



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA TIORREDOXINA
RECOMBINANTE (Trx) DE *TAENIA SOLIUM***

T E S I S:

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LBM. IVÁN GARCÍA LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Facultad de Medicina-UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. SALVADOR URIBE CARBAJAL
Instituto de Fisiología Celular-UNAM

Dr. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Facultad de Química-UNAM

MÉXICO, D.F., MAYO 2015



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. El trabajo de investigación fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN215714 y IN219711, así como por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el contrato CONACyT Núm. 176925. Durante la realización de esta investigación se contó con una beca otorgada por el CONACyT Núm. 343094.

Agradecimientos

En la realización de este trabajo han participado, de una u otra manera, muchas personas a las que, a pesar de que voy a ser breve, les estoy profundamente agradecido.

Agradezco a mi familia, que me acompaña en todo momento, mi mamá y mi hermana.

Evidentemente este trabajo no hubiera sido posible sin el especial apoyo del Dr. Abraham Landa Piedra, a quien le estoy profundamente agradecido.

También quiero agradecer a los integrantes de mi comité tutor, al Dr. José Pedraza Chaverri y al Dr. Salvador Uribe Carvajal.

A todo el Laboratorio de Biología Molecular de Taenia solium, a la Dra. Lucía Jiménez, a la M. en C. Alicia Ochoa, a Vera, Richie, Oscar y Aramis.

Agradezco el apoyo recibido de mis amigos en estos años: Angy, Paty, Isra y Blanca.

No olvido tampoco a mis amigos del Instituto de Biotecnología a Cynthia y en especial a Rodrigo Ibarra, a quien le agradezco mucho por ser un gran amigo y apoyarme en los malos momentos.

Agradezco a mi amiga Irma por todo el apoyo recibido durante mi estancia en el D.F.

Por último, aunque no por ello menos importante, agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP).

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU
LBM. Iván García López, Julio 2014

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--|------|
| Agradecimientos | 3 |
| Índice General | 4 |
| Lista de Abreviaturas | 6 |
| I. Resumen | 7 |
| II Marco teórico | 8 |
| 2.1 <i>Taenia solium</i> agente etiológico de teniasis y cisticercosis..... | 8 |
| 2.2 Morfología de huevo, larva y adulto de <i>T. solium</i> | 9 |
| 2.3 Manifestaciones clínicas..... | 12 |
| 2.4 Epidemiología..... | 13 |
| 2.5 Diagnóstico de teniasis..... | 14 |
| 2.6 Diagnóstico de cisticercosis..... | 15 |
| 2.7 Tratamiento..... | 16 |
| III Antecedentes | 18 |
| 3.1 Estrés oxidante..... | 18 |
| 3.2 Mecanismo enzimático antioxidante de parásitos helmintos..... | 20 |
| 3.3 Tiorredoxina (Trx)..... | 21 |
| IV Justificación | 23 |
| V Hipótesis | 24 |
| VI Objetivos | 25 |
| 6.1 Objetivo general..... | 25 |
| 6.2 Objetivos particulares..... | 25 |
| VII Plan de trabajo | 26 |
| VIII Material biológico | 27 |
| IX Metodología | 28 |
| 9.1 Obtención de la sonda..... | 28 |
| 9.2 Marcaje radiactivo..... | 29 |
| 9.3 Titulación, selección y aislamiento de clonas a partir de una biblioteca de ADN complementario (tamizaje) | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 9.4 Purificación de DNA a partir de fagos | 30 |
| 9.5 Ligación y transformación bacteriana..... | 31 |
| 9.6 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina..... | 32 |
| 9.7 Secuenciación de las clonas y su análisis..... | 32 |
| 9.8 Expresión de la TsTrx recombinante..... | 32 |
| 9.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE- SDS)..... | 33 |
| 9.10 Inmunoelectrotransferencia..... | 34 |
| 9.11 Ensayo de actividad de la TsTrx..... | 35 |
| 9.12 Análisis bioinformático..... | 35 |
| X Resultados..... | 36 |
| XI Discusión de resultados..... | 45 |
| XII Conclusiones..... | 47 |
| XIII Referencias bibliográficas..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| °C | Grados centígrados |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| µl | Micromolar |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ARNt | Ácido ribonucleico de transferencia |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| Da | Daltons |
| DTT | Ditiotreitol |
| ERO | Especie reactiva de oxígeno |
| ERN | Especie reactiva de nitrógeno |
| ER | Especies reactivas |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| Grx | Glutarredoxina |
| GST | Glutación transferasa |
| GR | Glutación reductasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Disulfuro de glutación |
| h | horas |
| kb | Kilobases |
| M | Molar |
| mL | Mililitro |
| min | Minuto |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| NO· | Óxido nítrico |
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanómetros |
| O ₂ ⁻ | Anión radical superóxido |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| OH· | Radical hidroxilo |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| PBS | Amortiguador de fosfatos y solución salina |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Transcripción reversa acoplada a PCR |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| STD | Sin traducir |
| 2-CysPrx | 2-Cys Peroxirredoxina típica |
| TrxR | Tiorredoxina reductasa |
| Trx-S ₂ | Tiorredoxina reducida |
| Trxs | Tiorredoxinas |
| TGR | Tiorredoxina glutación reductasa |
| TsTrx | Tiorredoxina de <i>Taenia solium</i> |

I. Resumen

Taenia solium es un helminto de gran importancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que, por un lado, su forma adulta ocasiona en el humano la teniasis, mientras que la ingestión de sus huevos produce la “cisticercosis” que con frecuencia es causa de muerte en el humano; en el cerdo ocasionará únicamente la cisticercosis. Esta enfermedad es endémica en la mayor parte de los países en vías de desarrollo.

Los parásitos helmintos, como *T. solium*, están expuestos no sólo a las especies oxidantes como subproducto de su metabolismo aerobio, sino a las que derivan de la respuesta inmune de sus hospederos. Debido a ello han desarrollado un alto grado de actividad enzimática antioxidante para poder sobrevivir en su hospedero por largo tiempo. Una de estas enzimas es la tiorredoxina (Trx) la cual con la tiorredoxina peroxidasa, la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) y el NADPH, forman el sistema redox en los helmintos, que los protege de las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrogeno y los hidroperóxidos lipídicos. La Trx se encuentra presente en todos los organismos y es una oxidorreductasa de 12 kDa que contiene un sitio activo ditiol-disulfuro (CGPC). Las dos cisteínas son la clave para la actividad catalítica de la Trx. Se han identificado múltiples sustratos *in vitro* para la Trx, incluyendo ribonucleasas, coriogonadotropinas, factores de coagulación, factores de transcripción, receptores de glucocorticoides e insulina. Se ha propuesto a la Trx como blanco para destruir a diversos parásitos.

En este trabajo se clonó el ADNc de la Trx de *Taenia solium* en el vector de expresión bacteriano pRSET el cual produce proteínas recombinantes unidas a 6 residuos de histidinas. La construcción se transformó en la cepa de expresión BL21 Codón Plus de *E. coli*. La proteína recombinante presentó una masa molecular de 12-kDa y se purificó por medio de una cromatografía de afinidad con níquel, obteniendo un rendimiento del 2.5 mg/250 ml de cultivo bacteriano.

Finalmente, se realizó un ensayo de actividad mediante la reducción a insulina el cual nos mostró que la Trx de *T. solium* recombinante presentó una actividad de oxido reductasa.

II. Marco teórico.

2.1 *Taenia solium* como agente etiológico de la teniasis y cisticercosis.

Tabla 1.- La clasificación taxonómica de *Taenia solium* es la siguiente [Brusca, C; Brusca, G. J., 2003]:

| | |
|----------------|------------------------|
| Dominio | <i>Eukarya</i> |
| Reino | <i>Animalia</i> |
| Filo | <i>Platyhelminthes</i> |
| Clase | <i>Cestoda</i> |
| Orden | <i>Cyclophyllidea</i> |
| Familia | <i>Taeniidae</i> |
| Género | <i>Taenia</i> |
| Especie | <i>Taenia solium</i> |

El ciclo de vida de este céstodo comprende la etapa de adulto, huevo y larva [Flisser, A., 2013] (Ver Fig. 1). Cuando el humano (único hospedero definitivo) ingiere carne de cerdo mal cocinada con cisticercos, el escólex evagina y se ancla a la mucosa del duodeno-yeyuno para desarrollarse hasta su forma adulta y producir la teniasis, que clínicamente se caracteriza por que el paciente presenta pocos síntomas.

Por otro lado, cuando el humano o el cerdo (hospederos accidental e intermediario, respectivamente) ingieren huevos de este parásito, ya sea por los alimentos o el agua contaminados, los embriones de los huevos se activarán por los jugos gástricos y la bilis. Por consiguiente, salen del intestino y se distribuyen en diferentes órganos de sus hospederos. En estos sitios se desarrollan hasta llegar a su “forma larvaria o cisticerco”, lo que causa la cisticercosis. La presencia de cisticercos en el cerebro recibe el nombre de neurocisticercosis [Tato, Z., *et al.*, 2008] que puede ocasionar la muerte. En este padecimiento, la naturaleza e intensidad de las reacciones inflamatorias son variables.

