2004).

1.8.1.- Tiorredoxina de *Fasciola hepatica*.

Es una proteína con masa molecular de 12 kDa. Su secuencia muestra una región conservada (W-C-G-P-C-K) en su sitio activo. La expresión en *Escherichia coli* ha permitido mostrar un 50.53% y 49.5 % de homología con la tiorredoxina de *Echinococcus granulosus* y *Schistosoma japonicum* respectivamente (Salazar *et al.*, 2001).

El análisis cristalográfico de la tiorredoxina de *F. hepatica* ha revelado la presencia de 5 láminas β -plegadas rodeadas por 4 α -hélices (Fig. 13). La región conservada del sitio activo (WCGPC) contiene dos residuos de cisteína que forman un ditiol separados a 3.44 Å y un puente disulfuro de 2.33 Å, el cual es responsable de los cambios de conformación al modificar su estado redox. Se sugiere que dicha proteína participa en la cascada redox involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular al proporcionar la protección contra las ERO producidas por el hospedero (Littlechild *et al.*, 2008).

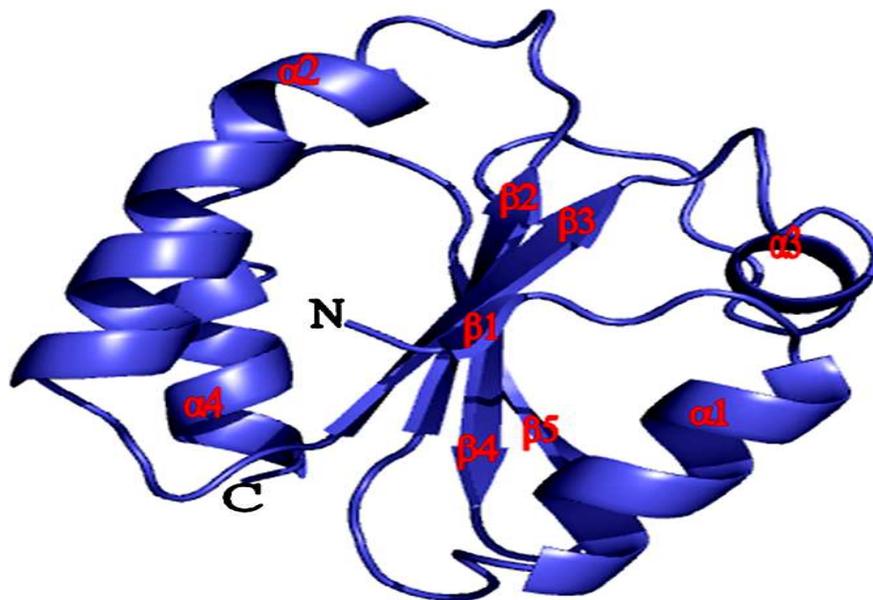


Fig. 13. Estructura cristalográfica de la tiorredoxina de *Fasciola hepatica*. Se conforma por 5 láminas β -plegadas rodeadas por 4 α -hélices (Tomado de Littlechild *et al.*, 2008).

Para que la tiorredoxina pueda efectuar sus funciones es necesario regenerar su estado reducido, el cual es posible a una reacción que es catalizada por la tiorredoxina reductasa que emplea NADPH como agente reductor (Holmgren *et al.*, 1995).

1.8.2.- Tiorredoxina reductasa (TR).

Es una proteína dimérica dependiente de nucleótidos de piridina (Upcroft *et al.*, 1996). Predomina como un homodímero con subunidad de 35 kDa (en procariontes, levaduras y plantas) y 55-65 kDa (animales) (Sun *et al.*, 2004). La TR de mamíferos presenta la secuencia conservada GCUG en el extremo carboxilo terminal de cada subunidad, donde U corresponde a un residuo de selenocisteína que junto a una cisteína forman un puente selenildisulfuro en el estado oxidado. Cuando dicho puente es reducido forma un seleniotiol que es capaz de efectuar una reducción (Guevara, 2004) (Fig. 14).

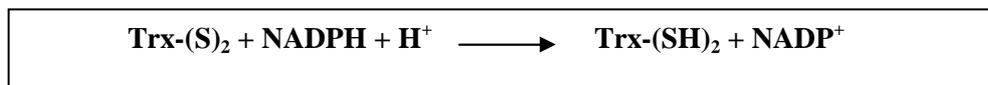


Fig. 14. Reducción de la tiorredoxina mediante la Trx R y NADPH.

1.8.3.- Glutarredoxina (Grx).

Es una proteína con dos residuos de cisteína conservados en el sitio activo, el cual es similar al sitio activo de la tiorredoxina pero a diferencia de esta, la glutarredoxina es reducida directamente por glutatión empleando NADPH como fuente de equivalentes reductores (Grant, 2001). La glutarredoxina participa en la síntesis de desoxirribonucleótidos, reparación de proteínas dañadas por oxidación, plegamiento de proteínas, metabolismo del azufre, reducción del dehidroascorbato y otros disulfuros (Grant, 2001). La glutarredoxina pertenece al sistema de glutatión, que junto con el sistema de tiorredoxina constituyen los dos mejores sistemas redox en las células animales (Salinas *et al.*, 2004).

1.9.- Tiorredoxina glutathion reductasa (TGR).

Se aisló por primera vez en células de testículo de ratón. Es una enzima homodimérica dependiente de NADPH con subunidad de 65 kDa. Contiene un centro activo redox carboxil terminal con un residuo de selenocisteína (Sec) (Salinas *et al*, 2008). Tiene la capacidad de ejercer actividad de tiorredoxina reductasa, glutathion reductasa y glutarredoxina debido a una fusión aparente del dominio de la tiorredoxina reductasa y glutarredoxina (Rendón *et al.*, 2004).

1.9.1.- Estructura tridimensional de la TGR.

El análisis cristalográfico de la TGR de *Schistosoma mansoni* ha revelado un dímero constituido por 597 residuos distribuidos en un área de 4120 Å². Cada monómero está formado por la fusión del dominio de la glutarredoxina (con 3 cisteínas entre los residuos 1-106) y tiorredoxina reductasa (con 12 cisteínas entre los residuos 107-598). La dimerización forma una estructura en “W” con los dos dominios de glutarredoxina en cada extremo (Fig. 15 B). La enzima presenta un *loop* expuesto al solvente conformado por Asp-Thr-Glu-Asn-Asn, situado abajo del dominio de FAD (Bellelli *et al.*, 2008) (Fig. 15).

1.9.2.- Mecanismo catalítico TGR.

La activación de la enzima se da con un abastecimiento de equivalentes reductores procedentes del NADPH hacia el dominio de FAD, de aquí son transferidos al sitio activo redox tiol/disulfuro N- terminal, luego al centro activo redox selenilsulfuro del C-terminal de la segunda subunidad y finalmente al centro activo del dominio de la glutarredoxina de la primera subunidad, la cual efectúa actividad de glutarredoxina y glutathion reductasa. La TGR es capaz de reducir a la tiorredoxina u otros sustratos disulfuros mediante el sitio activo carboxilo terminal selenilsulfuro (Sun *et al.*, 2005).

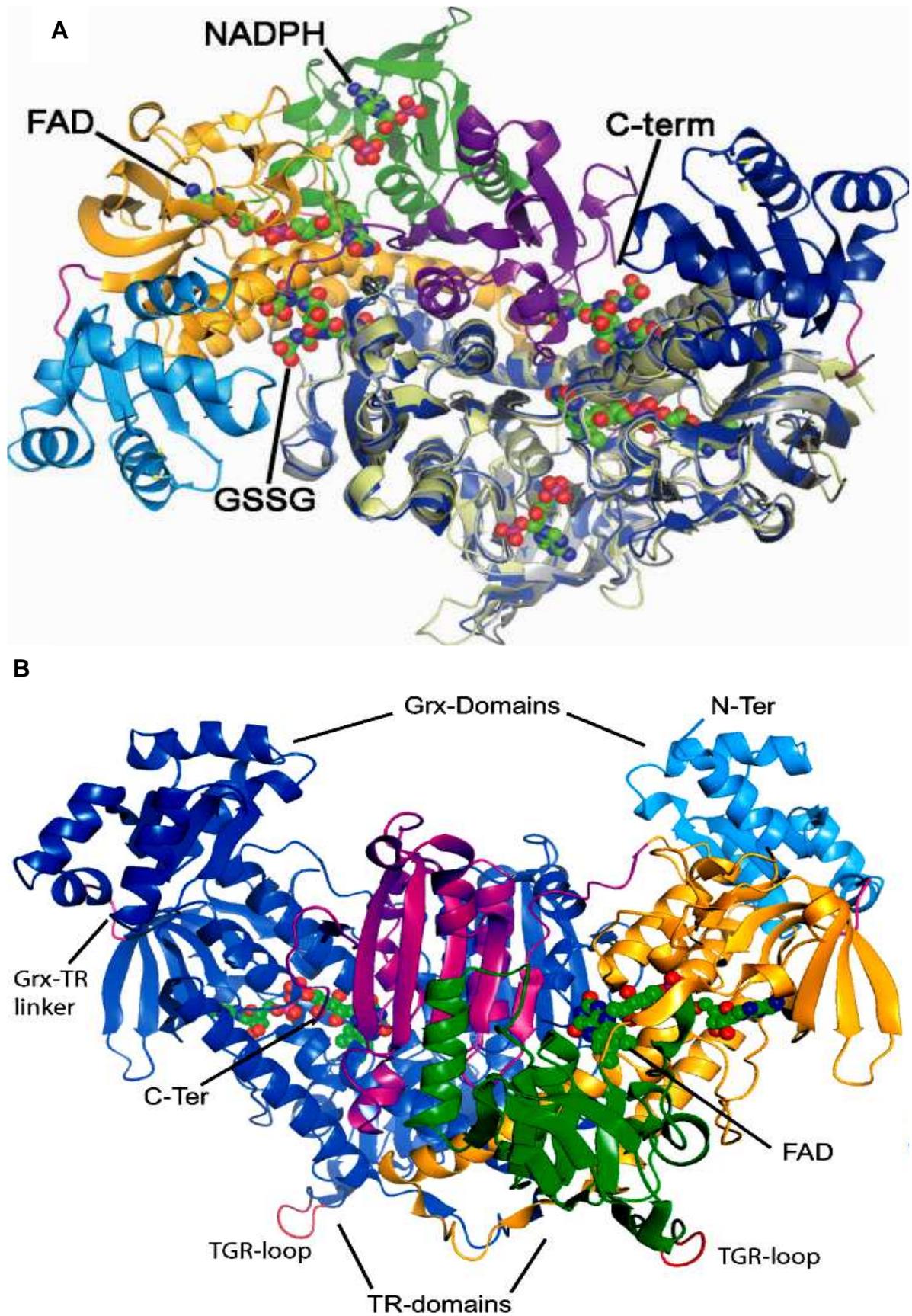


Fig. 15. Estructura cristalográfica de la TGR de *Schistosoma mansoni*. (A): Muestra el dominio de la TR conformado por los dominios de FAD, NADPH y el extremo C- terminal. (B): Dominios de glutarredoxina, tiorredoxina reductasa y la adopción de la forma “W” durante la dimerización. Se observa el loop expuesto al solvente abajo el dominio de FAD. (Tomado de Bellelli *et al.*, 2008).

1.9.3.- Comportamiento histórico de la TGR.

Consiste en la aparición de un retardo en la activación de la enzima (tiempo *lag*) cuando se le expone a altas concentraciones de sustrato. Esta propiedad ha sido característica de la TGR de *Echinococcus granulosus* y del metacéstodo de *Taenia crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004).

1.9.4.- Regulación de la biosíntesis de la TGR.

La síntesis de la TGR están regulados principalmente por la disponibilidad de selenio, la expresión génica de la selenocisteína (UGA) y la interacción RNAt- SEC durante la traducción (Sun *et al.*, 2005).

En la actualidad se conocen la TGR de *Schistosoma mansoni* (Alger *et al.*, 2002; Bellelli *et al.*, 2008), *Echinococcus granulosus* (mitocondrial y citosólica) (Agorio *et al.*, 2003), metacéstodo de *Taenia crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004) y de mamífero (ratón) (Sun *et al.*, 2001). En el metacéstodo de *Taenia crassiceps* no se ha encontrado la tiorredoxina reductasa convencional, por lo que se le atribuye a la TGR el papel del mantenimiento redox de la tiorredoxina y glutatión, y dado que en *F. hepatica* no se ha detectado la existencia de una glutatión reductasa convencional, sería interesante conocer si la TGR existe en dicho parásito, ya que estudios sugieren que la TGR es la disulfuro reductasa en los platelmintos y que pudiera estar sustituyendo a la TR y GR convencionales a través de la evolución (Salinas *et al.*, 2004).

2.- JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia de los sistemas de tiorredoxina y glutatión en el mantenimiento redox y como defensa antioxidante en algunos parásitos, resulta interesante conocer si en *Fasciola hepatica* existe la TGR, ya que nos permitiría describir un nuevo mecanismo de protección antioxidante, además se daría la posibilidad de visualizarla como un blanco molecular para el diseño de fármacos dirigidos contra este parásito que por su importancia médica y veterinaria resulta muy atractivo en el ámbito científico.

3.- HIPÓTESIS

En algunos parásitos del grupo de los platelmintos se ha encontrado una enzima multifuncional (TGR) que reduce tiorredoxina y glutatión, los cuales participan activamente en la protección antioxidante, y dado que *Fasciola hepatica* es miembro del mismo grupo y no se le ha encontrado una glutatión reductasa convencional, entonces es posible que la TGR también exista en dicho parásito.

4.- OBJETIVOS:

4.1.- Objetivo general.

Purificar y caracterizar la tiorredoxina glutatión reductasa de *Fasciola hepatica*.

4.2.- Objetivos particulares.

- Obtener los parásitos adultos a partir de hígados de bovinos infectados
- Precipitar la proteína con sulfato de amonio
- Purificar la enzima mediante cromatografía de intercambio iónico y afinidad
- Determinar la cinética histérica y la actividad de glutarredoxina.
- Determinar los parámetros cinéticos: K_m , V_{max} , K_{cat} , C_{cat} y eficiencia catalítica.
- Determinar la masa molecular de la subunidad
- Secuenciar el extremo N-terminal mediante el método de Edman

5.- MATERIALES Y MÉTODO

MATERIAL Y SUSTANCIAS.

Adultos de *Fasciola hepatica*, PBS: amortiguador fosfato de sodio (pH 7.4), amortiguador Imidazol 50 mM (pH 6.4) 1mM EDTA, PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro, NADPH: Fosfodinucleótido de nicotinamida-adenina reducido, DTNB: ditionitrobenceno, GSSG: Glutati3n oxidado, (NH₄)₂ SO₄: Sulfato de Amonio, DEAE-SEF: Dietilamionoetil-sephacel, NaCl: Cloruro de sodio, 2',5' ADP: adenosin 2' 5' bis-fosfato, SDS (dodecil sulfato s3dico), buffer de corrimiento 1X, marcador PM (Bio-rad), auranof3n (INC Biomedicals), membranas de celof3n (> 12 kDa), glicerol al 10%.