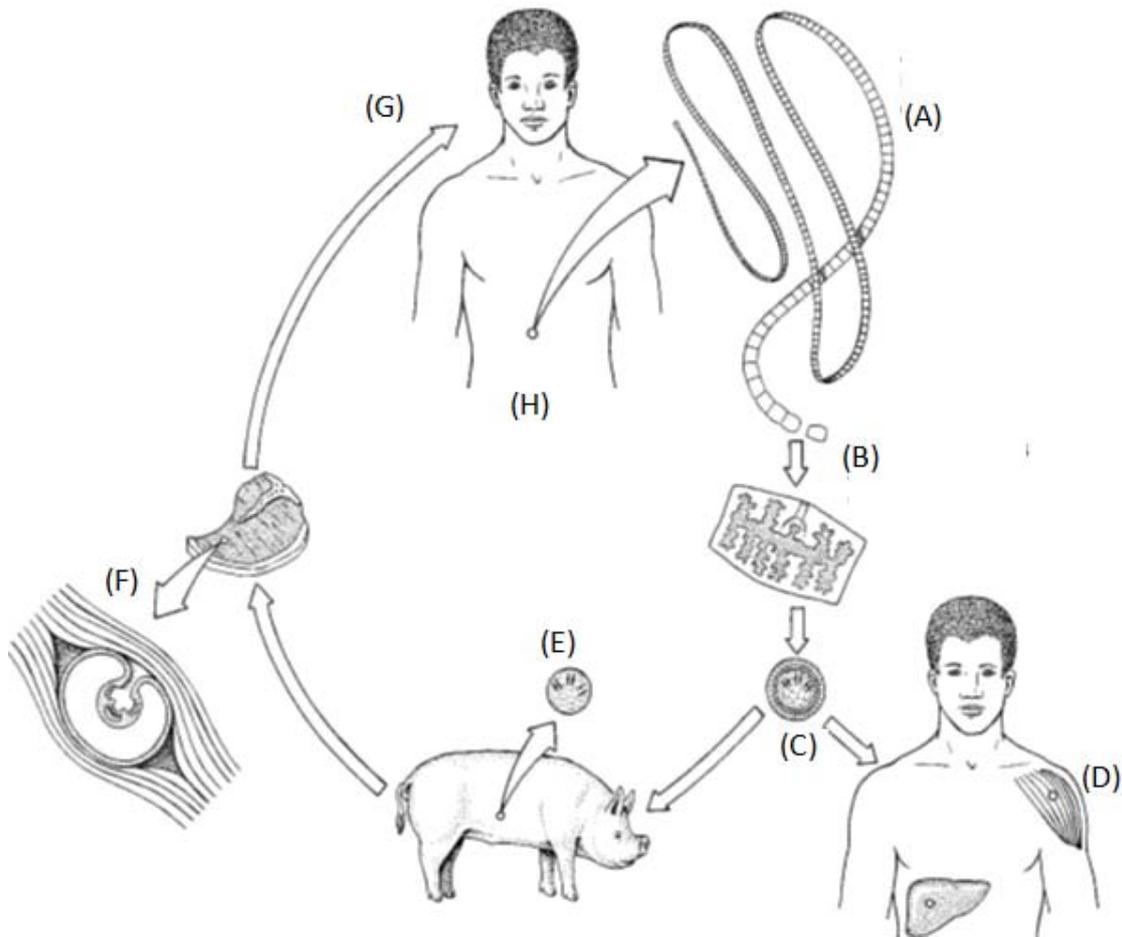


Fig. 1.- Ciclo biológico de *Taenia solium*. a) Los adultos de *Taenia solium* se localizan en el intestino delgado humano, b) Los proglótidos grávidos se desprenden del estróbilo, llegan al ano y salen junto con la materia fecal, c) Los huevos pueden ser consumidos por humanos y cerdos, d) Si son ingeridos por el humano, la oncósfera o embrión eclosiona y migra a distintos sitios del cuerpo (músculos, cerebro) produciendo lo que se conoce como cisticercosis humana, e) si son ingeridos por el cerdo, puede ocasionar cisticercosis porcina, f) la oncósfera se desarrolla a cisticerco en los músculos del cerdo, g) El ciclo de vida se completa cuando una persona come carne de cerdo que contiene cisticercos viables, h) Los cisticercos se desarrollarán a tenias adultas [Cortesía de William Ober y Claire Garrison].

2.2 Morfología del huevo, la larva y el adulto de *Taenia solium*

Los adultos de *Taenia solium* miden en promedio 1 a 5 metros de longitud (Flisser, A., *et al.* 2013). Anatómicamente en su estado adulto, se conocen tres estructuras bien diferenciadas: un escólex, un cuello y el estróbilo.

En el extremo anterior se encuentra el escólex, que tiene un diámetro de 1 mm, consta de 4 ventosas y un rostelo formado por una doble hilera de 22 a 32 ganchos que le ayudan a fijarse al duodeno. El cuello se encuentra posterior al escólex, es delgado, no segmentado, mide 5 a 10 mm de longitud y produce las unidades de reproducción

auto fecundantes independientes conocidas como proglótidos, que en su conjunto forman el estróbilo.

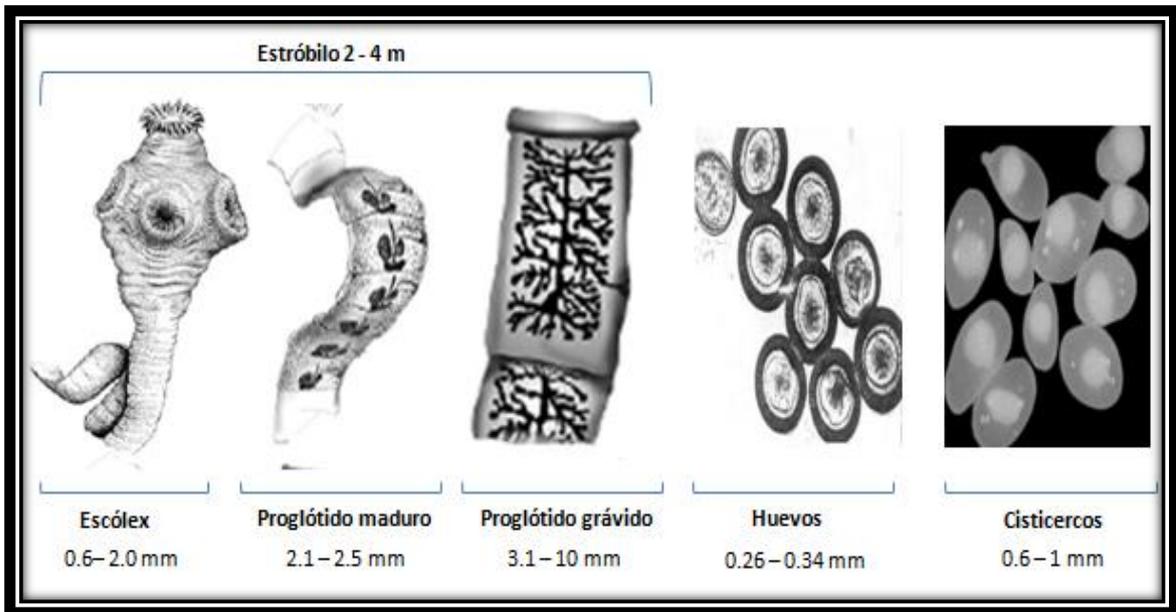


Fig. 2.- Características morfológicas de los estadios de *Taenia solium* y su rango de longitud aproximada. (Figura modificada de la Fig. 1 de Flisser *et al.*, 2004).

El estróbilo está constituido por aproximadamente 800 a 1000 proglótidos inmaduros, maduros y grávidos. Los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros y aún no han desarrollado órganos sexuales; conforme se alejan, son cada vez más grandes y por consiguiente su grado de maduración aumenta (Ver Fig. 2). Cuando ya tienen órganos de reproducción se llaman proglótidos maduros que pueden medir entre 2.1 a 2.5 mm de longitud y 2.8 a 3.5 mm de ancho y los cuales tienen tres lóbulos ováricos. Los embriones, que se van formando después de la fecundación, están cubiertos por bloques de queratina que forman el embrióforo y se encuentran en los proglótidos más distales, denominados grávidos, pueden medir entre 3.1 a 10 mm de longitud y 3.8 a 8.7 mm de ancho. A diferencia que *T. saginata*, estos proglótidos presentan menos de 13 ramas uterinas y forman sacos llenos de huevos.

Los proglótidos grávidos son liberados junto con la materia fecal entre los 3 a 5 meses después de la infección y cada uno contiene alrededor de 50,000 a 60,000 huevos [Flisser, A., 2013].

Los cisticercos miden 0.5 a 1.0 cm de diámetro y se observan a simple vista como una vesícula ovoide llena de líquido blanquecino con un escólex invaginado (Ver figura 3). La vesícula contiene diferentes tipos celulares rodeados de tejido conectivo y corpúsculos calcáreos [Tato, Z., et al. 2008].

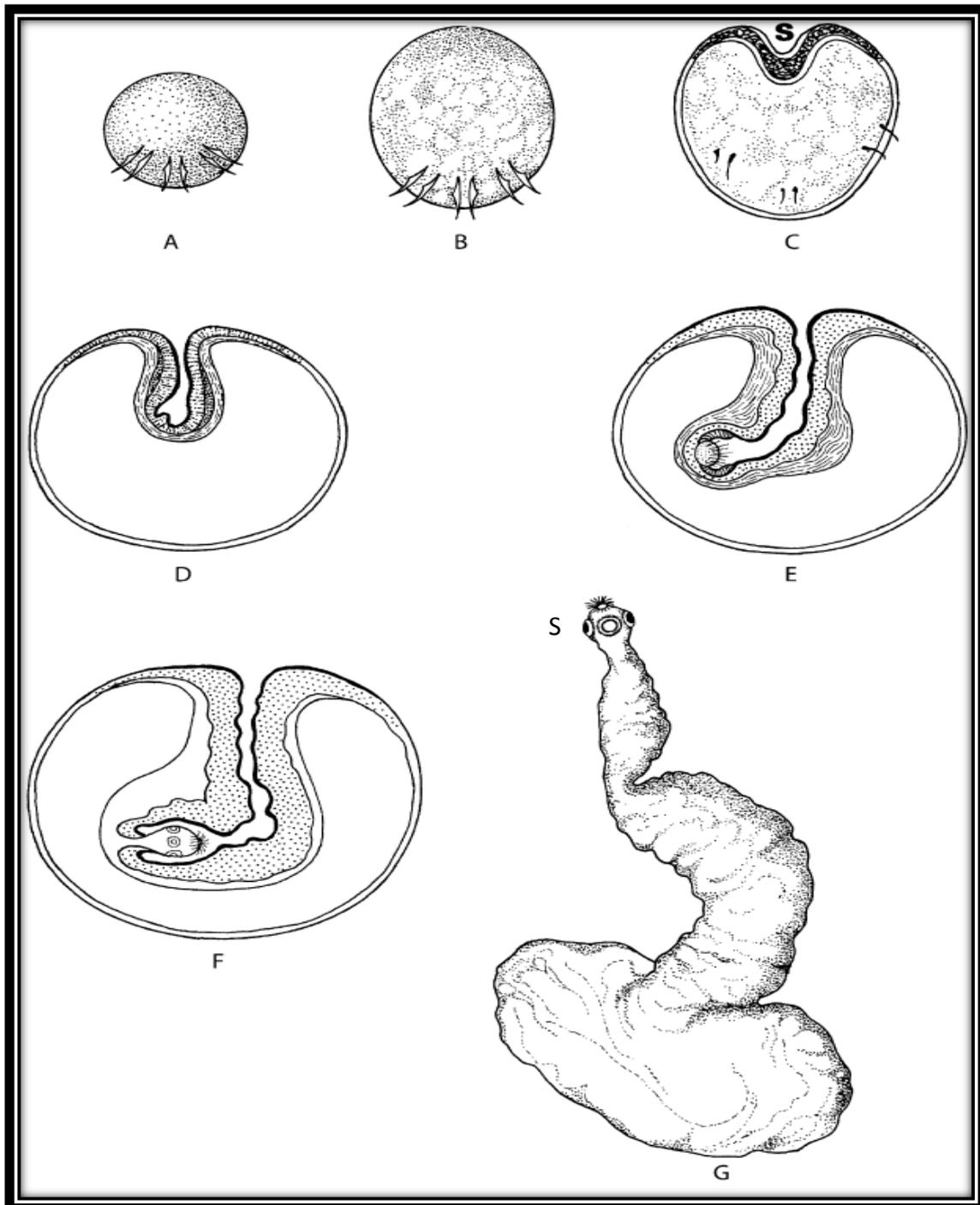


Fig. 3.-Representación esquemática del desarrollo de una oncosfera a cisticerco (A-F) y un adulto de *Taenia solium* (G); (S) escólex. (Tomado de Enciclopedia de Parasitología 3ra. Ed, 2008).

Los huevos son esféricos y tienen una apariencia radial (Ver Fig. 4), tienen un intervalo de tamaño que va de entre 47 a 77 μm de diámetro. Poseen una capa vitelina externa, que casi siempre se pierde, que recubre a una capa gruesa denominada embrióforo, formada por bloques de queratina, la cual aparece estriada al microscopio de luz, dentro de ella se encuentra un embrión hexacanto (seis ganchos) llamado oncósfera [Tato, Z., *et al.*, 2008].



Fig.4.- Examen directo en fresco de materia fecal que muestra un huevo de *Taenia* spp. (40x) [Cortesía de David Oettinger]

2.3. Manifestaciones clínicas:

La teniasis intestinal por lo general es asintomática. La presencia de la tenia en el intestino produce ligero dolor abdominal con diarrea o estreñimiento, sensación de hambre (bulimia) y prurito anal. Se ha documentado también aumento del apetito con pérdida de peso, debilidad y eosinofilia. Es importante señalar que un individuo puede arrojar parte del estróbilo junto con las heces y pensar que ya se desparasitó; sin embargo, si el escólex queda adherido a la mucosa intestinal volverá a desarrollarse y se repetirá la sintomatología [Tato Z., *et al.*, 2008].

La neurocisticercosis es la enfermedad más grave producida por *T. solium*. Su período para causar síntomas usualmente es largo, por lo regular de cuatro a cinco años. Los síntomas varían en función del sitio donde se establezcan los cisticercos, el estado y número de parásitos y la reacción inmunitaria. La epilepsia es la manifestación clínica más común, aunque también se observan alteraciones motoras, sensoriales y de la

función mental. En áreas endémicas se ha comunicado que más de 50% de casos de epilepsia tardía se deben a NC. La presencia de más de un cisticerco en diferentes localizaciones del cerebro (Ver Fig.5) puede producir diversas expresiones clínicas en un solo individuo, como parestesias, anestesia localizada, síntomas visuales y auditivos, afasia y amnesia. La gravedad del cuadro clínico depende de la intensidad de la inflamación alrededor de la lesión [Tato Z., *et al.*, 2008].

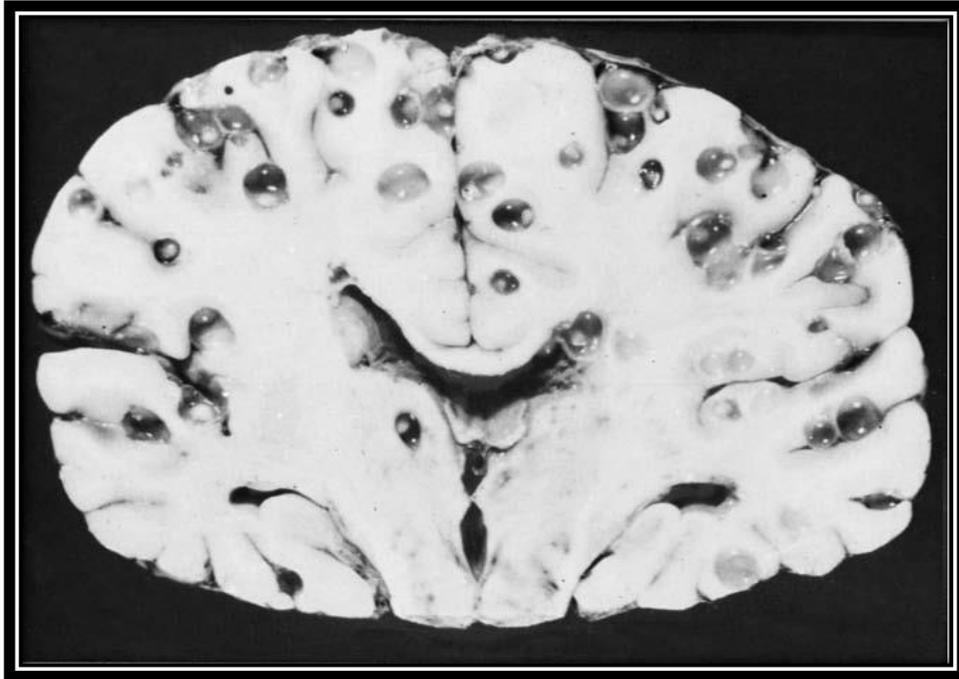


Fig. 5.- Cerebro humano con numerosos cisticercos de *T. solium* [Flisser, A., 1988].

2.4 Epidemiología

Los principales factores de riesgo para adquirir teniasis o cisticercosis van desde malos hábitos higiénicos, vivienda en regiones con infraestructura inadecuada, hasta regulación sanitaria deficiente.

Taenia solium es endémica de Latinoamérica, Asia (incluyendo la República Popular China), la India, el este de Europa y la mayor parte de África. Se sabe que la teniasis causa baja morbilidad por sí misma, sin embargo representa la única fuente de contagio para que los humanos y cerdos adquieran cisticercosis. En cambio la cisticercosis está asociada con una alta tasa de morbi-mortalidad, es considerada como la principal causa de trastornos convulsivos en todo el mundo (neurocisticercosis) lo que ocasiona grandes pérdidas económicas [WHO, 2011].

2.5 Diagnóstico de teniasis

La identificación de especies de *Taenia* que infectan a los humanos generalmente se basa en una combinación de métodos de diagnóstico microscópico, inmunológico y molecular (Wilkins, *et al.*, 2002; Dorny, *et al.*, 2005; Ito, *et al.*, 2003; McManus, 2005).

2.5.1 Diagnóstico microscópico: El hallazgo de huevos de *Taenia* en los exámenes coproparasitológicos (CPS) da el diagnóstico de teniasis. Uno de estos métodos de diagnóstico directo es el de Graham (también utilizado para el diagnóstico de la enterobiasis) y es útil para la búsqueda de huevos de tenia en los márgenes del ano [Tay, Z., 2000.]. Los huevos son prácticamente indistinguibles entre las especies de la familia *Taeniidae*, por lo que se reportan como huevos de *Taenia* spp.

El tamizado de heces es otra técnica recomendable para diagnosticar teniasis, pues se puede saber si el paciente ha arrojado a los gusanos adultos completos, ya que en general no sale completo junto con las heces y consiste en coleccionar las heces del paciente durante 24 a 48 horas y llevarlas al laboratorio, donde se colocan sobre tres tamices de tamaño de malla distinta y se lava bajo el chorro del agua en condiciones higiénicas. Con un abatelenguas se lava la tenia y busca el escólex. El estróbilo, y sobre todo los proglótidos grávidos se pueden aclarar bajo el chorro del agua o mediante tratamiento con KOH al 10% hasta que se observen estructuras internas, así se podrán contar las ramas uterinas para diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata*. Si el escólex queda adherido a la mucosa intestinal volverá a regenerarse el estróbilo y al cabo de unos meses se volverá a tener la teniasis [Tato, Z., *et al.* 2008].

2.5.2. Detección de antígenos: Se han desarrollado técnicas de detección en la heces de antígenos de *Taenia* mediante el uso de anticuerpos policlonales [Allan, J. C., *et al.*, 1990] o monoclonales [Montenegro, T.C, *et al.*, 1996] obteniéndose buena sensibilidad, pero no permiten distinguir entre especies del género *Taenia*. Además, se han desarrollado técnicas para la detección de anticuerpos en sueros de individuos con teniasis. Sin embargo la mayoría tienen baja sensibilidad y especificidad, aparentemente la excepción es un ensayo que usa un antígeno de excreción /

secreción de *T. solium* mediante la inmunoelectrotransferencia, el cual tiene 95% de sensibilidad y especificidad [Wilkins, P. P., *et al.* 1999].

2.5.3. Diagnóstico mediante ADN:

Para la diferenciación de *T. solium* y *T. saginata* usando técnicas de biología molecular se ha descrito el uso de sondas y variantes de PCR con iniciadores específicos de cada especie. Un ejemplo es la sonda HDP2 [Harrison, L. S. J., *et al.*, 1990] con la que se ha diseñado una PCR múltiple que posibilita el diagnóstico diferencial inter-especie [González, L. M., *et al.*, 2000]. Además, se han realizado técnicas de PCR-RFLP basadas en la amplificación del gen 5,8S ribosomal y los espaciadores intergénicos que lo flanquean (ITS1 e ITS2), así como con la secuencia 12S ribosomal del ADN mitocondrial, y la secuencia HDP2, seguida por digestión con enzimas de restricción [Mayta, H., *et al.* 2000; Rodríguez, R., *et al.*, 2002; Nunes, C., *et al.*, 2005]. Sin embargo estas técnicas requieren ADN puro del parásito, con el riesgo de permitir una amplificación cruzada con cualquier ADN eucariótico. No obstante, se ha reportado un método de PCR anidado con un 97% de sensibilidad y 100% de especificidad, que ha permitido el diagnóstico de teniasis directamente de las muestras fecales [Mayta, H., *et al.*, 2008]. La limitante de todos estos métodos moleculares es que son poco accesibles debido a su alto costo.

2.6 Diagnóstico de cisticercosis

El diagnóstico de la cisticercosis se basa en los hallazgos clínicos epidemiológicos y/o serológicos. Los estudios de resonancia magnética y las tomografías axiales computarizadas son las herramientas más sensibles y específicas [Sloan, L., *et al.* 1995], pero no son muy utilizadas debido a su alto costo (Ver Fig. 6).

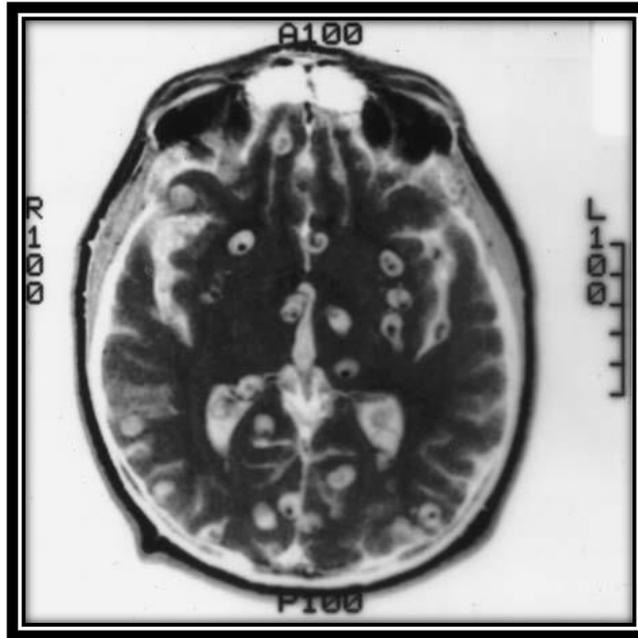


Fig. 6.- Tomografía axial computarizada (TAC) de un paciente con múltiples cisticercos de *T. solium* en el cerebro [Cortesía Herman Zaiman].

Actualmente el único método funcional para el diagnóstico de la cisticercosis humana accesible a un laboratorio convencional, es la detección serológica de anticuerpos en contra del cisticerco, en especial la inmunoelectrotransferencia que utiliza como antígenos las glicoproteínas descritas por Tsang, cuyo ensayo tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% [Tsang, V., *et al*, 1989., Hancock, K., *et al*, 2004].

2.7 Tratamiento

2.7.1. Teniasis

Inicialmente se usaba como fármaco de elección la niclosamida, que actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del huésped. No tiene acción contra los huevos ni contra los cisticercos y se ha sugerido que puede exponer al paciente al riesgo de contraer cisticercosis, pues destruye los proglótidos y libera los huevos dentro de la luz intestinal, por lo que la administración de un laxante una o dos horas después del tratamiento es obligada, así como la disposición adecuada de excretas. Debido a estos inconvenientes, la droga entró en desuso y ya no existe en el mercado mexicano (Sarti, E., 1997). El tratamiento que actualmente se usa según la **NOM-021-SSA2-1994** es el albendazol, el cual actúa uniéndose a un sitio específico en la β -tubulina inhibiendo su polimerización y con ello

la formación de los microtúbulos citoplásmicos, el resultado final es la imposibilidad para captar glucosa y con ello se da la muerte del parásito [Horton, J., 2000].