5.1.- PURIFICACI3N DE LA ENZIMA.

5.1.1.- Obtenci3n de adultos de *Fasciola hepatica*.

Los par3sitos adultos fueron extra3dos directamente de los conductos biliares de h3gados de bovinos infectados en el rastro municipal del centro de Tlalnepantla, Estado de M3xico. Se introdujeron en soluci3n de PBS 10 mM (pH 7.4) + NaCl 0.9% bajo un ba3o de hielo y posteriormente fueron trasladados al Departamento de Bioqu3mica de la Facultad de Medicina (UNAM).

En el laboratorio se lavaron tres veces con PBS y se almacenaron a -70 3C.

5.1.2.- Obtenci3n del extracto crudo.

La muestra biol3gica se descongel3 a temperatura ambiente y se le adicion3 amortiguador Imidazol 50 mM (pH 6.4) EDTA 1mM en proporci3n 3:1 (v/p), conteniendo fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 86 3M (1:1000 v/v), y posteriormente se homogeneiz3 con un v3stago de tefl3n Potter-Elvehjen a 3000 r.p.m bajo un ba3o de hielo.

5.1.3.- Obtención de la fracción citosólica.

El homogenado se centrifugó a 11200 xg durante 25 min a 5 °C en una centrífuga Beckman J2-21. El sobrenadante fue decantado y el pellet se resuspendió en 50 mL de amortiguador Imidazol 50 mM (pH 6.4) EDTA 1mM, se rehomogeneizó y se sometió nuevamente a centrifugar con el fin de extraer la mayor cantidad de proteína. Al final el pellet fue descartado y los sobrenadantes fueron mezclados en un solo volumen.

5.1.4.- Precipitación de proteínas.

A partir del sobrenadante obtenido se precipitaron las proteínas con sulfato de amonio. La primera precipitación se llevó al 40% de saturación, para ello la sal fue adicionada gradualmente bajo agitación continúa en un baño de hielo y posteriormente se centrifugó a 16336 xg durante 20 min a 4 °C. Al término se decantó el sobrenadante y se llevó al 80% de saturación bajo el mismo procedimiento. Al final los pellet fueron resuspendidos en 12 mL de amortiguador imidazol 50 mM (pH 6.4) EDTA 1mM.

5.1.5.- Diálisis.

Para eliminar el exceso de sales en las muestras, los resuspendidos se introdujeron en sacos semipermeables de celofán (retención: moléculas > 12 kDa) y se dializaron contra 2000 ml de amortiguador imidazol 50 mM (pH 6.4) EDTA 1mM, por un lapso de 12 horas a 4 °C y bajo agitación continúa.

Al término se midió la actividad enzimática para detectar la proteína de interés.

5.1.6.- Cromatografía.

5.1.6.1.- Cromatografía de intercambio iónico.

Se utilizó una columna (2.6 x 20 cm) previamente equilibrada con amortiguador imidazol 50 mM (pH 6.4) EDTA 1 mM. Se empleó dietilaminoetil unido covalentemente a sefacel (DEAE-SEF) como intercambiador aniónico (Amersham pharmacia biotech, 1999). La muestra se corrió a través de la columna a 6.6 mL/h. Al término se lavó con el amortiguador mencionado para remover las moléculas libres y para eluir las proteínas adsorbidas a la columna se aplicó un gradiente de NaCl (0-0.4 M). El eluyente fue registrado con un detector de absorbancia a 280 nm y fue colectado en diferentes fracciones. Para localizar la enzima de interés se realizaron mediciones de su actividad catalítica en las fracciones que mostraron mayor absorbancia en el perfil proteico. Las fracciones activas fueron mezcladas en un solo volumen (Rendón *et al.*, 2004).

Para cuantificar la concentración de NaCl en la cual eluye la proteína de interés, se empleó un conductímetro 3200 incorporated. Se preparó una curva de calibración con una serie de soluciones de NaCl y se representó gráficamente la conductividad en función de su concentración. Se midió la conductividad en las fracciones activas y se interpolaron en la gráfica para conocer su concentración. Finalmente se relacionó gráficamente la concentración de NaCl en función del número de fracción.

Para eliminar el exceso de NaCl en las muestras activas, se realizó una diálisis contra 1L de amortiguador Tris-HCl 0.1M (pH 7.8) EDTA 1mM + glicerol al 10% a 4°C bajo agitación constante (Rendón *et al.*, 2004).

5.1.6.2.- Cromatografía de afinidad.

Se utilizó una columna (2.6 x 20 cm) previamente equilibrada con Tris- HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM. Se empleó como ligando adenosina 2',5' bis-fosfato (2',5' ADP) acoplado covalentemente a sefarosa 4B (Amersham pharmacia biotech, 1999). La muestra se corrió a través de la columna a 6.6 mL/h. Al término se lavó con el amortiguador mencionado para remover las moléculas libres, y para eluir las proteínas unidas al ligando se aplicó un gradiente de NADPH (0-120 μ M). El eluyente fue registrado con un detector de absorbancia a 280 nm y fue colectado en diferentes fracciones. Para localizar la enzima de interés se realizaron mediciones de la actividad catalítica en las fracciones que mostraron mayor absorbancia en el perfil proteico. Las fracciones que resultaron activas fueron mezcladas en un solo volumen (Rendón *et al.*, 2004).

Para eliminar el exceso de NADPH en las muestras activas se realizó una diálisis contra 1000 ml de amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM por 24 horas a 4° C bajo agitación constante.

5.1.7.- Ultrafiltración.

Con la finalidad de concentrar la muestra, el eluyente obtenido se introdujo en tubos filtrables de vivaspín que cortan en moléculas > 5 kDa y se centrifugó a 1243 xg durante 15 min.

5.1.8.- Cuantificación de proteínas.

Para conocer la concentración proteica, a partir de una alícuota procedente de cada una de las fases de purificación se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

5.1.9.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).

Para analizar el grado de pureza alcanzado se efectuó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras, se empleó SDS (dodecil sulfato sódico) como agente desnaturizador (Laemmli, 1970). Los geles concentrador y separador fueron preparados al 4% y 10% respectivamente. Los componentes de la mezcla para el tamiz polimérico fueron agua desionizada, acrilamida/bisacrilamida, SDS al 10%, amortiguador Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) (separador) y Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) (concentrador), persulfato de amonio al 10% y TEMED en un volumen final de 5 ml. Cuando los geles separador y concentrador fueron polimerizados, se colocó el marcador de masa molecular (6 µl) y la muestra proteica (25 µg) en condiciones reductoras. La corrida se efectuó a 70 V durante 30 min y después se incrementó a 140 V durante 60 min. Se extrajo el gel y se sometió a tinción con azul de Coomassie R- 250 durante 5 horas, posteriormente se reveló con solución de metanol-acético-agua (4:1:5).

5.2.- CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

5.2.1.- Actividad de tiorredoxina reductasa.

La capacidad para reducir tiorredoxina fue determinada monitoreando espectrofotométricamente el incremento de la absorbancia a 412 nm a causa de la formación del anión TNB^- (tionitrobenzoato) como consecuencia de la reducción del sustrato artificial DTNB (dinitrobenzeno), de acuerdo a la reacción:



La mezcla de reacción contuvo DTNB (0.90 mM) y NADPH (125 µM) los cuales fueron preincubados durante 3 min con amortiguador Tris- HCl 0.1M (pH 7.8) EDTA 1 mM (absorbancia basal). Para iniciar la reacción se adicionó una alícuota de la muestra

conteniendo a la enzima (0.5 μg) en un volumen final de 1 ml a 38 $^{\circ}\text{C}$, de acuerdo a Rendón *et al.*, 2004.

5.2.2.- Actividad de glutatión reductasa.

La capacidad para reducir glutatión fue determinada monitoreando espectrofotométricamente el decremento de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH en presencia de GSSG, de acuerdo a la reacción:



La mezcla de reacción contuvo a la enzima (0.5 μg) resuspendida en amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM. Se adicionó NADPH (100 μM) para iniciar la absorbancia basal y después de 3 min la reacción fue iniciada por adición de GSSG (0.11 mM) en un volumen total de 1 ml, de acuerdo a Bergmeyer, 1970. Para la actividad de GR, una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADPH por min a 25 $^{\circ}\text{C}$ (Rendón *et al.*, 2004).

5.2.3.- Actividad de glutarredoxina.

Para conocer si la enzima presenta multifuncionalidad se determinó la actividad de glutarredoxina. La mezcla de reacción contuvo amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM (225 μL), GSH (2.5 mM) e hidroxietil disulfuro (HED) (63 mg) los cuales fueron incubados durante 2 min a 38 $^{\circ}\text{C}$ para permitir la formación del disulfuro mixto de glutatión (β -mercaptoetanol-GSSG) + β -mercaptoetanol (reacción a) (Fig. 15), posteriormente se adicionó el amortiguador mencionado (800 μl) conteniendo a la enzima (0.5 μg) y se incubó durante 3 min para permitir la formación de glutatión oxidado + β -mercaptoetanol (reacción b) (Fig. 15). Finalmente se añadió NADPH (6

mM) y glutatión reductasa de espinaca para formar glutatión reducido (GSH) y NADP^+ (reacción c) (Fig. 15).

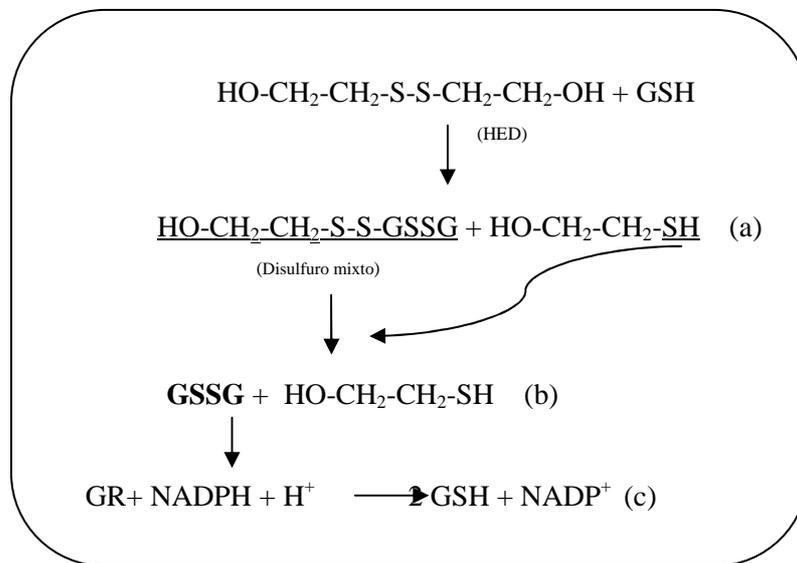


Fig. 15. Actividad de glutarredoxina.

De esta manera la reacción se determinó monitoreando el decremento de la absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH añadido. En esta reacción, una unidad de actividad se define como el consumo de $1 \mu\text{mol}$ de $\text{NADPH} \text{ min}^{-1}$ (Rendón *et al.*, 2004).

5.2.4.- Determinación de la cinética histórica.

Para conocer si la enzima de estudio presenta un comportamiento histórico, tal como sucede con la TGR de *E. granulosus* y en el metacéstodo de *T. crassiceps*, se determinó la actividad histórica con glutatión. La mezcla de reacción contuvo a la enzima ($0.5 \mu\text{g}$) y NADPH ($150 \mu\text{M}$) mezclados con amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM e incubados por 3 min. La reacción se inició por la adición de GSSG a diferentes concentraciones en un volumen final de 1m . Se registró el cambio de absorbancia a 340 nm y se relacionó gráficamente en función del tiempo (Rendón *et al.*, 2004).

5.2.5.- Parámetros cinéticos: K_m y V_{max} .

Los parámetros cinéticos fueron determinados para ambas actividades (TR y GR). A partir de una serie de ensayos efectuados con concentraciones crecientes de sustrato, se representó gráficamente la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (cinética *Michaeliana*). Para calcular los valores de las constantes catalíticas se construyó la gráfica doble recíproca de Lineweaver-Burk (Macarulla *et al.*, 1992), en la cual el punto de corte con el eje de ordenadas corresponde a la inversa de la V_{max} , y el inverso del punto que intercepta en las abscisas corresponde a la constante de *Michaelis-Menten* (K_m).

5.2.6.- Determinación del pH óptimo.

Se determinó el efecto del pH para ambas actividades (TR y GR). Los amortiguadores empleados fueron Bis-Tris 0.1M (pH 5.9), Imidazol 1mM (pH 6.45- 6.8), Tris- HCl 0.1M EDTA 1mM (pH 7.2-8.4) y AMPSO 0,1 M (pH 8.8). Se representó gráficamente la actividad específica en función del pH.

5.3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

5.3.1.- Determinación de la masa molecular.

La masa molecular del monómero fue determinada mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como se describió anteriormente en el análisis de pureza. Se emplearon marcadores de masa molecular conocida (30-80 kDa). La masa molecular de la enzima se determinó al relacionar gráficamente el logaritmo de la masa molecular de los marcadores en función de su movilidad relativa en el gel (RF), la cual fue determinada como la distancia recorrida de cada banda entre la distancia del frente de corrida. El valor de la RF de la enzima fue interpolado en la gráfica y el punto que

interceptó en las ordenadas correspondió a la masa molecular de la subunidad (Garfin, 1990 citado por García, 2000).

5.3.2.- Pruebas de inhibición enzimática.

Con el fin de conocer si la enzima de estudio es una selenoproteína (como lo es una TGR), se realizaron pruebas de inhibición en presencia de auranofin, el cual es específico para selenoenzimas (Alger *et al.*, 2002). La mezcla de reacción contuvo el amortiguador correspondiente, la enzima, sustrato (GSSG ó DTNB) y auranofin a diferentes concentraciones. La mezcla mencionada se incubó por 2 minutos y la reacción fue iniciada por adición de una alícuota de NADPH en un volumen final de 1 ml a 38 °C. Se relacionó gráficamente el porcentaje de la actividad relativa en función de la concentración del inhibidor (Rendón *et al.*, 2004).

5.3.3.- Determinación de la concentración inhibitoria al 50% (CI_{50%}).

Con los datos obtenidos en las pruebas de inhibición, se representó gráficamente el porcentaje de la actividad residual en función del logaritmo de la concentración de auranofin. El valor de la CI_{50%} se determinó como el punto que define el 50% de la actividad enzimática interceptado en las abscisas como el logaritmo de la concentración de auranofin (Plancarte, 2004).

5.3.4.- Secuencia del extremo N- terminal.

Con el fin de conocer si la enzima de estudio presenta homología con la TGR, se determinó la secuencia del extremo amino terminal. A partir del gel obtenido en el análisis de pureza se recortó la banda correspondiente a la proteína y se electrotransfirió mediante un sistema Trans-blot SD a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 45 min a 14 V. Se tiñó con azul de Coomassie R-250 y posteriormente

se sometió a degradación de Edman en un secuenciador fase gas (Instruments Beckman LF 3000) equipado con un sistema de HPLC (Rendón *et al.*, 2004).