2.7.2. Cisticercosis

El tratamiento puede ser sintomático, enfocado en el control de crisis convulsivas (antiepilépticos), cefalea (analgésicos), hipertensión intracraneal (esteroides y diuréticos) y alteraciones de la conducta (psicodrogas). El tratamiento quirúrgico varía según la localización y las características anatomo-patológicas de la cisticercosis, así como el número y tamaño de los parásitos. El tratamiento farmacológico está basado en un diagnóstico confiable y preciso de todos los aspectos de la enfermedad.

Los dos fármacos de elección son el prazicuantel y el albendazol, el primero incrementa la permeabilidad de las membranas de las células musculares para el calcio, causando contractura y parálisis espástica del parásito. Sin embargo aún se desconoce con exactitud el mecanismo de acción de este fármaco. Por otro lado el albendazol, inhibe la formación del citoesqueleto, como ya se mencionó anteriormente.

Otros fármacos empleados son el mebendazol, el metrifonato y el flubendazol [Fleury, A., *et al*, 2006].

III. Antecedentes

3.1 Estrés oxidante

El oxígeno es un sustrato indispensable para el metabolismo, sin embargo durante la respiración aerobia se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) como un subproducto inevitable de este proceso biológico. Las ERO son producidas por células de mamífero y median diversas respuestas fisiológicas, incluyendo defensa, proliferación y diferenciación celular [Lee, S., *et al*, 2013]. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre las ERO y los antioxidantes, con tendencia inclinada hacia las primeras, éstas pueden causar daño al ADN, las proteínas y los lípidos produciendo lo que se denomina como estrés oxidante [Lee, S., *et al*, 2013].

Se han considerado que los platelmintos parásitos son un excelente modelo para estudiar las vías involucradas en la homeostasis redox, debido a que están expuestos no sólo a las especies oxidantes endógenas generadas como resultado de su propio metabolismo, sino también a las que derivan de la respuesta inmune de sus hospederos [Williams, *et al*. 2012].

Durante la respuesta inmune activada por los parásitos, los leucocitos reclutados y los macrófagos residentes pueden liberar grandes cantidades de radicales de óxido nítrico (NO \cdot) y del anión radical superóxido (O $_2^{\cdot-}$). Estas especies reaccionan entre sí dando lugar al peroxinitrito, un oxidante altamente reactivo, así como especies de nitración (ERN) que genera estrés nitrosativo. La dismutación (espontánea o catalizada por superóxido dismutasa [SOD]) del radical superóxido produce peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$). El H $_2$ O $_2$ puede reaccionar con iones metálicos (Reacción Fenton) para generar radicales hidroxilo (OH \cdot). Colectivamente tanto las ERO como los ERN alteran la función de proteínas y pueden iniciar la peroxidación de lípidos. De tal manera estos procesos pueden conducir a la muerte del parásito [Williams, *et al*, 2012].

Los organismos tienen diversos mecanismos para mantener el equilibrio redox, que pueden ser de dos tipos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los parásitos que se caracterizan por un alto grado de actividad enzimática antioxidante pueden sobrevivir en el cuerpo del hospedero por un periodo de tiempo más prolongado. Por tanto sus sistemas antioxidantes podrían ser utilizados como un componente de

defensa contra las ERO generadas por el hospedero [Callahan, H. L., *et al.* 1988; Henkle-Dührsen, K., *et al.* 2001; Dzik, J. M., 2006]. Generalmente los helmintos parásitos están equipados con diferentes tipos de enzimas antioxidantes, que son el resultado de una necesidad adaptativa para varios tipos de estrés tal como el causado por el metabolismo aeróbico de sus hospederos (Oliveira, P. L., 2002). La producción de enzimas antioxidantes, se puede considerar como un mecanismo de evasión de la repuesta inmune usado por los helmintos parásitos para subsistir por un largo periodo de tiempo dentro de su hospedero (Chiumiento, L., *et al.*, 2009), en función de la cantidad de las enzimas antioxidantes presentes [Czeczot, H., 2012]. Sin embargo, esto depende de la naturaleza de cada parásito. Por ejemplo, en un estudio realizado con los nemátodos intestinales de roedores, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Heligmosomoides polygyrus* (anteriormente conocido como *Nematospiroides dubius*) se demostró que el primero es expulsado del intestino del hospedero entre 10 a 12 días después de la infección, a diferencia del segundo que persistió por meses. Esta diferencia en la susceptibilidad de los parásitos a la respuesta inmune de su hospedero se debió al hecho de que *H. polygyrus* produce el doble de SOD, tres veces más de catalasa y cuatro veces más de glutatión reductasa (GR) con respecto a *N. brasiliensis* (Smith, N. C., *et al.*, 1986).

La coexistencia en una relación parásito – hospedero pudiera lograrse exitosamente ya sea cuando el parásito interfiere con la respuesta inmune de su hospedero al modular la actividad de las células efectoras o al defenderse contra las ERO (Chiumiento, L., *et al.*, 2009). Actualmente se ha descrito que *T. solium* posee tres tipos de enzimas del metabolismo antioxidante: SOD, la 2-Cys Peroxirredoxina típica (2-Cys Prx) y dos glutatión transferasas una de 25.5 kDa y otra de 26.5 kDa (GSTs) [Vaca, P., *et al.*, 2008.]. Sin embargo, se desconoce si *T. solium* tiene otras vías enzimáticas antioxidantes para contender con el estrés oxidante ante la respuesta inmune de su hospedero.

3.2 Mecanismo enzimático antioxidante de los parásitos helmintos

Para soportar el estrés oxidante, los parásitos dependen de enzimas antioxidantes, que revelan similitudes y diferencias notables con las de su hospedero e incluso con enzimas de platelmintos de vida libre [Otero, *et al.* 2010].

Los platelmintos parásitos, a diferencia de sus huéspedes mamíferos, carecen de las enzimas GR y tioredoxina reductasa (TrxR) convencionales. Sin embargo poseen una sola seleno-enzima que fusiona ambas funciones enzimáticas para la homeostasis redox, denominada tioredoxina glutatión reductasa (TGR). De esta manera provee equivalentes reductores tanto a la vía de glutatión (GSH/GSSG) como a la de tioredoxina [Otero, *et al.* 2010] (Ver Fig. 7). Sobre la base de esta divergencia, la TGR ha sido propuesta como un posible blanco terapéutico antiparasitario de tremátodos y céstodos [Cioli D, *et al.* 2008; Ross F, *et al.* 2012; Williams D, *et al.* 2012; Song L, *et al.* 2012]. Mediante estudios bioquímicos e *in silico*, se sabe que *T. solium* tiene un sistema redox tiol dependiente de la TGR, al igual que *Echinococcus granulosus*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma* spp y *Taenia crassiceps* [Otero L, *et al.* 2010].

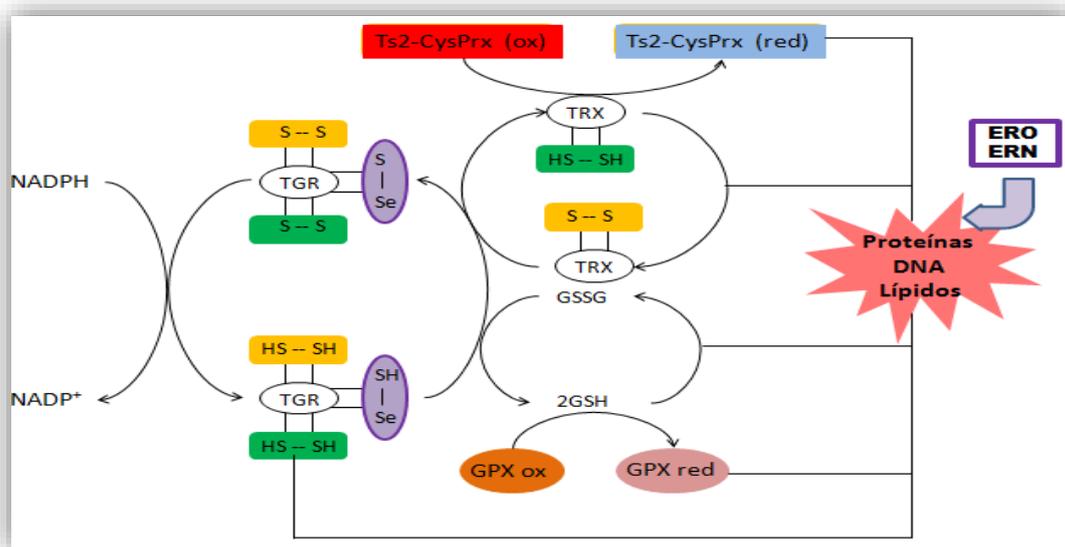


Fig. 7.- Mecanismo antioxidante enzimático de platelmintos parásitos. Los electrones del NADPH son transferidos al sitio redox de la tioredoxina glutatión reductasa (TGR) que provee los equivalentes reductores necesarios para reducir tanto al disulfuro de glutatión (GSSG) como a la tioredoxina oxidada. A su vez, la Trx y el GSH transfieren sus electrones a sus objetivos moleculares corriente abajo, por ejemplo, a la 2-Cys Peroxirredoxina (2-CysPrx típica) y a la glutatión peroxidasa (GPx), respectivamente. El objetivo de este sistema es mantener el balance redox en platelmintos parásitos. (Modificado de la Fig. 1 de Cioli, D., *et al.*, 2008).

3.3 Tiorredoxina (Trx)

La Trx es una enzima oxidoreductasa que se describió por primera vez en 1964 en *E. coli*. Se aisló como una pequeña proteína ditiol con una masa molecular de 12,000 Da [Holmgren, A., 1981]. Las funciones biológicas de las tiorredoxinas en diferentes tipos de organismos han evolucionado de una reacción a una amplia variedad de funciones especializadas [Arnér, E., Holmgren, A., 2000]. Entre éstas destaca su participación en sistemas donadores de hidrógeno para algunas enzimas reductoras (por ejemplo, la ribonucleótido reductasa) [Thelander, L., *et al.* 1979], el ensamblaje de colífagos tales como f1 y M13, la replicación de DNA del fago T7, la actividad de enzimas fotosintéticas en cloroplastos, algunas enzimas y factores de la transcripción en eucariontes [Holmgren, 1989., Jacquot, *et al.* 1994; Holmgren, 1995] y también se sugiere que actúa como una señal para el crecimiento de las células cancerosas [Fujji, *et al.* 1991; Gasdaska, *et al.* 1995]. En algunos estudios se indica el papel de la Trx en la defensa contra el estrés oxidante o en el control de la apoptosis [Arnér, E., Holmgren, A., 2000], así como la protección general de la agregación de proteínas citosólicas o su inactivación mediante la formación oxidante de enlaces disulfuro intra o intermoleculares [Arnér, E., Holmgren, A., 2000]. La Trx cataliza las reacciones de intercambio tiol – disulfuro ($\text{SH}_2 - \text{S}_2$) en una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular que involucra la transferencia de electrones de la Trx al sustrato proteico. La Trx utiliza sus cisteínas en la posición 32 y 35 para esta reacción (numeración de aminoácidos de acuerdo con la enzima de *E. coli* [Lee S, *et al.* 2013] (Ver figura 8).

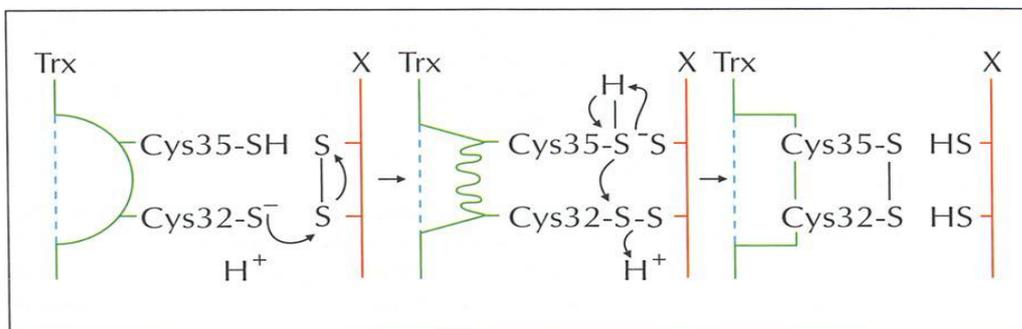


Fig. 8.- Mecanismo de reducción del disulfuro en algunas proteínas catalizado con las tiorredoxinas. La Trx se une a una proteína blanco a través de una superficie hidrofóbica. Se produce un ataque nucleofílico por el tiolato del residuo Cys32, lo que resulta en la formación de un enlace disulfuro mixto transitorio, que es seguido por un ataque nucleofílico del residuo de Cys35 desprotonada generando Trx-S₂ y la proteína reducida [Holmgren, A., 1995].

La secuenciación de la proteína Trx bacteriana reveló su sitio activo Cys-Gly-Pro-Cys (CGPC), un motivo conservado en todos los reinos desde arqueas hasta mamíferos [Holmgren A. 1968], también conocido como “Motivo Trx”. La primera descripción de la estructura tridimensional fue la Trx bacteriana (108 aminoácidos) y fue publicada en 1975 [Holmgren A, *et. al.* 1975] (Ver Fig. 9). Se ha resuelto la estructura cristalográfica de muchas Trx tanto en un estado reducido como oxidado [Conrad, M., *et al.*, 2004]. El motivo estructural de las Trx son cinco cadenas beta plegadas al centro, rodeadas de cuatro hélices alfa. Este motivo TRX presente en la Trx también se encuentra en otras proteínas que pertenecen a la familia de las Trxs como, las glutarredoxinas (Grx), las proteínas disulfuro isomerasas, todas involucradas en reacciones de intercambio tiol-disulfuro.

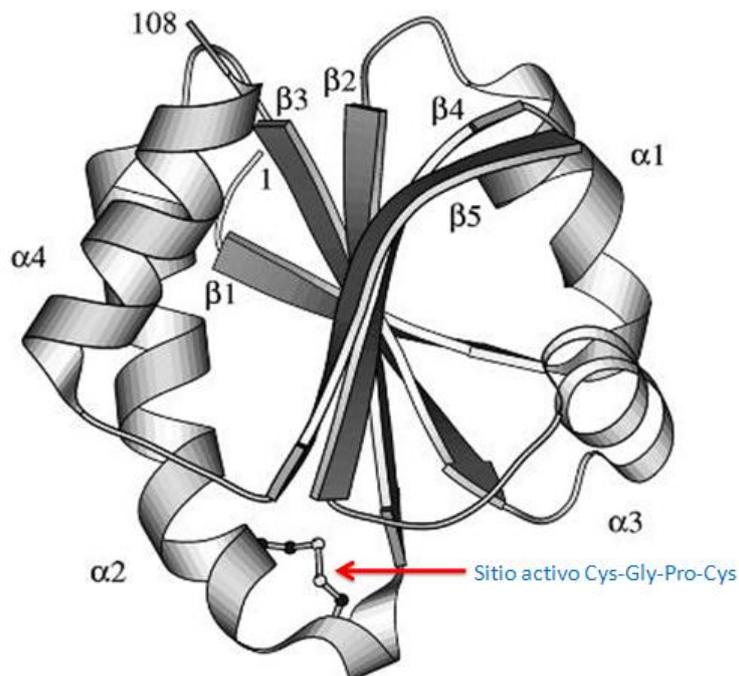


Fig. 9.- Representación esquemática de la estructura tridimensional de la Trx de *E. coli*. Presenta una estructura de cinco hojas plegadas β centrales con cuatro α hélices alrededor y el sitio activo CGPC (Holmgren, et al. 1975).

IV. JUSTIFICACIÓN

Como reportó la OMS en el 2012, los céstodos parásitos causan enfermedades que afectan tanto a los animales, como a los humanos resultando en graves problemas económicos y de salud, particularmente en países en vías de desarrollo. Un ejemplo de estas enfermedades es la neurocisticercosis, una enfermedad neurológica muy seria causada por el cisticerco de *Taenia solium*. Actualmente no existen vacunas comerciales para prevenir esta enfermedad parasitaria y el tratamiento en México (según la NOM-021-SSA2-1994) se basa en dos fármacos, albendazol y prazicuantel, a los cuales se han empezado a reportar casos de resistencia al igual que en diversas especies de tremátodos, tales como *S. mansoni* y *F. hepatica*.

La TGR y la Trx son enzimas que tienen una estrecha relación, puesto que interaccionan dentro del sistema antioxidante más importante descrito para los helmintos parásitos. En los últimos años, ha resultado muy atractivo su estudio, debido a que se ha demostrado que por ejemplo al inhibir a la TGR o al silenciar su expresión, con ARN de interferencia, resulta en la muerte inevitable del estado larvario de diversos céstodos, tales como *T. crassiceps* y *E. granulosus*. Sin embargo, en el caso de *T. solium* aún no se ha comprendido del todo como funciona este sistema antioxidante y por lo tanto es imprescindible la caracterización bioquímica de sus elementos enzimáticos, tal como la Trx, lo que podría permitir el desarrollo de nuevas vacunas y fármacos.

V. HIPÓTESIS

Si *Taenia solium* se enfrenta a las especies reactivas del oxígeno producidas por la respuesta inmune de sus hospederos y por ello deberá poseer genes que codifiquen para las enzimas antioxidantes, como la tiorredoxina.

VI. OBJETIVOS

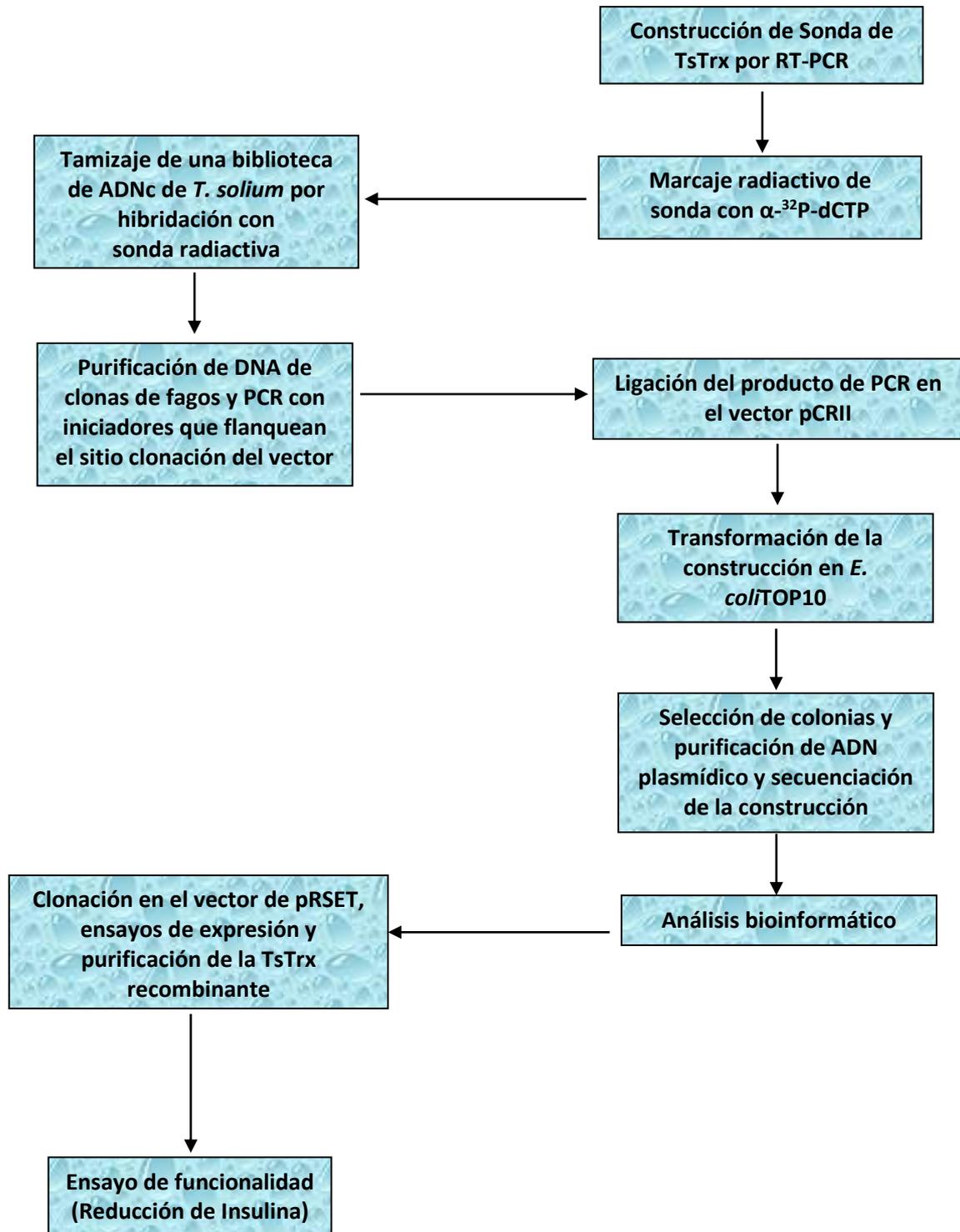
6.1 Objetivo general

Caracterizar parcialmente a una tiorredoxina recombinante de *Taenia solium* (TsTrx).

6.2 Objetivos particulares

- 1) Aislar y caracterizar una clona del ADN complementario para la TsTrx.
- 2) Producir y purificar la TsTrx recombinante.
- 3) Caracterizar funcionalmente la enzima.