5.3.5- Análisis in silico de la enzima.

Se realizó un alineamiento mediante el programa *clustalw* con el fin de comparar la secuencia obtenida con la TGR de otros organismos, posteriormente se efectuó el análisis de la estructura secundaria con el programa *predict protein*, empleando la interpretación de Mount, 2004.

6.- RESULTADOS

6.1.- PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA.

La fracción citosólica (180 ml) se obtuvo a partir de la homogeneización de 45g de parásitos adultos, y al culminar la diálisis para eliminar el exceso de sulfato de amonio se obtuvo un volumen total de 31 ml.

6.1.1.- Cromatografía de intercambio iónico.

Al finalizar la separación de la muestra a través de la columna de DEAE-SEF, y después de eluir con el gradiente lineal de NaCl se obtuvieron 65 fracciones. La actividad enzimática fue localizada en las fracciones de mayor absorbancia en el perfil proteico. Los resultados del cromatograma se muestran en la Fig. 1.

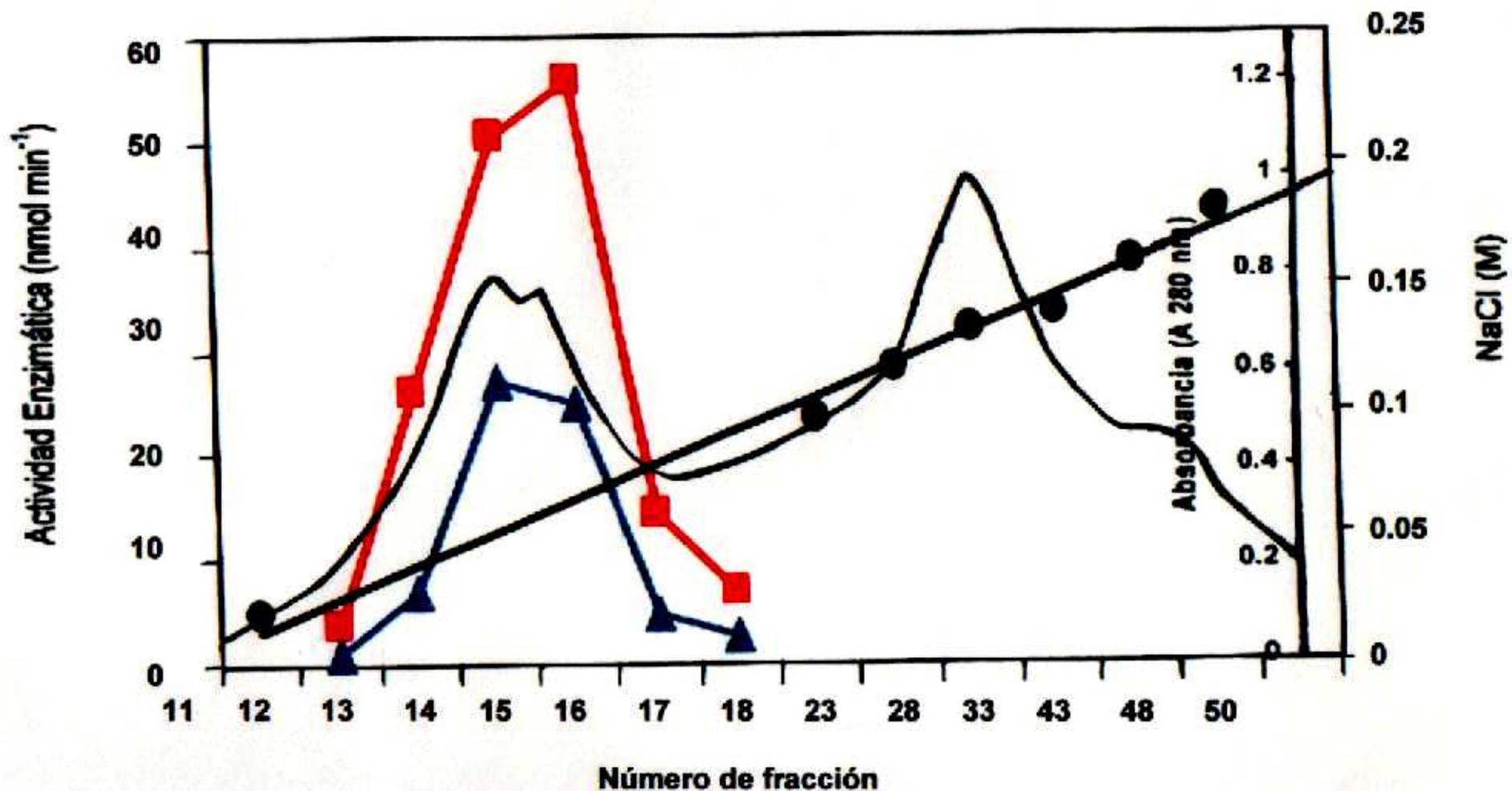


Fig. 1.- Cromatografía de la resina de intercambio iónico en DEAE- Sephace (pH 6.4). (—): muestra el perfil de absorbancia (A_{280}), (●): gradiente de NaCl (0-0.4 M) y actividad enzimática con GSSG (■) y DTNB (▲) como sustratos. Se obtuvieron 65 fracciones con volumen de 5 ml de elución colectados a un flujo de 6.6 ml/hr. El amortiguador empleado fue imidazol 50 mM (pH 6.4) EDTA 1 mM.

El cromatograma muestra que en las fracciones colectadas (13-18) se puede ver la actividad de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa y ambas coeluyendo. En relación a la actividad enzimática se puede observar mayor eficiencia con glutatión como sustrato (56 nmol min^{-1}), y en la cual la enzima se desprende de la resina con una fuerza iónica de $\sim 0.06 \text{ M}$ de NaCl.

6.1.2.- Cromatografía de afinidad.

Al finalizar la separación de la muestra en la columna de 2' 5'- ADP- sefarosa y después de eluir con el gradiente de NADPH, se obtuvieron 53 fracciones. El cromatograma se muestra en la Fig. 2.

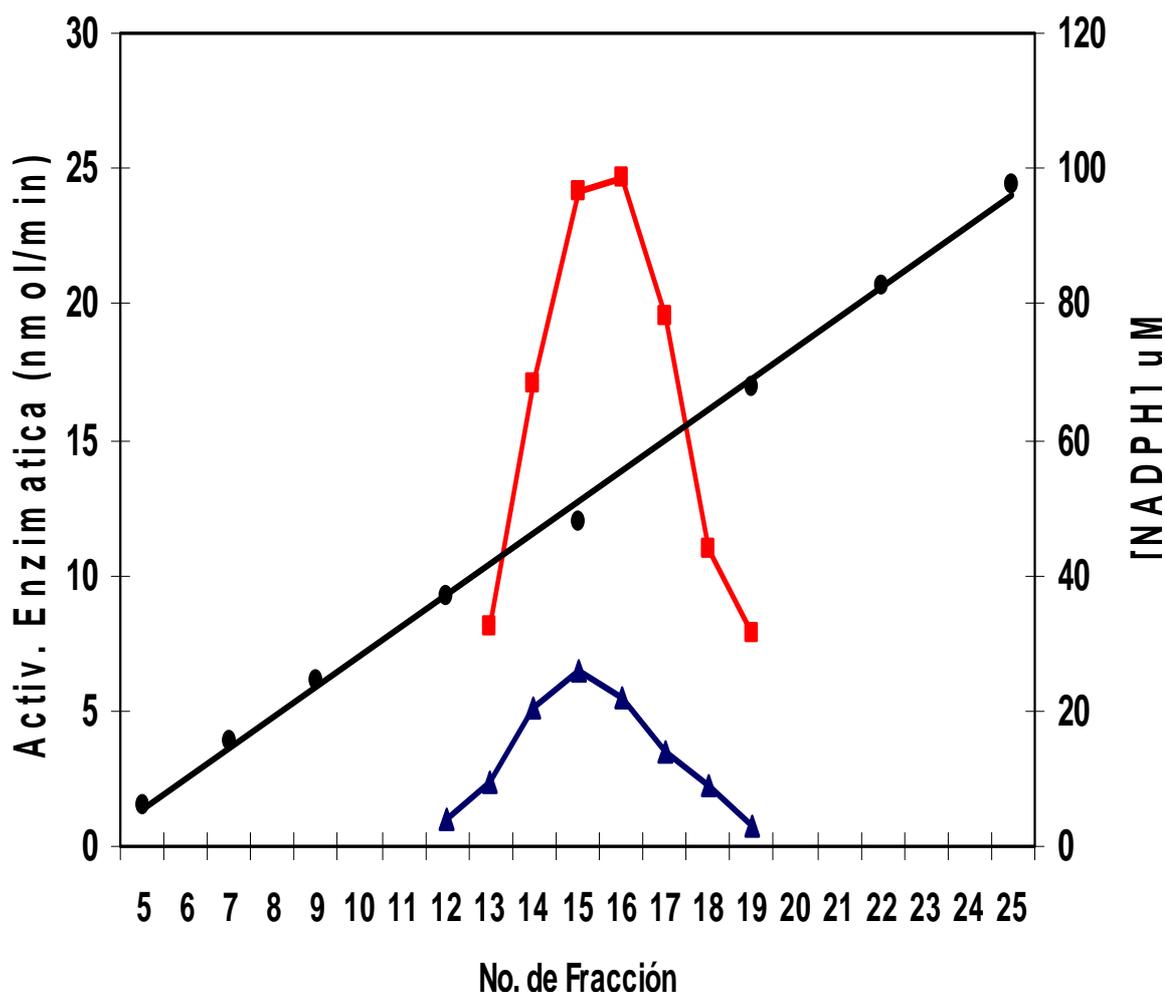


Fig. 2. Cromatografía de Afinidad con 2' 5'-ADP-SEF. (●): Gradiente de NADPH^+ (0-120 μM). Actividad enzimática con GSSG (■) y DTNB (▲) como sustratos. Las obtuvieron 53 fracciones colectadas a 6.6 ml/h. Los componentes de las reacciones fueron la enzima (0.5 μg), Tris- HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM, NADPH (100 μM) y GSSG (0.11 mM) en un volumen final de 1 ml.

En el cromatograma se observa la actividad catalítica (TR y GR) en las fracciones 12-19, y se puede observar que ambas coeluyen. Considerando la mayor actividad enzimática se puede observar mayor eficiencia con glutatión como sustrato (aprox. 25 nmol min⁻¹), y donde la enzima se despegó de la columna a una concentración de 55 µM de NADPH.

Al efectuar la diálisis para eliminar el exceso de NADPH y después de concentrar la proteína mediante ultrafiltración se obtuvo un volumen final de 5.1 ml.

El proceso de purificación se resume en la tabla 1.

Etapa	Vol. (ml)	Proteína ¹ (mg)	Actividad Específica (U/mg)		Cociente GSSG/DTNB	Rendimiento (%)		Veces de Purificación	
			DTNB	GSSG		DTNB	GSSG	DTNB	GSSG
² Crudo	180	988.26	0.023	0.076	3.304	100	100	1	1
³ (SO ₄) ₂ NH ₄	31	479.26	0.033	0.120	3.636	69.58	76.57	1.43	1.57
DEAE	25	9.15	1.61	3.322	2.063	64.83	40.47	70	43.7
2',5'-ADP	5.1	0.255	19.94	61.2	3.069	22.37	20.78	867	805.2

Tabla 1. Proceso de purificación de la enzima de *Fasciola hepatica*.

¹Concentración de proteína determinada por el método de Bradford, 1976.

²Obtenido a partir de 45 g de parásitos adultos.

³Correspondiente a 40-80% de saturación.

En cada una de las fases de purificación la enzima muestra mayor actividad específica con glutatión como sustrato. Se observa un rendimiento del 21.57 % en promedio para ambos sustratos.

6.1.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis de pureza efectuado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras mostró el siguiente revelado (Fig. 3).

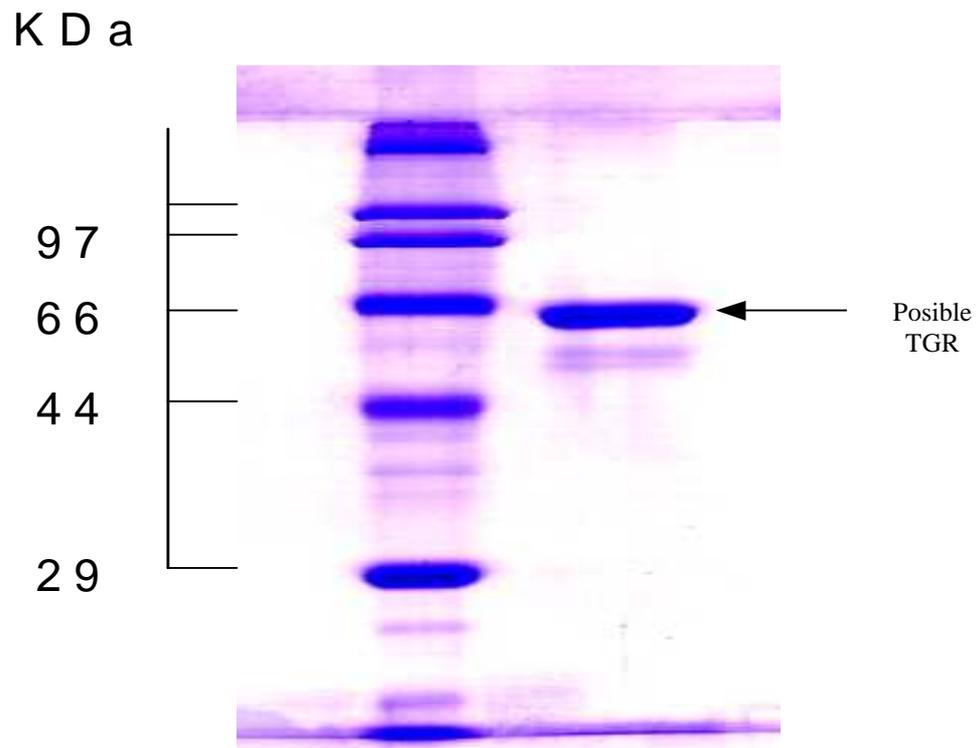


Fig. 3. Electroforesis en gel de Poliacrilamida- SDS (10 %). Marcadores de peso molecular (carril izquierdo) y banda correspondiente a la fracción de 2' 5'-ADP (carril derecho).

El electroforetograma muestra en la última fase de purificación (2' 5'-ADP) una banda visible que puede corresponder a la TGR de *Fasciola hepatica*; sin embargo, se observa que también es seguida por dos bandas de menor intensidad.

6.2.- CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MOLECULAR

6.2.1.- Parámetros cinéticos: V_{max} y K_m .

La cinética Michaeliana (Fig. 4A) fue convertida a una relación lineal mediante la ecuación doble recíproca de Lineweaver-Burk (Fig. 4B), a partir de la cual se calcularon gráficamente los valores de los parámetros cinéticos (Fig. 4).