VII. PLAN DE TRABAJO



VIII. MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas y plásmidos usados fueron:

| Cepa | Referencia |
|---|------------|
| <i>Escherichia coli</i> One Shot® TOP10 [F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> λ-] | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> BL21 Codon Plus (DE3) RIPL F ⁻ <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) | Invitrogen |

| Plásmido | Referencia |
|--|--------------|
| pCRII (plásmido de 3.97kb, contiene al promotor T7, <i>Amp^R</i> , <i>Km^R</i> y sitios para MF13 y MR13) | Invitrogen |
| pRSET (plásmido de 2.9kb, contiene al promotor T7, <i>Amp^R</i> , produce proteínas con 6 histidinas en la región N-terminal) | Invitrogen |
| pSTrx (plásmido de 4.13 kb, conteniendo la región codificante para <i>Trx</i> , promotor T7, <i>Amp^R</i>) | Este estudio |

IX. METODOLOGÍA

9.1 Obtención de sonda

Para generar la sonda se realizó una transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando los oligonucleótidos TsTRX-5' y TsTRX-3' (Diseñados a partir de los sitios TWCGPCK y MPTLFVFK, secuencias altamente conservadas en las Trx ya reportadas de *E. coli*, *H. sapiens*, *M. musculus* y de los helmintos *S. mansoni* y *E. granulosus*) y 1µg de ADNc de la larva de *Taenia solium* como templado. El estuche utilizado para la reacción fue el Superscript One Step RT-PCR (Invitrogen). Se siguieron las instrucciones del proveedor. Se mezclaron los siguientes reactivos en reacciones con un volumen final de 25 µl: 2.5 µl de 10X PCR Buffer, 2.5 µl de Mezcla dNTP 2 mM, 1.25 µl de MgCl₂ 20X, 1.0 µl de TsTRX5' 10 µM, 1.0 µl de TsTRX3' 10 µM, 0.5 µl de DNA templado (1µg), 0.25 µl de *Taq DNA* polymerase recombinante (5 U/µl), 14.75 µl de agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron las muestras en un termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystems), usando las siguientes condiciones: un ciclo de 50 °C - 30 min, 30 ciclos de 94°C - 1 min, 54 °C - 30 seg, 72°C - 1min y un ciclo de extensión final de 72 °C -15 min. La reacción de RT-PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 100V durante 1 hora utilizando una cámara de electroforesis de la casa Life Technologies. El fragmento esperado (153 pb) fue cortado del gel y disuelto en una solución NaI 6M a 37 °C por 15 min. A la mezcla se le agregaron 2 µl de perlas de vidrio (GeneClean), se agitó e incubó a 4 °C por 2 horas. Inmediatamente después se centrifugó a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 30 seg y se desechó el sobrenadante. Se lavaron las perlas una vez con 500 µl de NaI y se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 seg. Se adicionó una solución de etanol al 50% en Tris-HCl y se centrifugó como antes y este paso se repitió por 2 veces más. Finalmente después de cosechar el sobrenadante, las perlas se secaron a 37°C y el ADN se extrajo resuspendiendo las perlas con 25 µl del amortiguador Tris-EDTA (TE) a 37°C por 30 min. El fragmento de ADN obtenido fue amplificado por PCR y ligado con el vector pCRII. A continuación se transformaron bacterias de *E. coli* de la cepa TOP10. Se secuenciaron las clonas que contuvieron el fragmento, en un secuenciador automático

SEQ4x4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech. Los análisis de la secuencia nucleotídica se realizaron con el programa PC/GENE.

9.2 Marcaje Radioactivo

El fragmento positivo fue marcado radiactivamente con el estuche Random Prime Labelling System de la casa GE Healthcare. Para esta metodología se usaron 25 ng del fragmento disuelto en 45 μ l del amortiguador TE. Se calentó a 100°C por 5 min e inmediatamente se enfrió en hielo por 5 min. La mezcla se colocó en el tubo de reacción del estuche para marcaje RedPrime, se adicionó 5 μ l de α -³²P-dCTP (Amersham) al tubo y se incubó durante 10 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con 5 μ l de EDTA 200mM.

9.3 Titulación, selección y aislamiento de las clonas a partir de una biblioteca de ADN complementario (tamizaje)

Anteriormente, en el laboratorio de biología molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM se construyó una biblioteca de ADNc contenida en el fago λ gt10 y obtenida a partir del ARNm del cisticerco de *T. solium*.

Una colonia de *E. coli* cepa C600 *hfl*⁻ fue inoculada en 50 ml de medio SOBMB e incubada a 37 °C durante toda la noche. La titulación de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo realizando diferentes diluciones de la misma. En volúmenes de 200 μ l de bacterias se infectaron con diferentes volúmenes de las diluciones de la biblioteca por 15 min, para sembrarlos en cajas Petri con medio SOBMB-agar. Una vez solidificado el medio se incubó toda la noche a 37 °C. Para obtener el título de la biblioteca se contaron el número de placas líticas y se multiplicó por el factor de dilución respectivo. Se sembraron 45,000 fagos en tres cajas Petri de 180 mm de diámetro, siguiendo el protocolo anterior. Las placas líticas producidas por los fagos se transfirieron a membranas de nylon (Hybon de Amersham Bioscience), colocando la membrana por encima del tapete crecido en la caja Petri. Estas membranas se mantuvieron por 2 min para desnaturalizar el ADN del fago y luego se neutralizó el pH con una solución neutralizante de Tris-HCl por otros 2 min. Finalmente se lavaron con una solución de citratos (SSC) 5X durante 2 minutos. El ADN se fijó a la membrana mediante luz UV,

utilizando un equipo UV Stratalinker 2400 de la casa Stratagene. Las membranas se secaron a temperatura ambiente y después se colocaron en una solución de hidratación por 1 h a 50°C. Se agregó la sonda marcada con α -³²P-dCTP (la sonda se desnaturalizó a 100 °C por 5 min) y se dejó hibridar con las membranas toda la noche a 55°C. Las membranas se lavaron 3 veces con 100 ml de SSC 2X por 5 min en agitación y a continuación se secaron y se expusieron a placas de rayos X toda la noche para después revelarlas. Las clonas positivas se aislaron y almacenaron en 1 ml de medio SM a 4 °C. Posteriormente se realizó un segundo y tercer tamizaje para obtener las clonas de fagos aisladas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

9.4 Purificación del ADN a partir de fagos

Para la obtención del ADN de los fagos se infectaron 300 μ l de cultivo de *E. coli* C600 *hfr* con 1×10^6 fagos y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Terminado el tiempo se sembró la mezcla en una caja Petri con agar SOB_M, como ya se describió anteriormente. Se creció toda la noche a 37 °C hasta obtener una lisis del tapete bacteriano. Los fagos se recuperaron con 5 ml de medio SM agitando por 1 h a temperatura ambiente, luego se adicionaron 2 ml más de SM a la caja, con la finalidad de recuperar los fagos remanentes. El SM con los fagos se transfirió a tubos Falcón de 15 ml y se adicionaron 200 μ l de CHCl₃ y se centrifugó a 3400 rpm (Centra CL2, IEC) por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a 4 °C. De éste se tomaron 700 μ l y se mezclaron con 700 μ l de PEG (dilución 1:1) en un tubo de microfuga de 1.5 ml y se mantuvieron en hielo por 2 h. Luego se centrifugó a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante 15 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. A continuación, la pastilla se resuspendió con 200 μ l de medio SM y se le adicionó 2 μ l de ARNasa (1mg/ml) y 2 μ l de ADNasa (100 μ g/ml) incubándose a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se agregaron 2 μ l de SDS al 10 % y 2 μ l de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y se incubaron a 68 °C por 15 min. La mezcla anterior se sometió a extracciones con 200 μ l de fenol saturado con TE y 200 μ l de CHCl₃ en la primera extracción y 200 μ l de CHCl₃ en la segunda. A la fase acuosa obtenida en la segunda extracción se le adicionan 200 μ l de isopropanol y se mantuvo a -70°C por más de 2 h. A continuación, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm (Eppendorf

Centrifuge 5415C) por 10 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 5 min y se desechó el sobrenadante. El botón (ADN) se secó a 37 °C por 10 min y se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE.

9.5 Ligación y transformación bacteriana

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el estuche de ligación TOPO-TA Cloning System de Invitrogen, siguiendo el protocolo del fabricante. Se mezclaron los siguientes reactivos: 3 µL de Producto de PCR (fresco), 1 µl de amortiguador de ligación salino, 1 µl de agua estéril, 1 µl de Vector pCR II, para obtener un volumen final de 6 µl.

La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 1h y posteriormente 2 µl de la ligación se incubaron con 50 µl de *E. coli* TOP 10 químicamente competentes. La mezcla se incubó en hielo por 1 h y en seguida se sometió a un choque térmico a una temperatura a 42 °C por 30 seg. Rápidamente, se les adicionó 400 µl de medio SOC y se incubó a 37 °C por 30 min en agitación. Trascurrido el tiempo de incubación las bacterias se sembraron en una caja Petri con LB/ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron crecer a 37 °C durante toda la noche. Se escogieron clones al azar para extraer su DNA plasmídico y con los iniciadores M13F y M13R se sometieron a la PCR para verificar la presencia de los insertos.

9.6 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Las bacterias transformadas y positivas para el inserto de interés se crecieron en 100 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C con aireación vigorosa. Se cosechó el cultivo bacteriano por centrifugación a 3400 rpm (Centra CL2, IEC) durante 15 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de solución de lisis (50 mM sacarosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA) se agregó lisozima elaborada al momento (4 mg/ml), se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 10 ml de la solución alcalina recién preparada 50/50 (0.4 N NaOH, 2% SDS mezcla guardada en frasco de plástico), se agitó la mezcla suavemente por inversión lenta y se incubó en hielo por 10 min. En seguida se

adicionaron 7.5 ml de una solución de acetato de amonio 7.5 M a un pH 7.8, se mezcló el contenido del tubo suavemente por unos segundos y se incubó 10 min en hielo, posteriormente se centrifugó a 3400 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en un tubo de microfuga en 200 μ l de TE y se le agregaron 2 μ l de ARNasa (1mg/ml) incubando por 30 min a 37°C. Posteriormente la muestra se extrajo con fenol-cloroformo y la fase acuosa se vertió por una columna de sefarosa CL4B previamente equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 500 μ l y las fracciones conteniendo el ADN plasmídico se precipitaron con acetato de sodio 3 M pH 5.2 y etanol absoluto, dejando la mezcla de 2 a 12 horas a -70 °C. Las muestras se centrifugaron 10 min a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C), se desechó el sobrenadante y la pastilla seca se resuspendió en 50 μ l de TE.

9.7 Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo con el estuche Thermo Sequence Cy 5.5 Dye Terminator Sequencing Kit, se utilizaron 500 ng de ADN plasmídico en 12 μ l de la mezcla “*master mix*” conteniendo iniciadores marcados fluorescentemente (2-5 μ M). Esta mezcla se agitó y se repartieron 3 μ l en los respectivos tubos conteniendo los dideoxinucleótidos (A, C, G y T, se agitaron perfectamente) y se sometieron a 20 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Terminados los ciclos las mezclas se enfriaron a 4 °C y se les agregaron 6 μ l de amortiguador TE. Para mejorar las señales de eliminación por el exceso de fluorocromos, las mezclas antes de ser cargadas en el gel se pasaron a través de una microcolumna de sefarosa G-50 para eliminar todos los dideoxinucleótidos e iniciadores que no se incorporaron durante la extensión, las muestras se secaron inmediatamente utilizando vacío y se resuspendieron en 6 μ l de amortiguador cargado con formamida y colorante. La secuenciación se llevo a cabo en el secuenciador SEQ4x4 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

9.8 Expresión de la TsTrx recombinante.

El fragmento que codifica para la Trx de *T. solium* fue amplificado utilizando dos oligonucleótidos diseñados con las primeras y últimas 17 bases de la secuencia codificante incluidos los codones de inicio y término, clonado en el vector pRSET

siguiendo la metodología de ligación, ya descrita previamente. Se obtuvieron dos clonas transformadas en *E. coli* BL21 que contenían el fragmento. Estas se crecieron toda la noche, se congelaron en glicerol al 70% y se guardaron a -70 °C.