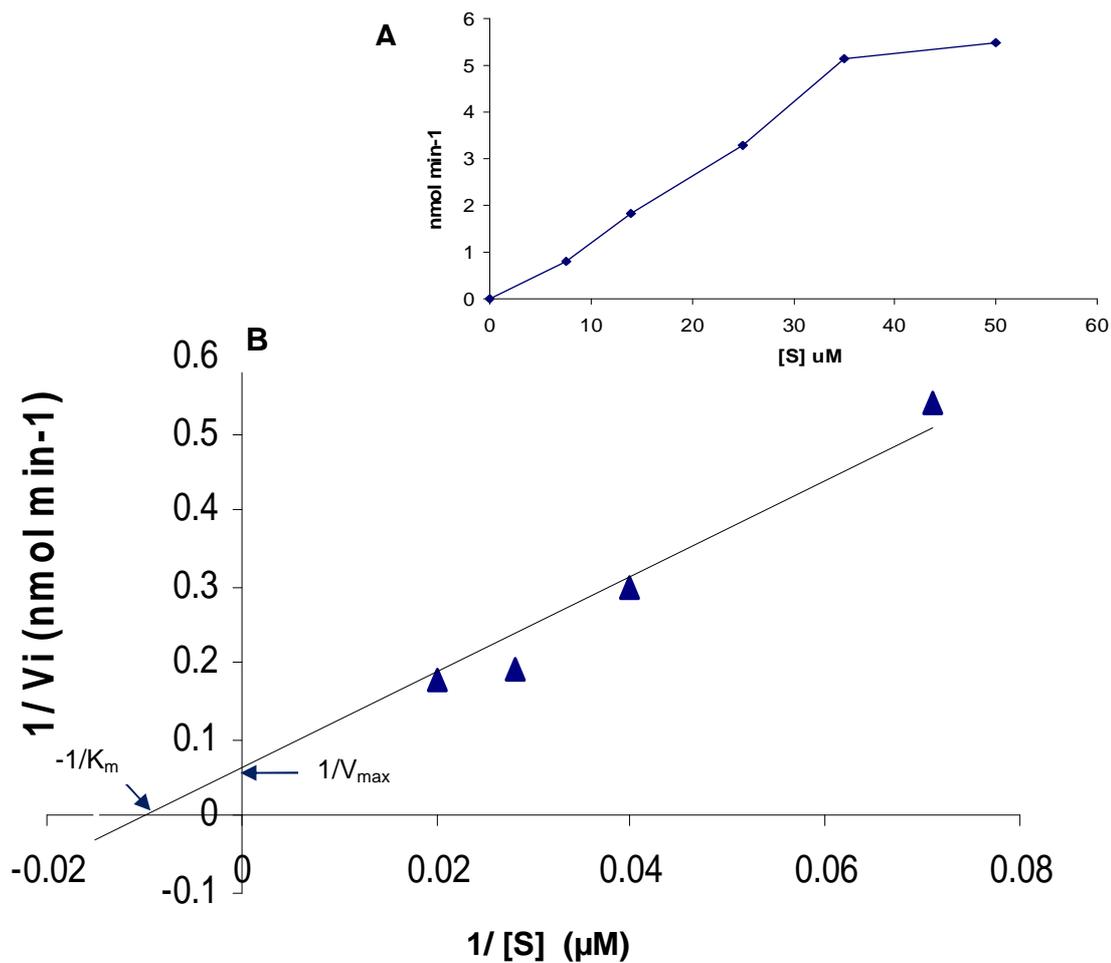


Fig. 4. Determinación de K_m y V_{max} con DTNB como sustrato. Se muestra la relación Michaeliana de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (A), y su representación doble recíproca de Lineweaver-Burk (B).

Cálculo de los parámetros cinéticos:

$$1/V_{max} = 0.06; V_{max} = 1/0.06 = \underline{17 \text{ nmol min}^{-1}}$$

$$-1/K_m = 0.01; K_m = -1/-0.01 = \underline{100 \mu\text{M}}$$

$$\text{Actividad Específica: } 17 \text{ nmol min}^{-1} / 5 \times 10^{-4} \text{ mg} = \underline{34 \text{ U mg}^{-1}}$$

Las gráficas para la determinación de los parámetros cinéticos con GSSG como sustrato se muestran a continuación. (Fig. 5).

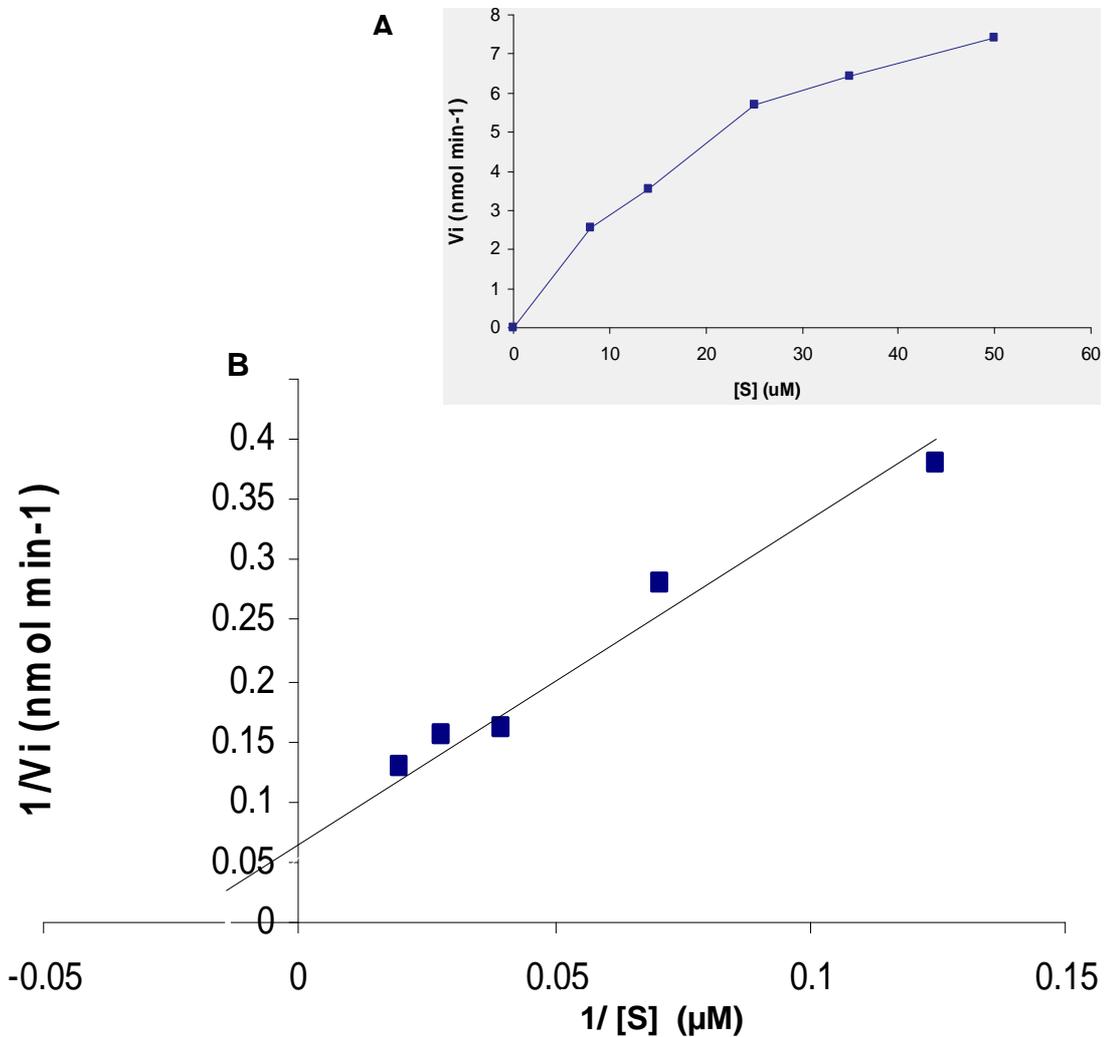


Fig. 5. Determinación de K_m y V_{\max} con GSSG como sustrato. Se muestra la cinética Michaeliana obtenida a partir de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (A) y el gráfico de la ecuación doble recíproca de Lineweaver-Burk (B).

Cálculo de los parámetros cinéticos:

$$1/V_{\max} = 0.065; V_{\max} = 1/0.065 = \underline{15.3 \text{ nmol min}^{-1}}$$

$$-1/K_m = 0.024; K_m = -1/0.024 = \underline{42 \mu\text{M}}$$

$$\text{Actividad Específica: } 15.3 \text{ nmol min}^{-1} / 5 \times 10^{-4} \text{ mg} = \underline{31 \text{ U mg}^{-1}}$$

6.2.2.- Actividad de glutarredoxina.

La gráfica de la actividad de glutarredoxina con HED y GSH es mostrada a continuación (Fig. 6).

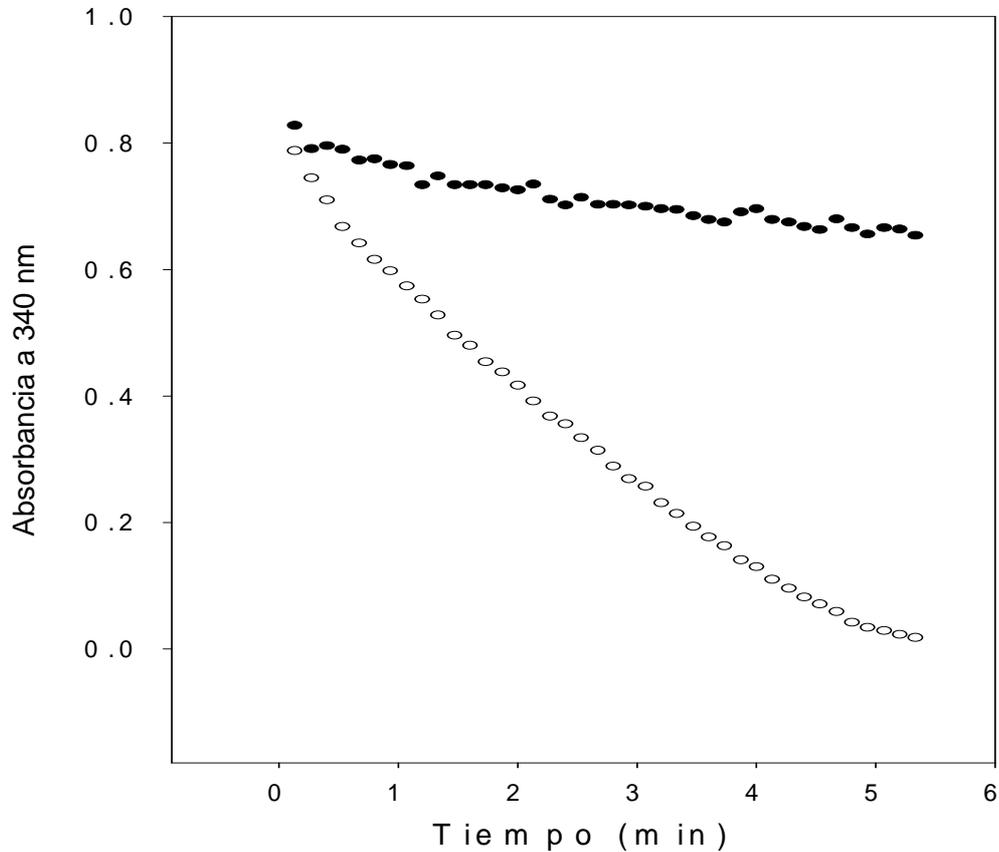


Fig. 6. Actividad de glutarredoxina.

(○): decremento de la absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH en presencia de la enzima. (●): Registro de la absorbancia de la mezcla en ausencia de la enzima. Los componentes de la reacción fueron amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM, HED (63 mg), GSSG (2.5 mM), NADPH (6 mM) y la enzima (0.5 µg).

Calculo de la actividad específica con HED:

$$\text{ACTIV. ESPECÍFICA} = \frac{\Delta A^{340} (\text{F. Conv.})(\text{Vol. final})}{\text{Cant. proteína}} = \frac{0.15 \text{ UA/min} (0.16077)(1.12 \text{ ml})}{5 \times 10^{-4} \text{ mg}} = 54 \text{ U/mg}$$

El gráfico muestra un decremento de la absorbancia del NADPH solo en presencia de la enzima, por lo que puede verse la existencia de actividad de glutarredoxina cuya actividad específica es de 54 U mg⁻¹.

6.2.3.- Determinación de la cinética histórica.

Los registros de absorbancia en función del tiempo para la determinación de la histéresis son mostrados a continuación (Fig. 7).

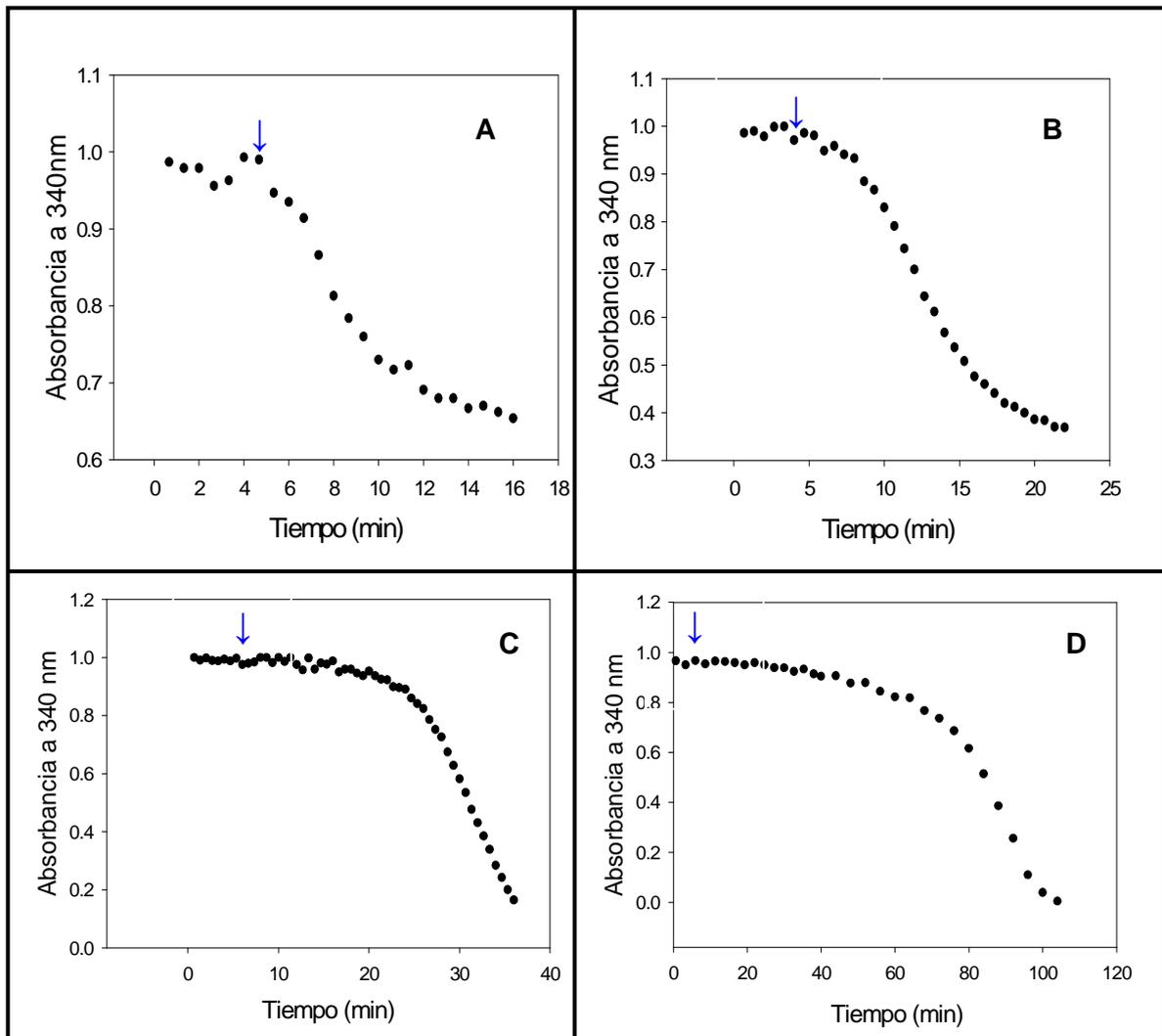


Fig. 7. Efecto del glutatión en el periodo *lag*.