Para la expresión de la Trx, se inoculó una alícuota del glicerol de la clona 1 (Trx-) en medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C, con agitación a 200 rpm por toda la noche. Al día siguiente se hizo una dilución 1:10 de este precultivo y se creció bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ~0.6, momento en el cual se agregó el IPTG a concentración final de 1 mM. Para realizar la cinética de expresión, los tiempos evaluados se tomaron desde el momento de la inducción, de tal manera que se tomaron alícuotas de 10 ml del cultivo a las 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h y se centrifugaron. Las pastillas se lavaron con 10 ml de un amortiguador que contiene Tris 20 mM (pH 7.4), se centrifugaron (4000 rpm/15min) y se decantaron los sobrenadantes. Posteriormente los paquetes celulares se resuspendieron con Tris-EDU (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, Ditiotretitol 1 mM y 4 M de Urea, pH 7.5) y se sonicó tres veces a máxima amplitud por un minuto. Después se centrifugaron a 4000 rpm por 25 min y se separaron las fracciones. El sobrenadante se pasó por una columna Hi-Trap (Invitrogen) de 1 ml, la cual previamente se lavó con agua (10 ml), se cargó con 2 M de Níquel (5 min) y se equilibró con TRIS-EDU (10 ml). Posteriormente se cargo el extracto de *E. coli* con la proteína expresada y se eluyó en fracciones de 2 ml con las soluciones conteniendo 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM y 700 mM de Imidazol, se recolectaron fracciones de 1 ml. Se utilizó una solución de 1 M de EDTA para eluir todo el material unido a la columna y esta se lavó con agua. Las fracciones se corrieron en geles de poliacrilamida de 15% en condiciones desnaturalizantes. Las fracciones conteniendo a la Trx se dializaron para después determinarles su concentración proteica por el método de Lowry.

9.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

Se tomó el equivalente a 10 µg de proteína de cada uno de los extractos a separar y de 5 µg de la enzima pura. Las fracciones se mezclaron a una relación 1:1 con amortiguador de cargado (dodecil sulfato de sodio (SDS) 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2%, disueltos en Tris-HCl 100 mM, pH 6.8) y se incubaron a 100 °C

durante 5 minutos para ser separadas en el PAGE-SDS discontinúo al 15%, el cual está constituido por un gel concentrador (se mezcló una solución de Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, Tris 1.0 M pH 6.8, persulfato de amonio 10% (PSA), SDS 10% y N, N, N, N –tetrametil etilendiamina (TEMED), agua c.b.p.) y un gel separador (se mezcló una solución de Acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%, Tris 1.5 M pH 8.8, persulfato de amonio 10% (PSA), SDS 10% y N, N, N, N –tetrametil etilendiamina (TEMED), agua c.b.p.). Se utilizó un amortiguador de cámara (Tris 250mM – Glicina 192 mM, pH sin ajustar ~8.3) y se corrió a un voltaje 100 mV constante durante 1 hora. Las bandas separadas de las muestras en los geles se tiñeron con azul de Coomassie (0.125% de Azul de Coomassie, 50% metanol, 10% de ácido acético) por 1h con agitación y se destiñeron con una solución de ácido acético al 20%, hasta que las bandas fueron notorias.

9.10 Inmunoelectrotransferencia

Las bandas de las muestras separadas en el SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) en una cámara de transferencia (Biorad), utilizando un amortiguador (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, metanol 20%, agua destilada c.b.p.) y aplicando un voltaje de 100 mV por una hora. Para verificar si la transferencia fue exitosa se colocó la membrana en una solución de Ponceau S (0.1% (w/v) de Ponceau S disuelto en 5% (v/v) de ácido acético concentrado) por 1 min y luego se lavó con agua hasta visualizar las bandas. Se secó la membrana y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La membrana se lavó con PBS y se cortó en tiras, que fueron colocadas en charolas de 500 µl con una solución bloqueadora toda la noche a 4 °C (PBS conteniendo 5% de leche semidescremada, pH 7.4), luego se lavó tres veces la membrana con una solución de PBS con 0.05% de Tween 20 por cinco minutos, después se incubó una hora con el anticuerpo monoclonal anti-histidinas conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma- Aldrich) en PBS (dilución 1:2500), se volvió a lavar tres veces en PBS. Finalmente se reveló (1-3min) con los sustratos BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) y NBT (Nitro blue tetrazolium) disueltos en un amortiguador alcalino (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9.0).

9.11 Ensayo de actividad de la TsTrx

La actividad de la TsTrx se evaluó por un ensayo de reducción de insulina, descrito por Holmgren (1979). Para esto se hizo una solución que contenía 100 mM de amortiguador de fosfatos de potasio (pH 7.5), 0.160 mM de Insulina de páncreas bovina (Sigma-Aldrich), 1 mM de ditioneitol (DTT) y se adicionaron alícuotas purificadas de la TsTrx (1.125 μ M y 5.0 μ M), y de la Trx de *E. coli* (0.566 μ M y 2.5 μ M, Sigma-Aldrich), como control negativo se usó una mezcla sin la enzima. El incremento de la absorbancia fue monitoreado a 650 nm a temperatura ambiente (25 °C) por 45 min.

9.12 Análisis bioinformático

Para los análisis de la secuencia primaria de la TsTrx, se utilizó el software ProtParam del servidor ExPASy [Gasteiger E., 2005]. Se calcularon los siguientes parámetros proteicos: Peso molecular, pI teórico, composición de residuos de aminoácidos, composición atómica, estimado de vida media e índice de inestabilidad.

X. Resultados

Con la RT-PCR, ADNc de *T. solium* y oligonucleótidos específicos para las Trx, se obtuvo una secuencia de 153 pb, que codifica para una secuencia de 51 aminoácidos de una Trx (Ver Fig. 10).

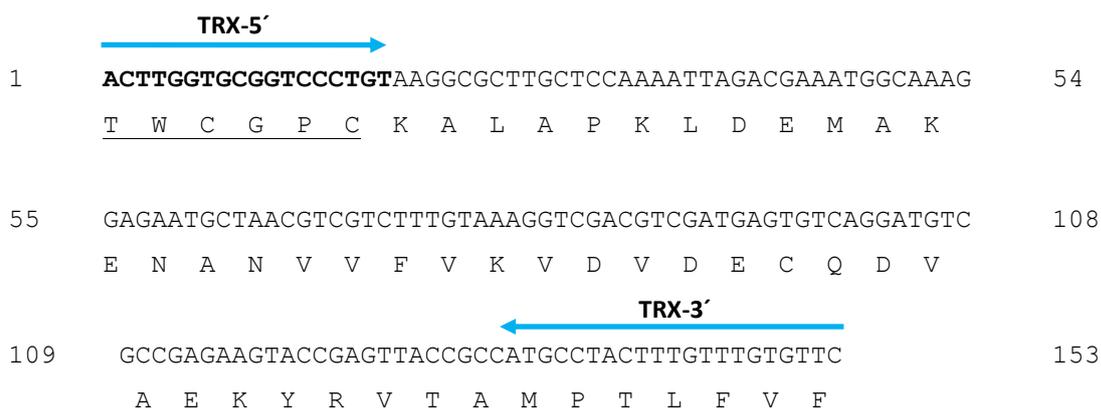


Fig. 10. Traducción de la secuencia nucleotídica del fragmento obtenido a partir del ADNc de *T. solium* mediante la RT-PCR. La localización de los iniciadores en la secuencia se muestra con una flecha y en colores.

Este fragmento fue marcado con α -³²P-dCTP y se utilizó como sonda, para el aislamiento de clonas que tuvieran la secuencia completa que codifica una Trx de *T. solium*. Se realizaron tres tamizajes de la biblioteca de ADNc construida previamente en el fago λ gt10 para tener la certeza de seleccionar específicamente aquellas clonas que contuvieran el gen de interés.

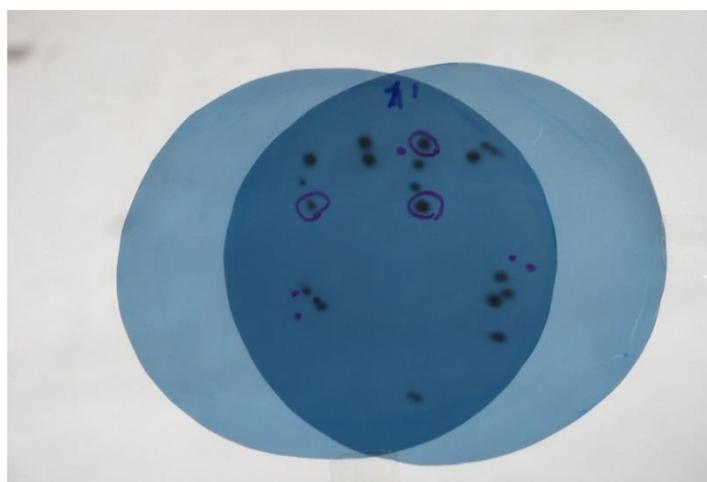


Fig. 11.-Autorradiografías de la membrana original y su copia del tamizaje terciario que muestran las clonas que hibridaron con la sonda marcada (puntos negros).

En el último tamizaje se obtuvieron 20 clones de fagos (Ver Fig. 11). Posteriormente se purificó el ADN del fago de cada una de estas clonas y se utilizó como templado en la PCR junto con los iniciadores λ gt10 5' y λ gt10 3' que flanquean el sitio de clonación del fago λ gt10. Puesto que todas las clonas mostraron un patrón de amplificación muy similar, un fragmento de \sim 500 pb (Fig. 12A), se realizó un análisis por digestión enzimática con las endonucleasas *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI* para dilucidar si las clonas eran las mismas (La Fig. 12B, sólo se muestra el patrón de digestión de las clonas con la enzima *EcoRI*). Los patrones de digestión con las enzimas antes mencionadas mostraron que los patrones de restricción son idénticos, lo que sugiere que es la misma clona.

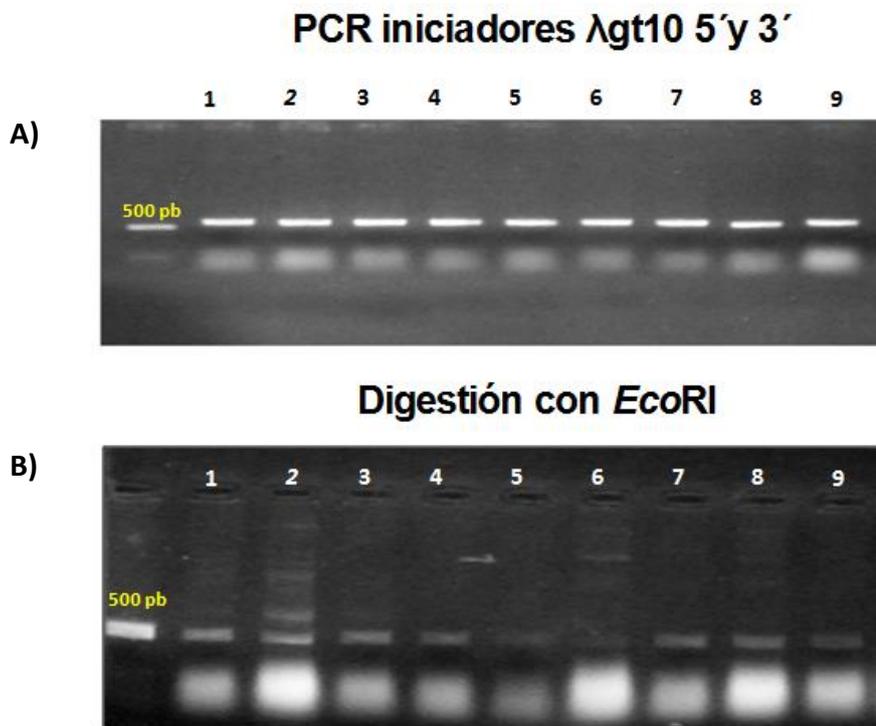


Fig. 12. Patrón de restricción del fragmento de PCR obtenido de la clona 1 con los oligonucleótidos λ gt10 5' y 3' (A) sin digerir y (B) digeridos con la enzima *EcoRI*. 1.- Marcador de peso molecular de 500 pb. 2.- clona 1, 3.- clona 3, 3.- clona 5, 4.- clona 7, 5.- clona 9, 6.- clona 11, 7.- clona 13, 8.- clona 15, 9.- clona 17.