Los componentes en la mezcla de reacción fueron Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1mM, NADPH (150 μM), enzima (0.5 μg) y GSSG a concentraciones crecientes. En A: 45.4 μM , B: 91 μM , C: 364 μM y D: 454 μM . (\downarrow): momento de adición del GSSG en el ensayo.

En las gráficas se observa que conforme se incrementa la concentración de glutatión en el ensayo se requiere mayor tiempo para activar la reacción que es catalizada por la enzima. Dicho comportamiento es característico de una TGR.

6.2.4.- Masa molecular de la subunidad.

La determinación de la masa molecular partió de un RF de 0.23, y al interpolar este valor en la grafica se obtuvo la siguiente relación (Fig. 8).

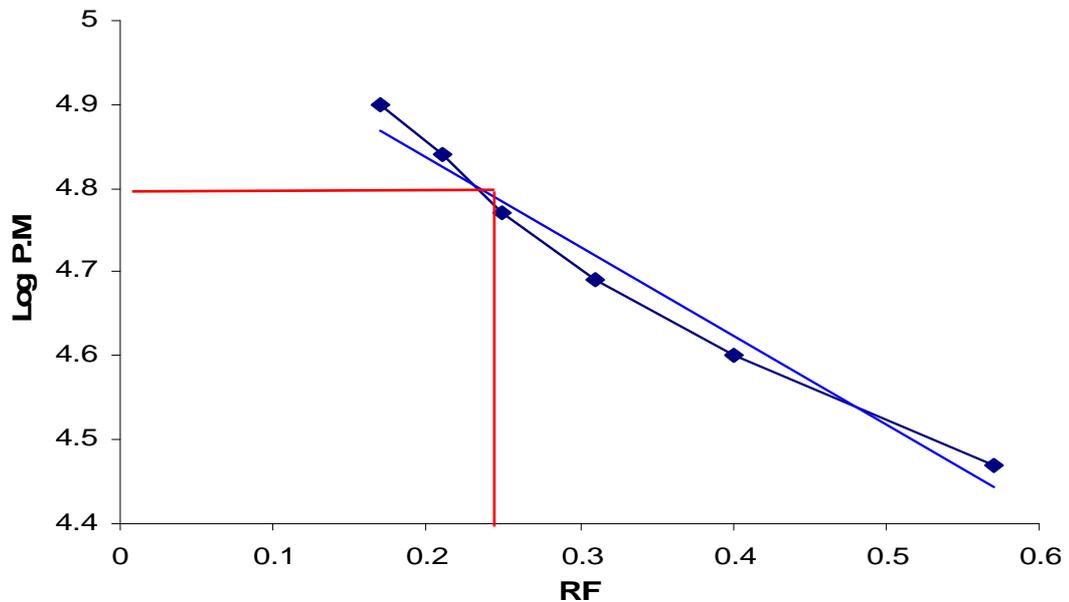


Fig. 8. Masa molecular de la subunidad.
El valor del RF corresponde a 0.23

El RF interpolado en las ordenadas corresponde a un valor de 4.80, y al determinar el antilogaritmo nos da la masa molecular del monómero.

Antilog 4.80 ~ 63 kDa.

6.2.5.- Número de recambio (K_{cat}) y Eficiencia catalítica.

A partir de la actividad específica (U/mg) y la masa molecular de la subunidad, se calculó el número de recambio, ciclo catalítico y la eficiencia catalítica del monómero para cada sustrato (DTNB, GSSG y HED), de acuerdo a los criterios de Macarulla, 1992 (Tabla 2).

Sustrato	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Masa Molecular molecular (kDa)	Número de recambio (seg ⁻¹)	Ciclo catalítico (seg)	Constante de <i>Michaelis</i> (M)	Eficiencia catalítica (M seg ⁻¹)
DTNB	34	63	35.7	0.028	1x10 ⁻⁴	357000
GSSG	31	63	32.55	0.030	4.2x10 ⁻⁵	775000
HED	54	63	56.7	0.017	ND*	ND*

Tabla 2. Determinación del número de recambio y eficiencia catalítica. Los parámetros fueron calculados para el monómero con DTNB, GSSG y HED como sustratos.

*ND: valor no determinado.

De acuerdo a los valores obtenidos en la tabla, el dímero sería capaz de catalizar la reducción de 65 moléculas de glutatión por mol de enzima en un segundo y tardaría 0.030 segundos en liberar cada molécula de sustrato transformado.

6.2.6.- Efecto del pH.

A continuación se muestra la gráfica correspondiente a los ensayos de actividad a diferentes pH (Fig. 9).

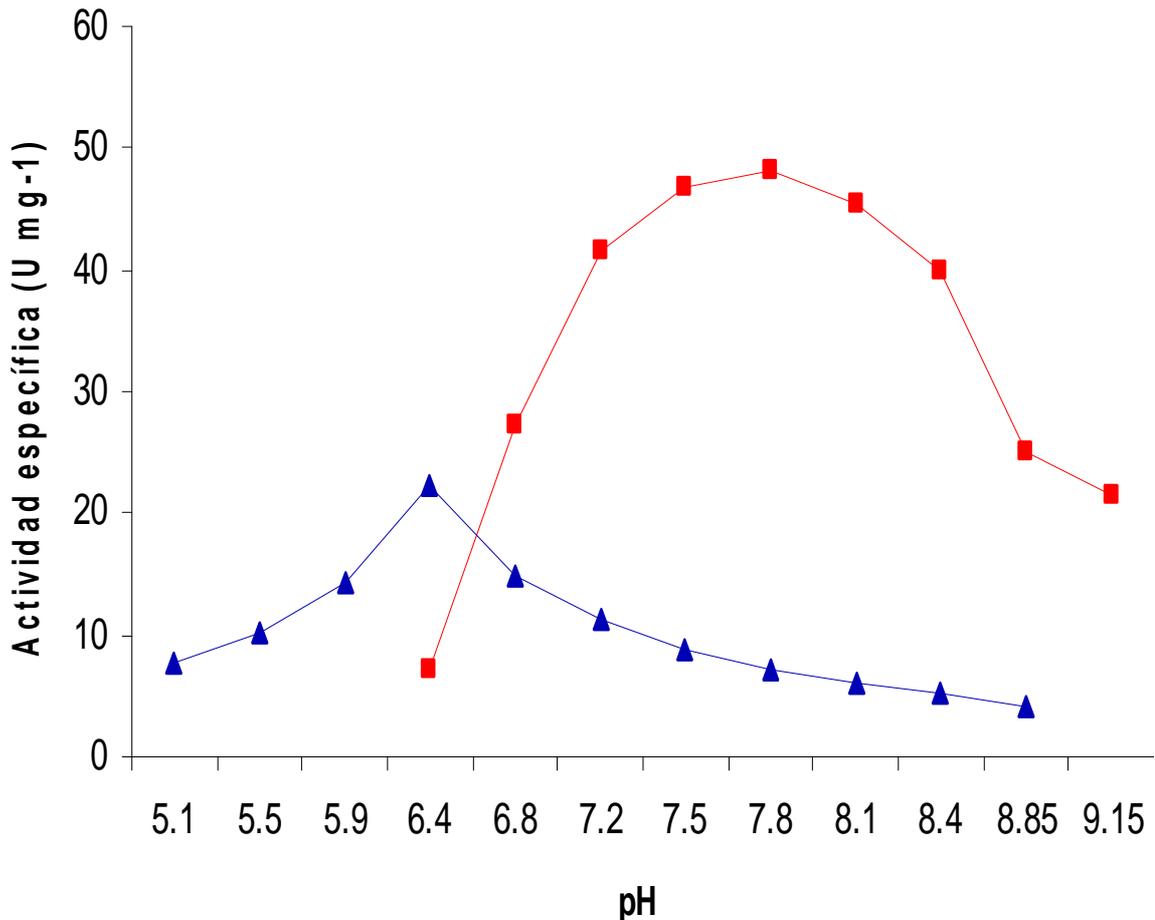


Fig. 9. Efecto del pH.

Actividad específica con glutatión (■) y DTNB (▲) como sustratos. La mezcla de las reacciones contuvieron la enzima (0.5µg), DTNB (45 µM) ó GSSG (8.45 µM), NADPH (4 µM) y amortiguador en un volumen final de 1 ml a 38°C. Las soluciones tampones empleadas fueron Acetatos 0.1 M (5.1-5.5), Bis-Tris 0.1M (5.9), Imidazol 1mM (6.45- 6.8), Tris- HCl 0.1M EDTA 1mM (7.2-8.4) ó AMPPO 0.1 M (8.8).

El gráfico muestra que la enzima presenta un pH óptimo 6.4 (DTNB) con imidazol 1 mM y pH 7.8 (GSSG) con Tris- HCL 0.1M EDTA 1mM.

6.2.7.- Pruebas de Inhibición.

Los ensayos de actividad enzimática en presencia de auranofin mostraron la siguiente relación (Fig. 10).

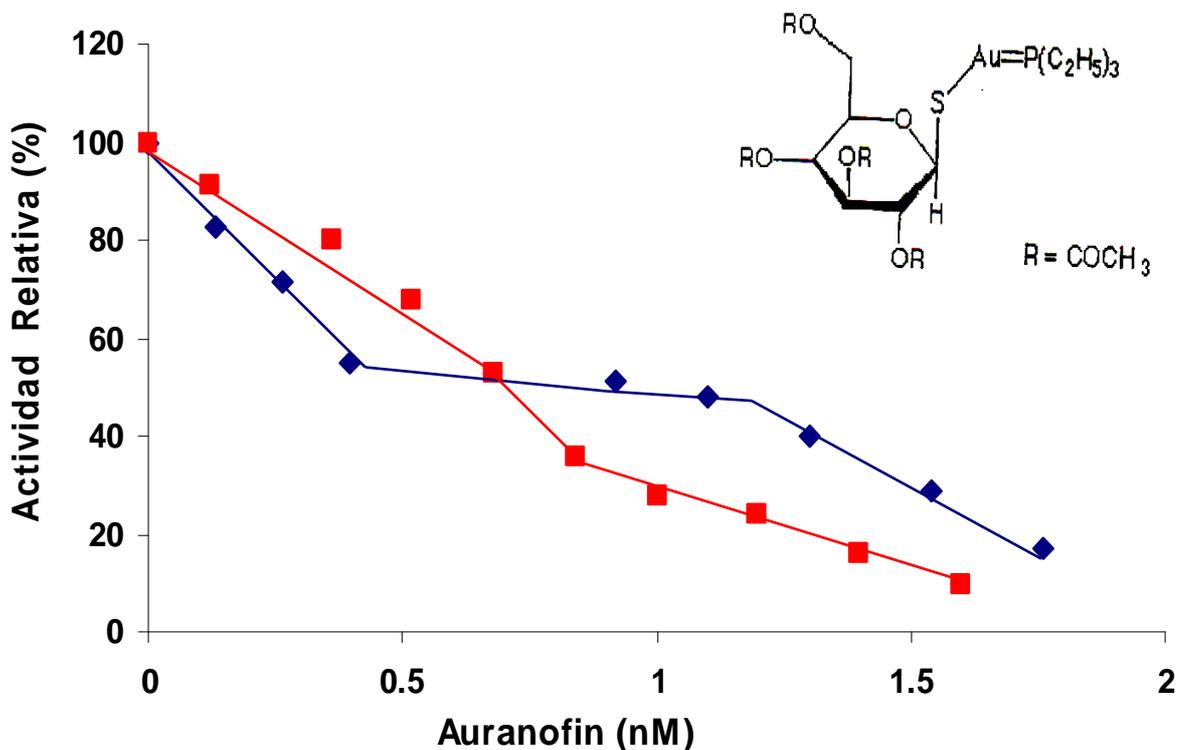


Fig.10. Efecto del auranofin en la actividad enzimática.

Inhibición enzimática con GSSG (■) y DTNB (▲) como sustratos. El ensayo sin inhibidor es considerado como el 100% de actividad enzimática. La mezcla de reacción contuvo amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 7.8) EDTA 1 mM, la enzima (0.5 µg), GSSG (170 µM), auranofin a diferentes concentraciones y NADPH (250 µM). Para el segundo caso la mezcla contuvo amortiguador imidazol 0.1 M (pH 6.4), la enzima (0.5 µg), DTNB (1 mM), auranofin y NADPH (200 µM) en un volumen final de 1 ml a 38 °C.

La gráfica muestra la disminución de la actividad enzimática conforme se incrementa la concentración de auranofin en el ensayo, por lo que la enzima de estudio se trata de una selenoproteína.

6.2.8.- Determinación de la Concentración inhibitoria al 50 % (CI_{50%}).

Al relacionar gráficamente la actividad relativa en función del logaritmo de la concentración de auranofin y al interpolar el punto que define el 50% de la actividad en las abscisas se obtuvo la siguiente relación (Fig. 11).

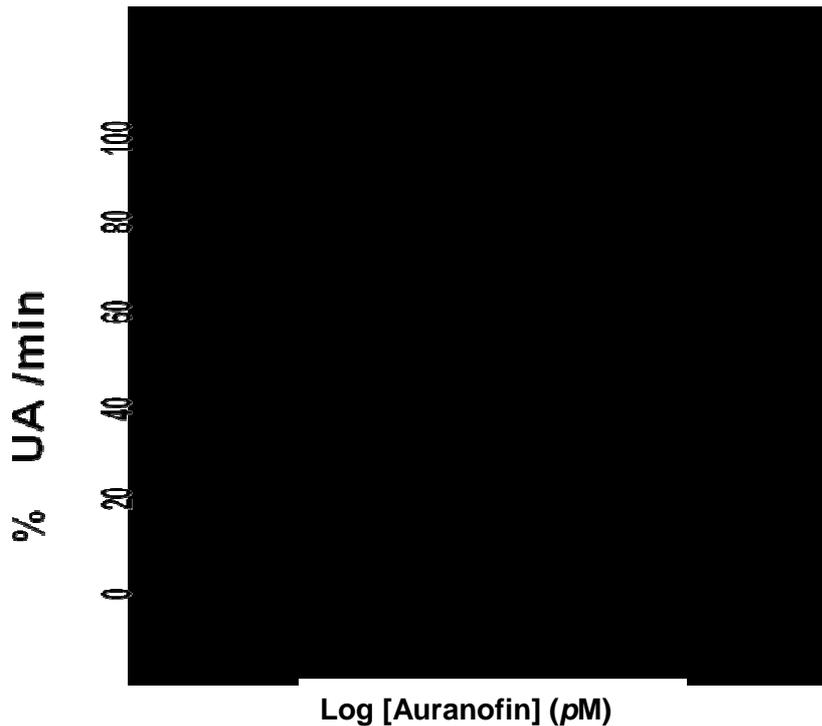


Fig. 11. Determinación de la concentración inhibitoria al 50%. Se muestra la curva de inhibición con DTNB (■) y GSSG (▲) como sustratos. La concentración de auranofin es expresada en picomolar (pM) (1pM= 1×10^{-12} M).

El punto que define el 50% de la inhibición enzimática corresponde a 3 pM (DTNB) y 2.8 pM (GSSG) y al determinar el antilogaritmo se obtuvieron los siguientes valores expresados en unidades de concentración nanomolar.

CI 50% DTNB: 1 nM.

CI 50% GSSG: 0. 63 nM.

6.2.9.- Secuenciación del extremo N- terminal.

El análisis de la estructura primaria del extremo N-terminal efectuado mediante la degradación de Edman reveló la presencia de 25 residuos que son mostrados a continuación:

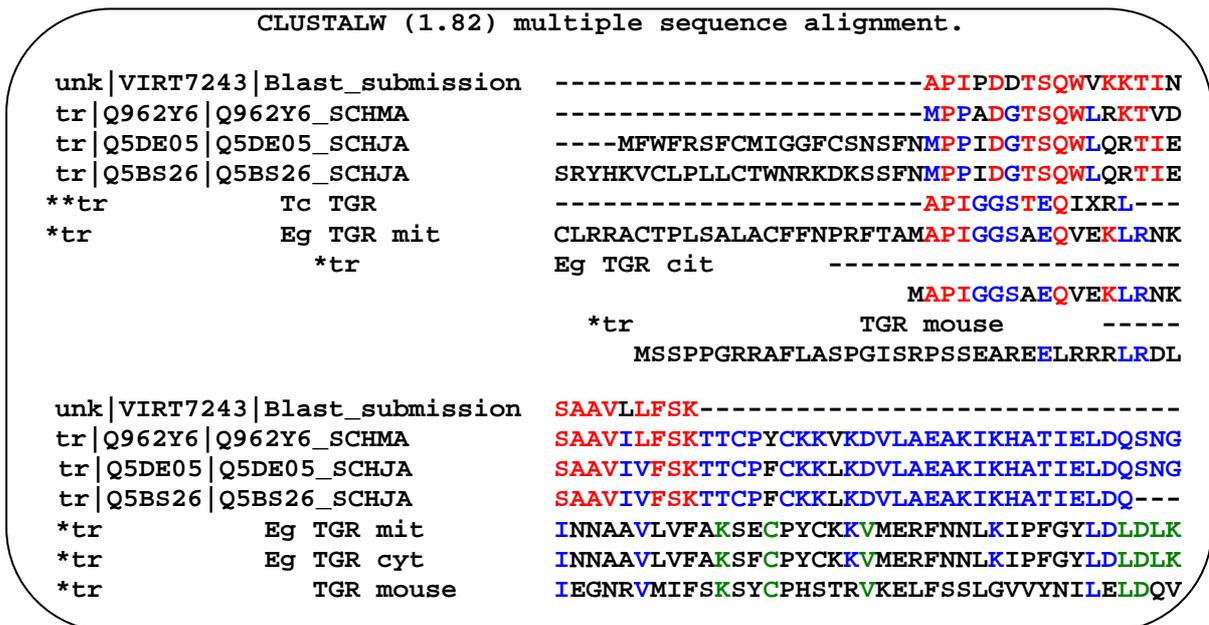
A P I P D D T S Q W V K K T I N S A A V L L F S K

Donde: A (alanina), P (prolina), I (isoleucina), D (Ac. Aspártico), T (treonina), S (serina), Q (glutamina), W (triptofano), K (lisina), N (asparagina), V (valina), F (fenilalanina) (Tomado de Voet, 1999).

6.3.- Análisis “in silico”.

6.3.1.- Alineamiento de secuencias.

Con el fin de comparar la homología con otras enzimas y localizar las regiones más conservadas, se realizó un alineamiento con el programa CLUSTALW, posteriormente se refinó mediante el programa *BOXSHADE* (Fig. 12).



(a): Tiorredoxina reductasa.

unk VIRT7243 Blast_submission	APIPDDTSQWVKKTINSAAVLLFSK
TR. <i>G. duodenalis</i>	VLNAAGLYWAVGHD
TR. <i>P. chrysogenum</i>	VVEANGLFYAVGHD
TR. <i>S. clavuligerus</i>	ELAATGLFIAVGHD
TR. <i>E. coli</i>	SLDVAGLFVAIGHG
TR. <i>E. hystolytica</i>	VVPVAGLFYAIGHG

Fig. 12. Alineamiento de la secuencia obtenida con la TGR de otras especies. La enzima de *Fasciola hepatica* (*unk*), TGR de *Schistosoma mansoni* (*SCHMA*), *Schistosoma japonicum* (*SCHJA*), *Taenia crassiceps* (*Tc*) y *Echinococcus granulosus* (*Eg*). Secuencias documentadas: (*Agorio *et al.*, 2003), (**Rendón *et al.*, 2004). ^(a): Comparación de la secuencia obtenida con la tiorredoxina reductasa de otros organismos (Tomado de Upcroft *et al.*, 1996).

La secuencia obtenida muestra que la enzima de estudio comparte ciertas regiones con otros helmintos. Se puede ver que la enzima de *F. hepatica* muestra un 52% de homología con la TGR de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*, 12% con la TGR de *Taenia crassiceps*, y 8% con *Echinococcus granulosus*. Al comparar la secuencia obtenida con la tiorredoxina reductasa de otros organismos se observa claramente la ausencia de similitud, lo que indica que la enzima de estudio se trata de una TGR.

6.3.2.- Análisis de la estructura secundaria.

El análisis efectuado mediante el programa *Predict Protein* mostró el siguiente resultado (Fig 13).

1.....2.....,
<u>Sec</u>	API P D TSQWV K K TINSAAVLLFS K
<u>PROF Sec</u>	HHHHHHHHHHHHHHH E E
<u>Rel Sec</u>	988776 89998898776 9
<u>SUB sec</u>	LLLLLL..HHHHHHHHHHH..... L

Fig. 13. Análisis de la estructura secundaria de la TGR de *Fasciola hepatica*. Sec (Secuencia obtenida). Prof Sec (Predicción del tipo de estructura secundaria): **H** (Conformación α - hélice), **E** (Conformación β - plegada), **L** (Loop), Rel Sec (Valor real de la predicción conforme se acerca a 9). SubSec (Predicción más confiable) (Predict Protein, <http://predictprotein.org/newwebsite/tools.html>).

De acuerdo a la predicción más confiable (*Sub Sec*), la enzima podría presentar una conformación de tipo α - hélice comprendida entre los residuos 9-19 de la región secuenciada.

7.- DISCUSIÓN

Las parasitosis han llamado la atención de manera especial en el campo científico, ya que ocasionan problemas de salud pública y pérdidas económicas importantes en el sector pecuario en muchos países en desarrollo (Cheng, 1978). En los parásitos platelmintos la TGR juega un papel fisiológico muy importante y por ello ha sido mirada como un blanco ideal para el diseño de fármacos (Salinas *et al.*, 2008). La TGR fue aislada por primera vez en células de testículo de ratón y se ha descrito en el metacéstodo de *Taenia crassiceps*, protoescólex de *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum* (Rendón *et al.*, 2004); sin embargo, a través de este estudio se sabe ahora que también existe en la fase adulta del trematodo *Fasciola hepatica*.

En el presente estudio se purificó la TGR del adulto de *Fasciola hepatica* a partir de la fracción citosólica, ya que es una enzima principalmente soluble (Rendón *et al.*, 2004); sin embargo, también se ha localizado a nivel mitocondrial en *E. granulosus* (Agorio *et al.*, 2003). En cuanto a estas dos variantes (TGR mitocondrial y citosólica), se sabe que difieren en la secuencia del extremo N-terminal, pero tienen idénticos los dominios de tiorredoxina y glutarredoxina debido a que ambas enzimas derivan de un *splicing* alternativo por selección de promotores (Agorio *et al.*, 2003).

Durante el fraccionamiento salino, la alta hicosolubilidad del sulfato de amonio permitió competir con las proteínas por la unión al agua, dejándolas insolubles al grado de precipitarse. De esta manera la TGR de *F. hepatica* fue obtenida en un 40-80% de saturación. Esta técnica también fue empleada para purificar la TGR de *Taenia crassiceps* (40-70 %) (Rendón *et al.*, 2004), protoescólex de *Echinococcus granulosus* (Agorio *et al.*, 2003) e incluso para tiorredoxina reductasa reportada en *Fasciola hepatica* (Carmona *et al.*, 2004).

El paso importante que permitió purificar la TGR de *F. hepatica* fue el análisis por cromatografía. El amortiguador Imidazol 50 mM EDTA 1mM (pH 6.4) empleado en la DEAE-Sef dotó de carga negativa a la proteína de estudio, ya que basarnos en el punto isoeléctrico de la TGR de *Taenia crassiceps* (pI: 5.2) (Rendón *et al.*, 2004), a un pH por arriba de este pI las proteínas adquieren carga negativa (Bjellqvist, 2000 citado por García, 2000) y adquieren la capacidad de adsorberse a la resina por diferencia de carga. Con el gradiente de NaCl se aumentó la fuerza iónica al grado de registrar la mayor actividad a 60 mM de NaCl, siendo menor para la elución de la TGR de *E. granulosus* (150 mM) (Agorio *et al.*, 2003). Con la DEAE-Sef se pudieron remover algunas proteínas; sin embargo, la separación por cromatografía de afinidad nos permitió obtener a la TGR en el mayor grado de pureza alcanzado, ya que el 2' 5'- ADP contiene una porción análoga al NADPH (Amersham farmacia biotech, 1999), lo cual hace un ligando específico para deshidrogenasas y otros biocatalizadores dependientes de este cofactor. Este ligando también fue empleado para purificar la TGR de *Taenia crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004), mamífero (ratón) (Sun *et al.*, 2001), *Echinococcus granulosus* (Agorio *et al.*, 2003) y la tiorredoxina reductasa de *Fasciola hepatica* (Carmona *et al.*, 2004).

Al término de la purificación se obtuvieron 250 µg de proteína (50 µg/ml) a partir 45 g de parásitos adultos. El promedio del porcentaje de recuperación (rendimiento) entre ambos sustratos (21 %) se mostró mayor al obtenido para la tiorredoxina reductasa de *F. hepatica* (2.4 %) (Carmona *et al.*, 2004) y similar al reportado para la TGR de *T. crassiceps* (26 %) (Rendón *et al.*, 2004). Se purificó mayor veces en promedio con ambos sustratos (836 veces) que la tiorredoxina reductasa de *F. hepatica* (34.6 veces) (Carmona *et al.*, 2004) y *T. crassiceps* (647 veces) (Rendón *et al.*, 2004).

La TGR de *F. hepatica* tuvo la capacidad de reducir al glutatión, pero fue incapaz de reducir directamente a la tiorredoxina de *Plasmodium falciparum*; sin embargo, al igual

que la TGR de *T. crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004), *E. granulosus* y la tiorredoxina reductasa de *Fasciola hepatica* (Carmona *et al.*, 2004), la actividad de tiorredoxina reductasa pudo demostrarse a través de la reducción del sustrato artificial 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) a ácido 5-tionitrobenzoico (TNB) (Agorio *et al.*, 2003). La TGR de *F. hepatica* ejerció también actividad de glutarredoxina (54.7 U/mg), una proteína similar a la tiorredoxina pero que es reducida directamente por glutatión (GSH). Esta actividad se mostró mayor a la efectuada por la tiorredoxina reductasa de *F. hepatica* (0.47 U mg⁻¹) (Carmona *et al.*, 2004) y la TGR de *T. crassiceps* (19.2 U mg⁻¹) (Rendón *et al.*, 2004). Estos resultados mostraron la multifuncionalidad de la enzima de *Fasciola hepatica*, tal como lo es la TGR de *Echinococcus granulosus* (Agorio *et al.*, 2003), *Schistosoma mansoni* (Alger *et al.*, 2002) y *Taenia crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004).

La técnica de SDS-PAGE permitió analizar el grado de pureza alcanzado al separar las proteínas según su carga y masa molecular bajo la acción de un campo eléctrico en un tamiz molecular (Bjellqvist, 2000 citado por García, 2000). Basándonos en la subunidad de la TGR de *T. crassiceps* (65 kDa) (Rendón *et al.*, 2004), se eligió la concentración de poliacrilamida (T 10%) que nos permitió separar la proteína de estudio, ya que una mayor concentración tendería a disminuir el diámetro del poro, lo cual es recomendable para separar proteínas por debajo de 50 kDa (García, 2000). El análisis electroforético reveló la presencia de una banda de aproximadamente 63 kD que correspondió a la subunidad de la TGR de *F. hepatica*, dicha masa molecular es muy similar a la TGR de *Taenia crassiceps* (65 KDa) (Rendón *et al.*, 2004), *Echinococcus granulosus* (66 KDa) (Agorio *et al.*, 2003), *Schistosoma mansoni* (65 KDa) (Alger *et al.*, 2002), e incluso para la tiorredoxina reductasa de *Fasciola hepatica* (60 kDa) (Carmona *et al.*, 2004). El electroforetograma obtenido también nos permitió analizar el grado de pureza alcanzado, ya que reveló la presencia de dos bandas de baja intensidad y de menor masa

molecular, lo que no descarta la posibilidad de que alguna pudiera corresponder a la tiorredoxina reductasa reportada en *Fasciola hepatica* por Carmona *et al.*, 2004.

En lo que respecta a los parámetros cinéticos obtenidos, la K_m (constante de *Michaelis*) se refiere a la concentración de sustrato que promueve la mitad de la velocidad máxima, lo que permite lograr la semisaturación y de esta manera ejercer una catálisis más eficiente. En la TGR de *T. crassiceps* se reportó una K_m 15 μM (GSSG) y 49 μM (DTNB), mientras que la TGR de *S. mansoni* 205 μM (GSSG) y 710 μM (DTNB) (Belleli *et al.*, 2008). En el presente trabajo se obtuvo una K_m 42 μM (GSSG) y 100 μM (DTNB), por lo que a dichas concentraciones la TGR de *F. hepatica* podría efectuar una catálisis más eficiente con los respectivos sustratos. Estos resultados muestran que la enzima de estudio es más afín por el glutatión, ya que a menor K_m mayor afinidad debido a que se requiere menos sustrato para lograr la semisaturación (González *et al.*, 2000), esta afinidad podría deberse principalmente a que el glutatión es su sustrato natural.

A partir de los parámetros cinéticos obtenidos (K_m y V_{max}) y la masa molecular de la subunidad, se obtuvo un número de recambio de 35.7 seg^{-1} (DTNB) y 32.55 seg^{-1} (GSSG), los cuales indican que la TGR de *F. hepatica* sería capaz de catalizar la reducción de 32 moléculas de GSSG por mol de enzima en un segundo, y dicha acción tardaría 0.03 seg en liberar cada molécula de sustrato transformado. Estos resultados se muestran mayores a los reportados para la TGR de *Schistosoma mansoni* (1.2 seg^{-1} con DTNB) y (0.19 seg^{-1} con GSSG) (Belleli *et al.*, 2008). El K_{cat} con HED obtenido (56.7 seg^{-1}) resultó mayor que la TGR de *T. crassiceps* (21 seg^{-1}) (Rendón *et al.*, 2004) y mamífero (0.10 seg^{-1}) (Sun *et al.*, 2001). La eficiencia catalítica obtenida se mostró mayor con glutatión (775000 $\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$) que con DTNB (357000 $\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$), siendo

mayor que la TGR de *S. mansoni* ($927 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$), ratón ($176471 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) y *T. crassiceps* con glutatión ($334000 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) (Rendón *et al.*, 2004).

Una propiedad interesante encontrada en este estudio fue la aparición de la histéresis. Este comportamiento se caracterizó principalmente por la aparición de un retardo (*Lag time*) en la activación de la enzima para catalizar la reacción, dicha conducta fue más evidente conforme se incrementó la concentración de glutatión en el ensayo. La histéresis en este caso se produjo por incremento de sustrato; sin embargo, se ha visto que también puede depender de otros factores como la concentración de la enzima y la proporción [GSSG]/[GSH] en el ensayo (Salinas *et al.*, 2008). Un caso especial sucedió con la glutatión reductasa de eritrocito humano, la cual mostró la aparición de histéresis a bajas concentraciones de GSSG o concentraciones moderadas de NADPH, pero al incrementar la concentración de GSSG se podía observar la desaparición del tiempo *Lag* (Worthington *et al.*, 1976; citado por Rendón *et al.*, 2004). La histéresis observada en este estudio muestra otra evidencia para demostrar que la enzima de estudio se trata de una TGR, tal como el comportamiento reportado en la TGR de *Taenia crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004) y la TGR mitocondrial y citosólica de *Echinococcus granulosus* (Salinas *et al.*, 2008). Las explicaciones que han surgido atribuyen esta conducta a un cambio conformacional en respuesta al glutatión (GSSG) a través de un proceso de glutationalización, el cual puede estar relacionado con algunas rutas de señalización intracelular bajo condiciones de estrés oxidativo en células animales, tales como la respuesta inmune del hospedero (Salinas *et al.*, 2008). Por otro lado, la histéresis de la TGR de *Taenia crassiceps* se ha atribuido a un efecto inducido por la unión del GSSG a la TGR en un sitio que no está disponible para la tiorredoxina, y/o una posible existencia de dos sitios para el GSH, como son el dominio de la glutarredoxina en el extremo N-terminal de la enzima (alta afinidad hacia GSH) y el sitio catalítico involucrado en la reducción de GSSG (baja afinidad hacia el GSSG), siendo el dominio

de glutarredoxina el sitio de mayor unión al GSSG, el cual puede ser desplazado lentamente por GSH e involucrando a la vez modificaciones covalentes (Rendón *et al.*, 2004).

Los ensayos de inhibición efectuados con ambos sustratos (GSSG y DTNB) mostraron el bloqueo de la actividad enzimática en presencia de auranofin, un inhibidor que es específico para selenoenzimas (Alger *et al.*, 2002), por lo que dichos resultados han mostrado que la enzima de estudio se trata de una selenoproteína, tal como lo es la TGR de *T. crassiceps*, *S. mansoni* y *E. granulosus*, y donde ambas actividades dependen de residuos de selenocisteínas, unos equivalentes a una cisteína pero con un átomo de selenio en lugar de azufre. La selenocisteína se encuentra codificado por UGA el cual señala el fin de la traducción; sin embargo, en conjunción con un fragmento del ARNm (SecIS: Secuencia de Inserción de la Selenocisteína) codifica para la inserción de dicho aminoácido en la cadena polipeptídica (Agorio *et al.*, 2003). Dado que la selenocisteína del centro activo C- terminal podría jugar un papel esencial durante la biocatálisis, su función podría estar altamente involucrada en la supervivencia del parásito, por lo que el bloqueo de la TGR en *F. hepatica* podría constituir un mecanismo terapéutico para controlar la fasciolosis, ya que algunos estudios “*in vivo*” han demostrado que el auranofín (2.5 μM) ha sido capaz de matar larvas de *E. granulosus* en 48 horas (Salinas *et al.*, 2008).

En el presente estudio se obtuvo una concentración inhibitoria al 50% ($\text{CI}_{50\%}$) de 0.63 nM (GSSG) y 1 nM (DTNB), indicando que a dichas concentraciones la actividad es disminuida al 50%. Estas concentraciones se muestran aún menores para la $\text{CI}_{50\%}$ de la TGR de *Schistosoma mansoni* (10 nM GR y 7 nM TR) (Alger *et al.*, 2002).

El estudio que también permitió evidenciar la existencia de una TGR en *F. hepatica* fue la secuencia del extremo N- terminal. El análisis mostró el 52% de homología con la

TGR de *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum*, no encontrando homología con la TGR de mamíferos (ratón), ni con tiorredoxina reductasa de otros organismos. El alineamiento reveló la presencia de algunos residuos conservados, y de acuerdo con Sun *et al*, 2004 es muy posible la conservación del sitio activo selenodependiente en todas estas enzimas. Estos resultados indican el emparentado filogenético entre dichas especies parasitarias, en las cuales a partir de un ancestro común el dominio de la glutaredoxina y tiorredoxina reductasa han logrado fusionarse a través de la evolución bioquímica (Sun *et al.*, 2004).

Un aspecto importante a mencionar es la ubicación de la TGR en los tejidos del parásito. La TGR en los mamíferos (ratón) ha sido encontrada muy abundante en las gónadas, en las cuales podría jugar un papel importante en la formación y madurez de los espermátides (Sun *et al*, 2005). La tiorredoxina reductasa de *Faciola hepatica* ha sido inmunolocalizada en el parénquima (Carmona *et al*, 2004), una capa que contiene los cuerpos celulares del sincitio que conforman el tegumento (Meglitsch, 1972), y en este último puede existir mayormente la TGR de *F. hepatica*, ya que por su multifuncionalidad podría brindar al parásito la protección contra los radicales libres producidos por las células defensivas del hospedero durante el proceso inflamatorio, además en este tejido se ha localizado la tiorredoxina de las formas juveniles y adultos de *F. hepatica* (Salazar *et al.*, 2001).

De esta manera se ha evidenciado la presencia de la TGR en *F. hepatica*, un organismo relevante en el campo científico por su importancia médica y veterinaria. A través de este estudio podemos tener una explicación más detallada en relación a los mecanismos de protección contra las ERO generadas por la respuesta inmune del hospedero, e incluso por su propio metabolismo. Estos resultados en conjunción con la información

reportada pueden ayudarnos a integrar un paso de una posible ruta que muestre la integración del sistema de tiorredoxina y glutatión en funciones relacionadas con el desarrollo y supervivencia del parásito, tales como la síntesis de DNA, detoxificación de hidroperóxidos, regulación redox, control del crecimiento, liberación de glutatión y la activación de tiol proteasas (Carmona *et al.*, 2004) (Fig. 14). En relación a estas últimas, se considera que la tiorredoxina y tiorredoxina peroxidasa pudieran contribuir de manera importante en la estabilización de los residuos de cisteína de los centros activos de las catepsinas *L1* y *L2*, como las proteasas de mayor secreción en formas juveniles y adultos de *F. hepatica* (Dalton *et al.*, 1989), mismas que han sido involucradas en procesos de embriogénesis y migración del parásito a través del tejido hepático (Alcalá *et al.*, 2006). Dado el papel de las catepsinas, el bloqueo de la TGR también podría impedir la activación de dichas proteasas y reducir de esta manera la infección, e incluso se podría eliminar la enfermedad antes de causar daño por migración hepática (Law *et al.*, 2003).

F. hepatica se encuentra expuesto al anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Entre sus líneas defensivas están la superóxido dismutasa, la cual detoxifica el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y agua (Piacenza *et al.*, 1998; citado por Salazar *et al.*, 2001), y dado que estudios han indicado la ausencia de la glutatión peroxidasa y catalasas para remover el peróxido de hidrógeno generado (Sánchez *et al.*, 1987; citado por Salazar *et al.*, 2001), se puede atribuir ahora a la TGR el papel de reducir tiorredoxina y glutatión, los cuales pueden participar en la depuración del peróxido de hidrógeno para impedir la formación del radical hidroxilo. Con el conocimiento de la TGR en *F. hepatica* se puede sugerir que la TGR sea el principal vínculo entre los sistemas de tiorredoxina y glutatión en los gusanos planos y

que muy posiblemente podría estar reemplazando a la tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa convencionales a través de la evolución bioquímica (Salinas *et al.*, 2004).

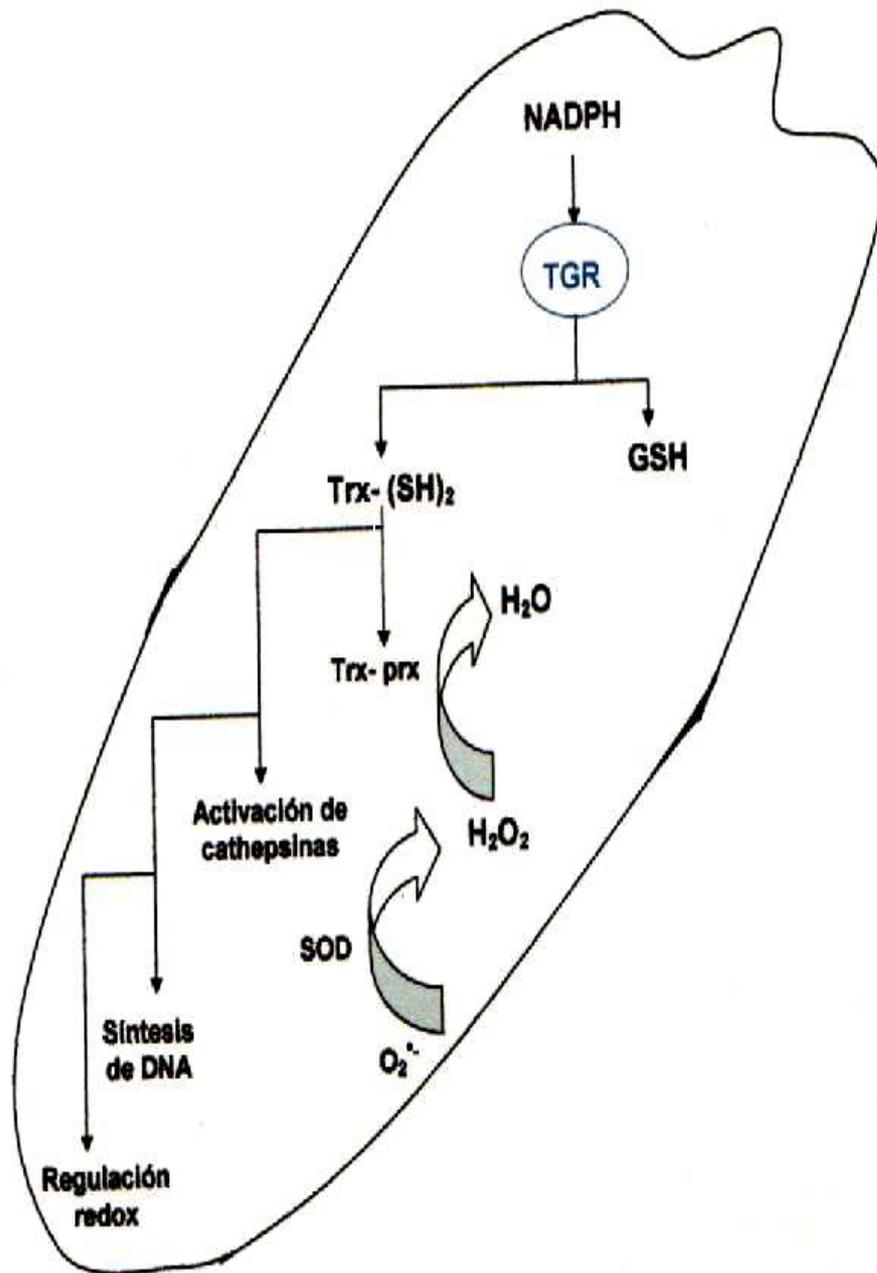


Fig. 14. Vinculación del sistema de tiorredoxina y glutatión en *Fasciola hepatica*. El NADPH abastecería de equivalentes reductores a la TGR para catalizar la reducción de tiorredoxina y glutatión. El parásito no contiene glutatión peroxidasa, por lo que la tiorredoxina a través de la tiorredoxina peroxidasa participaría en la depuración del peróxido de hidrógeno (Salazar *et al.*, 2001).

8.- CONCLUSIONES

- El trematodo *Fasciola hepatica* contiene la enzima tiorredoxina glutatión reductasa, los criterios que lo evidencian son:
 - Multifuncionalidad de actividades (TR, GR y Grx)
 - La masa molecular de la subunidad
 - El comportamiento histérico
 - La inhibición con auranofin
 - La secuencia del extremo N-terminal
- La TGR se mostró más eficiente con glutatión como sustrato
- La TGR de *Fasciola hepatica* se trata de una selenoenzima donde el residuo de selenocisteína es esencial para la biocatálisis.
- El análisis de la estructura primaria mostró mayor homología con la TGR de *Schistosoma mansoni*, por lo que muestran mayor relación filogenética.
- El procedimiento de purificación nos permitió obtener la TGR casi hasta homogeneidad, por lo que es necesario el uso de métodos aun más específicos.
- La TGR constituye otro mecanismo relacionado con los procesos redox, y el principal vínculo entre los sistemas de tiorredoxina y glutatión en *Fasciola hepatica*.
- Dada la importancia de la TGR por su amplia multifuncionalidad en *F. hepática*, podría ser mirada ahora como un blanco terapéutico ideal para el diseño de fármacos dirigidos contra esta parasitosis.
- La TGR podría emplearse biotecnológicamente para la producción de proteínas disulfuro (terapéuticas) que son activadas por reducción.

9.0.- Literatura citada

Agorio A, Chalar C, Cardozo S and Salinas G. (2003). Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase. J. Biol. Chemistry. 278 (15): 12920- 28.

Alcalá Y, Ibarra I, Sumano H and García J. (2006). Dose-response inhibitor in a murine model of fasciolosis. Parasitol. Res. 98: 438-442.

Alger HM and Williams DL. (2002). The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. Molecular & Biochemical Parasitology. 121: 129- 139.

Amersham pharmacia biotech. (1999). Ion exchange Cromatography. Principles and Methods. Ed.AA. pp.157.

Amersham pharmacia biotech. (1999). Cromatography Affinity. Principles and Methods. Ed.AC. pp.156.

Bellelli A, Brunori M, Dimastrogiovanni D, Boumis G, Miele A and Angelucci F. (2008). Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: the structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. Proteins. 72 (3): 936- 945.

Bermeyer. (1970). Methods in enzymatic analysis. 3: 251- 258.

Botero D and Restrepo M. (2003). Parasitosis humanas. 4° Ed. Corporación para investigación biológica. Pp. 506.

Borzzone TG y Gonzáles BS. (1995). Investigación básica y enfermedades Respiratorias. Boletín de la Escuela de Medicina. Universidad Católica de Chile. Vol. 24.

Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-54.

Burton DJ and Routh JT. (1977). Química orgánica y Bioquímica. Mcgraw-Hill. México, D.F. Pp. 416.

Carmona C, Maggolioli G, Piacenza L and Carambula B. (2004). Purification, characterization and immunolocalization of thiorredoxin reductase from *Fasciola hepatica*. J. Parasitology. 90 (2): 205-211.

CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Cheng CT. (1978). Parasitología general. Ed. AC. Madrid, España. Pp. 965

Cooper GT. (1997). The methods of Biochemistry. A wiley- interscience publication. U.S.A. Pp. 423

Dalton JP and Heffernan M. (1989). Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica* parasite. Molecular and biochemical parasitology. 35: 161- 166.

Gallego BJ. (1969). Atlas de Parasitología. Jover, S.A. Barcelona, España. Serie A / Num. 1.

García PHM. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ.Diag. (2): 1. Pag. 31-41.

García RJA. (1987). Microbiología y Parasitología Médica. 2 ed. Ediciones científicas y técnicas, S.A. Barcelona, España. Pag. 860.

Gladyshev VN, Sun QA, Su D, Novoselov SV, Carlson BA and Hatfield DL. (2005). Reaction Mechanism and Regulation of Mammalian Thioredoxin/Glutathiones Reductase. Biochemistry. 44: 14528- 14537.

González S et al. 2000. Biomoléculas. 5° ed. Manual de laboratorio. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Pp. 118.

Guevara FA. (2004). Caracterización parcial del sistema de Glutación y Tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología experimental). Facultad de Ciencias, UNAM. Pp. 55.

Grant MC. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast and responses to stress conditions. MicroReview. Molecular Microbiology. 39 (3): 533- 541.

Holmgren A and Bjornstedt M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods in Enzimology. 252: 199-208.

Holmgren A. (1985). Thiorredoxin. Ann. Rev. Biochem. 54: 237- 271.

Huerta JM, Ortega CME, Cobos PM, Herrera HJG, Días CA and Guinzberg PR. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. Asociación Interciencia. Caracas, Ven. (30): 12. Pag. 728-734.

Lamothe AR y García PL. (1988). HelminCIAS del hombre en México. AGT Editor, S.A. México, D.F.

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

Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedra D and Ponting R. (2003). Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. Infect. Immune. (12): 71. Pag. 6921-6932.

Littlechild JA, Parra F, Maggioli G, García RE, Isupov M and Line K. (2008). The *Fasciola hepatica* thioredoxin: High resolution structure reveals two oxidation states. Molecular & Biochemical Parasitology. 161: 44- 48.

López CAM. (2000). Bioquímica y Biología molecular. Mcgraw Hill. Facultad de Medicina, UNAM. Pp. 136.

Macarulla JM, Marino A y Macarulla A. (1992). Bioquímica Cuantitativa. Vol. II. Editorial Reverté, S.A. España. Pp. 723.

Mas-Coma S, Bargues MD and Valero MA. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal of Parasitology*. 35: 1255-1278.

Mehlhorn H and Piekarsk G. (1993). Fundamentos de Parasitología. 3º Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp. 391.

Meglitsch P. (1972). Invertebrates Zoology. 2º Ed. Oxford University Press. New York. Pag. 834.

Mount DW. (2004). Bioinformatics. 2º ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, U.S.A. pp. 692.

Naranjo FD. (2009). Análisis *in Silico* de la catepsina B de *Fasciola hepatica* como diana terapéutica. *Revista electrónica de Veterinaria*. (10): 2. ISSN: 1695-7504.

Plancarte AC. (2004). Purificación y caracterización bioquímica de la Glutathion S-Transferasa de *Taenia solium*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.

Powis G and Montfort W R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual review of Pharmacology and Toxicology*. 41: 261-274.

Predict Protein: <http://predictprotein.org/newwebsite/tools.html>

Rendón GJL, Arenal IP, Guevara FA, Uribe A, Plancarte A and Mendoza HG. (2004). Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular & Biochemical Parasitology*. 133: 61-69.

Romero CR. (1993). Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Panamericana. México, D.F Pag. 3.166

Ruppert EE y Bárnés RD. (1996). Zoología de los Invertebrados. 6° Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. México. Pp. 1114.

Salazar CM, Martín AJM, Ruíz EAD and Parra F. (2001). Heterologous expression and functional characterization of thioredoxin from *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 87: 390-395.

Salinas G, Selkirk ME, Chalar C, Maizels RM and Fernández C. (2004). Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. Review Trends in parasitology. 20(7): 340-345.

Salinas G, Bonilla M, Gladyshev VN, Protasio A, Denicola A, Novoselov S, Turanov AA and Izmendi D. (2008). Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent of selenium and glutathione. Journal Biol. Chem.283 (26): 17898- 907.

Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. Free radical & Medicine, 27: 916-921.

Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S and Gladyshev VN. (2001). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. Proc Nat. Acad. Sci. USA. 98: 3663- 3678.

Sun QA, Su D, Novoselov SV, Carlson BA, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2005). Reaction Mechanism and Regulation of Mammalian Thioredoxin/Glutathione Reductase. Biochemistry. 44, 14528- 14537.

Sun D and Gladyshev N. (2004). Alternative splicing involving the thioredoxin reductase module in mammals: a glutaredoxin- containing thioredoxin reductase. *Biochemistry*. 43: 12177- 12188.

Su Dan, Novoselov V, Sun Q, Moutafa M, Zhou Y, Oko R, Hatfield D and Gladyshev V. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin glutathione reductase. Journal of Biological Chemistry. 280 (28): 26491- 26498.

- Tay ZJ. (1998). Microbiología y Parasitología Médica. 2° ed. Méndez. México.
- Tiskow DG. (1996). Radicales libres en Biología y Medicina: una breve revisión. Gacetas de Ciencias Veterinarias. Lara, Ven. 2: 44-57.
- Upcroft JA, Brown DM and Upcroft P. (1996). A thioredoxin reductase class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. Molecular and Biochemical Parasitology. 83: 211-220.
- UNAM: <http://bq.unam.mx/~evazquez>. 2003.
- Urquhart G.M., Armour J., Duncan A.M., Jennings F.W. (2001). Parasitología Veterinaria. 2° edición. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 117-127.
- Voet D, Voet JG and Pratt CW. (1999). Fundamentals of Biochemistry. J Wiley & Sons.
- William DL et al. (2002). Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. International Journal for Parasitology. 32: 1285- 1292.
- Yu BP. (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 74: 139-162.

LA TIORREDOXINA-GLUTATIÓN REDUCTASA ES LA PRINCIPAL ISOFORMA DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA EXPRESADA EN EL ESTADIO ADULTO DE *Fasciola hepatica*.

Rendón, J.L., del Arenal, I.P., Miranda Leyva, M. y Pardo, J.P. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70-159, 04510, México, D.F. Tel: 56 23 21 69, Fax: 56 16 24 19, jrendón@bq.unam.mx

En los mamíferos, la Tiorredoxina reductasa se encuentra representada por tres isoformas: la variante citosólica (TrxR-1), la variante mitocondrial (TrxR-2) y una especie multifuncional denominada Tiorredoxina-glutación reductasa (TGR). A diferencia de la Tiorredoxina reductasa, la TGR exhibe en su extremo amino un dominio adicional que presenta una identidad significativa con la glutarredoxina; dicho dominio le confiere a la enzima las propiedades adicionales de reducir al disulfuro de glutación (GSSG) y de catalizar intercambios tiol-disulfuro. Cabe señalar que dicha enzima solo se expresa de manera significativa en el testículo maduro, donde parece estar involucrada en el proceso de maduración de la espermátida.

Por otra parte, en los representantes parásitos de los gusanos planos (Phylum: Platyhelminthes), la información disponible ha puesto de manifiesto que estos organismos carecen de una tiorredoxina reductasa convencional así como de la Glutación reductasa, de tal manera que la regeneración de las formas reducida de la tiorredoxina y el glutación la lleva a cabo la variante multifuncional TGR. Sin embargo, en contraste con los mamíferos, esta última enzima se expresa tanto en formas larvarias como en el estadio adulto del parásito. Una característica interesante de esta enzima es la de desplegar una cinética histerética a concentraciones elevadas del disulfuro de glutación. Dicha conducta ha sido observada para la TGR de *Echinococcus granulosus* y *Taenia crassiceps*. Recientemente se postuló la existencia de una Tiorredoxina reductasa convencional en el estadio adulto del tremátodo *F. hepatica*, que parece ser incapaz de reducir al GSSG. Dicha propuesta contradice la hipótesis de que en los representantes parásitos de los gusanos planos sólo existe una disulfuro reductasa multifuncional.

En el presente trabajo se reporta la purificación y conducta cinética de la TGR aislada a partir del estadio adulto del tremátodo *Fasciola hepatica*. A lo largo del proceso de purificación, la relación de actividades enzimáticas (GR/TR) se mantuvo esencialmente constante. Además, la comparación de la secuencia amino terminal de la preparación obtenida con aquella de la TGR de otros plathemintos parásitos reveló una identidad considerable. Los datos obtenidos apoyan la propuesta de que en estos organismos la TGR es la enzima responsable de reducir, tanto a la tiorredoxina como al disulfuro de glutación. Al igual que la reductasa de *E. granulosus* y *T. crassiceps*, la TGR de *F. hepatica* exhibe cinética histerética a concentraciones altas de GSSG, aspecto que puede explicar la ausencia aparente de actividad de glutación reductasa cuando se analizan las velocidades iniciales.





Hysteresis in thioredoxin-glutathione reductase (TGR) from the adult stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*

Alberto Guevara-Flores, Juan Pablo Pardo, Juan L. Rendón*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70–159, 04510, D.F. México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2010

Received in revised form 12 January 2011

Accepted 20 January 2011

Available online 2 February 2011

Keywords:

Hysteresis

Glutathione

Fasciola

Thioredoxin reductase

ABSTRACT

Thioredoxin-glutathione reductase (TGR) was purified from the adult stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. At 38 °C and pH 7.8, specific activity values were 10.2 U mg⁻¹ and 64.5 U mg⁻¹, with DTNB or GSSG as substrates, respectively. Under the same conditions, apparent *K*_m values were 46 ± 8 μM (DTNB) and 30 ± 5 μM (GSSG). The enzyme was also able to catalyze thiol/disulfide exchange reactions. A subunit *M*_r of 61,000 was obtained. Like the homologous enzyme from the tapeworms, a lag time was observed in the enzyme assays at moderate or high concentrations of the substrate GSSG. The hysteretic behavior was reverted in the presence of GSH and was notably dependent on pH, such that the magnitude of the lag time increased with the acidity of the medium. These results strongly suggest that a hysteretic kinetic is a common feature of TGR from any parasitic flatworm. A sequence comparison revealed the structural cysteine residues proposed to be in the origin of the peculiar kinetic behavior of TGR are absent from the *F. hepatica* enzyme. Based on these observations, the model proposed recently to explain the GSSG-dependent hysteretic kinetic of TGR, which assumes the covalent modification of specific cysteine residues through glutathionylation [Bonilla M. et al. (2008) J Biol Chem 283: 17898] needs to be reevaluated.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thioredoxin-glutathione reductase (TGR) is an interesting isoform of the high molecular mass thioredoxin reductase (TrxR) variant [1]. Both enzymes are NADPH-dependent disulfide reductases which are involved in the regeneration of the reduced state of thioredoxin, and are dependent on a selenocysteine residue which is essential for their reductase activity [2,3]. However, unlike TrxR, TGR shows significant reductase activity toward the disulfide form of glutathione (GSSG), and is also able to catalyze thiol-disulfide exchange reactions [3,4]. These additional activities of TGR are dependent on the presence of a glutaredoxin-like domain appended to the classical TrxR module [3,4]. The presence of TGR has been demonstrated in a variety of vertebrates [3,5], being particularly abundant in mature testis tissue, where is apparently involved in sperm maturation [6].

On the other hand, in the parasitic representatives of the flatworms, TGR is the only reductase responsible for the regeneration of the reduced states of both glutathione and thioredoxin [7]. In these organisms the absence of typical glutathione reductase and thioredoxin reductase has been demonstrated [8–10], leading to the proposal that TGR could be considered as a potential target for antihelminthic drugs [11,12]. To date, TGR has been characterized in

the larval stages of the tapeworms *Echinococcus granulosus* [9] and *Taenia crassiceps* [10], as well as the adult stage of the blood fluke *Schistosoma mansoni* [11]. It is worth to note that the enzyme of the tapeworms shows a hysteretic kinetic behavior featured by the display of a lag period when moderate or high concentrations of the substrate GSSG are used in the disulfide reductase activity assays [10,13]. As yet, no such behavior has been described in TGR from any representative of the flukes (Class Trematoda). On the other hand, a model intended to explain the hysteretic kinetic of TGR was recently proposed [13]. Such model put forward that the covalent modification by glutathionylation of two specific cysteine residues of the *E. granulosus* enzyme (cys 88 and cys 354) is responsible for the lag period, although no detail on the effect of such modification on the catalytic properties of the enzyme was given.

A search in the amino acid sequence data base revealed the above noted two cysteine residues are not conserved in TGR from the flukes *Fasciola hepatica* and *S. mansoni*. As predicted by the glutathionylation hypothesis, it is expected the hysteretic phenomenon is absent in the enzyme from the flukes. In order to corroborate such prediction, the present study was undertaken.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2'5' ADP-Sepharose 4B was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). 2-Hydroxyethyl disulfide (HED) was from

Abbreviations: TGR, thioredoxin-glutathione reductase; GR, glutathione reductase; TrxR, thioredoxin reductase.

* Corresponding author. Fax: +52 55 56162419.

E-mail address: jrendon@bq.unam.mx (J.L. Rendón).