El producto de PCR de la clona 1, amplificado con los iniciadores λ gt10 5' y λ gt10 3', se clonó en el vector pCRII y se obtuvo una elevada eficiencia de transformación en *E. coli* TOP10 ($>1 \times 10^9$ UFC/ μ g pUC19). Se efectuó un escrutinio en los grupos de colonias que se eligieron al azar y se picaron en el medio correspondiente. Para corroborar la

presencia del gen Trx se hizo una PCR utilizando los iniciadores M13F y M13R y todas las clonas amplificaron dicho fragmento (~1 kb). Se eligió la clona 5 y se secuenció. De la secuencia obtenida se hizo un análisis bioinformático (Ver Fig. 13). Se reveló que ésta contiene 428 nucleótidos, con 30 pb en la región 5' sin traducir (5'-STD) antes del codón de inicio y 73 pb en la región 3' sin traducir (3'-STD) después del codón de paro, incluido un sitio de poliadenilación clásico AATAAA a 25 pb del codón de término con 20 adeninas. Además, presenta un marco de lectura abierto que empieza en el nucleótido 31, con el codón de inicio (ATG) y termina en el nucleótido 353 con el codón de término (TGA). Dentro del marco de lectura abierta se encontró el motivo catalítico (Cys34-Gly35-Pro36-Cys37); además la secuencia presentó varias características de las Trxs, como son las superficies hidrofóbicas (Gly35-Pro36), (Met76-Pro77) y (Val92-Gly93-Ala94) y los residuos cargados Lys38 y Glu58.

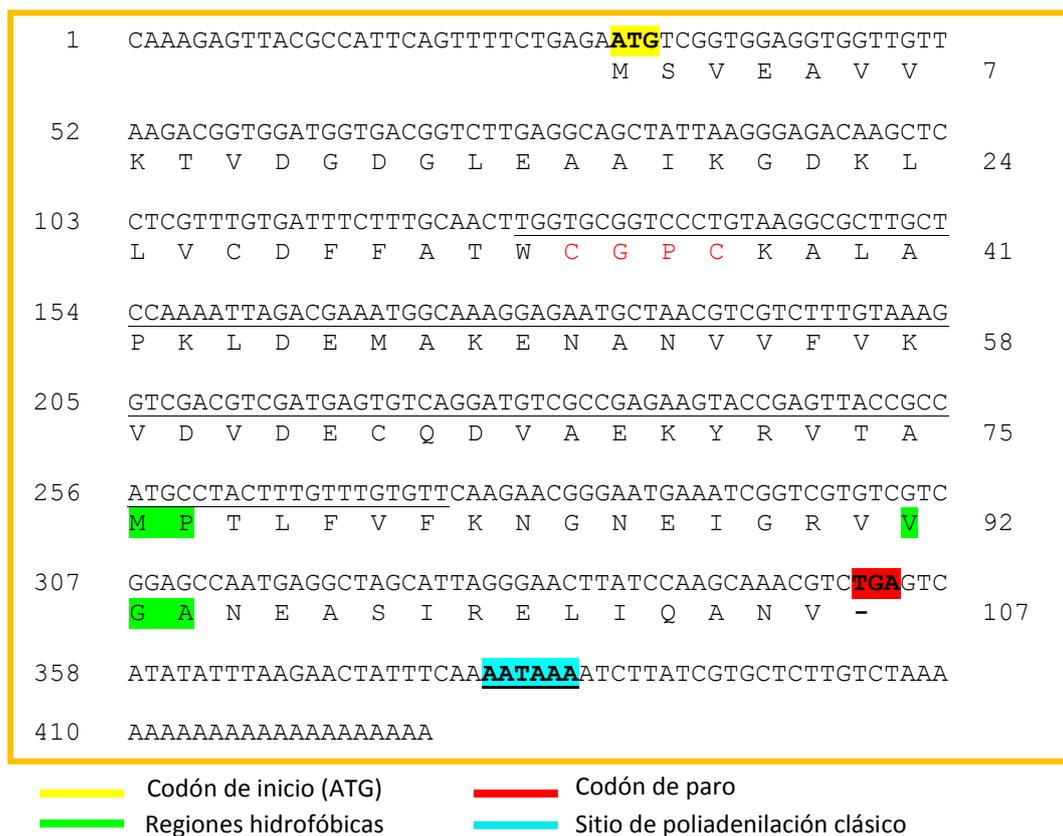


Fig. 13.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos obtenidos del ADNc de la clona 5 clonada en pCRII. Los números de la izquierda se refieren a los nucleótidos y los de la derecha a los aminoácidos traducidos. La secuencia subrayada corresponde a la sonda que se obtuvo y utilizó para el tamizaje de clonas. El motivo catalítico se marca en letras rojas. Se señalan el sitio de inicio, término y el de poliadenilación en los colores amarillo, rojo y azul cielo, respectivamente.

Además con el software ProtParam del servidor ExPASy [Gasteiger E., 2005] se dedujeron varios factores fisicoquímicos, a partir de la secuencia primaria de la TsTrx y de las tiorredoxinas de otros organismos (Ver tabla 2).

| Tipo de Trx | Núm. de acceso en GeneBank | Longitud de la sec. de aminoácidos | Masa molecular (kDa) | pI Teórico | Residuos cargados (-) (%) | Residuos cargados (+) (%) | Aminoácidos abundantes (%) | | Índice de inestabilidad |
|-------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------|------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------|-------------------------|
| | | | | | | | | | |
| TsTrx | | 107 | 11579.3 | 4.67 | 15.88 | 11.21 | Val | 15.0 | 9.98 |
| | | | | | | | Ala | 12.1 | |
| | | | | | | | Glu | 8.4 | |
| | | | | | | | Lys | 8.4 | |
| EgTrx | AAC14584.1 | 107 | 11556.4 | 4.80 | 15.88 | 11.21 | Ala | 13.1 | 11.31 |
| | | | | | | | Val | 12.1 | |
| | | | | | | | Lys | 9.3 | |
| | | | | | | | Glu | 8.4 | |
| HsTrx | AAH54866.1 | 105 | 11737.5 | 4.82 | 16.19 | 11.42 | Lys | 11.4 | 26.88 |
| | | | | | | | Val | 10.5 | |
| | | | | | | | Glu | 9.5 | |
| | | | | | | | Phe | 8.6 | |
| MmTrx | CAA54688.1 | 105 | 11675.4 | 4.80 | 16.19 | 11.42 | Lys | 11.4 | 24.80 |
| | | | | | | | Ala | 10.5 | |
| | | | | | | | Val | 10.5 | |
| | | | | | | | Glu | 8.6 | |
| SmTrx | AAL79841.1 | 106 | 11924.0 | 5.84 | 16.03 | 15.09 | Lys | 14.2 | 29.24 |
| | | | | | | | Val | 9.4 | |
| | | | | | | | Glu | 8.5 | |
| | | | | | | | Ile | 8.5 | |
| EcTrx | AAA24534.1 | 109 | 11806.6 | 4.67 | 14.67 | 10.09 | Leu | 11.9 | 8.15 |
| | | | | | | | Ala | 11.0 | |
| | | | | | | | Asp | 10.1 | |
| | | | | | | | Gly | 8.3 | |
| | | | | | | | Ile | 8.3 | |

Tabla 2. Se muestra la comparación en la composición y de las características físicas y químicas de las secuencias de aminoácidos de las Tiorredoxinas de: *T. solium* (TsTrx), *E. granulosus* (EgTrx), *H. sapiens* (HsTrx), *M. musculus* (MmTrx), *S. mansoni* (SmTrx) y *E. coli* (EcTrx).

Los resultados de la tabla 2 muestran que con respecto a las Trx de otros organismos, la TsTrx tiene pocas variaciones en cuanto a la longitud de la secuencia de aminoácidos, la masa molecular, el pI teórico y el número residuos de aminoácidos cargados positivamente (Arg + Lys) y negativamente (Asp + Glu). En general las secuencias de las Trx analizadas fueron abundantes principalmente en Ala, Val, Glu y Lys. La Phe también fue abundante en la Trx de *H. sapiens*; Leu y Ile en la Trx de *S. mansoni* y *E. coli*. Finalmente, Asp y Gly también fueron abundantes en la Trx de *E. coli*. En todas las Trx analizadas el número de residuos de aminoácidos con carga negativa fue más elevado que los cargados positivamente, lo cual indica que estas Trx (incluyendo la TsTrx) tienden a ser proteínas ácidas. El índice de inestabilidad de las Trx de todos estos organismos fue menor a 40 (intervalo de 8.15 - 29.24) lo cual implica que la TsTrx es una proteína estable.

La construcción obtenida en pRSET se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL que contiene copias extras de los genes que codifican para los ARNt *argU*, *ileY*, *leuW* y *proL*, lo que permite una elevada expresión de proteínas recombinantes, inducida mediante la adición de IPTG. De la transformación se tomaron clones al azar y se expresó con el inductor. Todas las clones presentaron el mismo patrón de expresión (datos no mostrados). Por lo que se tomó la clona número uno y se le hizo una cinética de expresión a diferentes tiempos tomando como control negativo un cultivo sin IPTG (Ver Fig. 15).

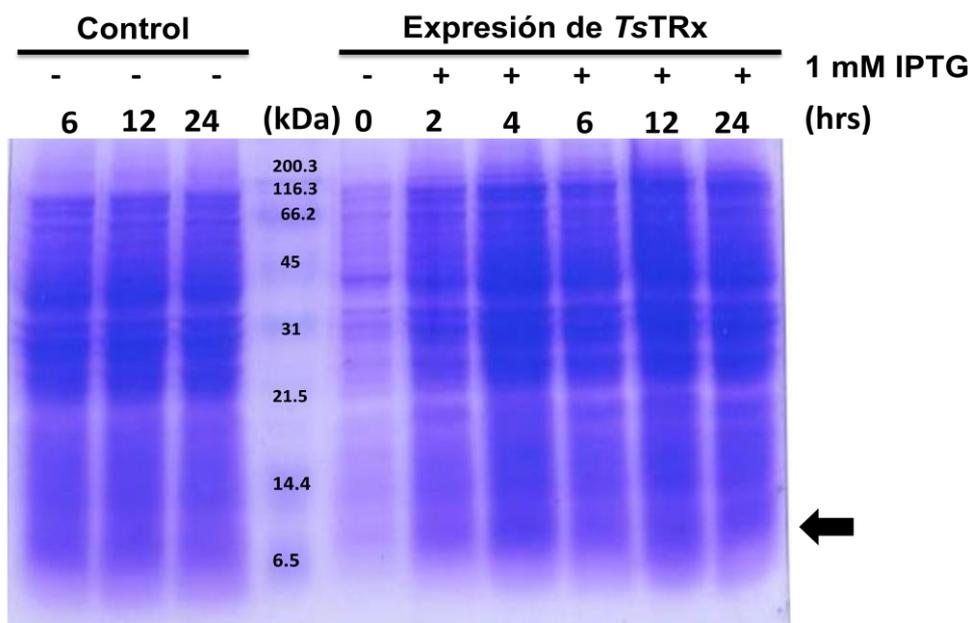


Fig. 15.- Cinética de expresión de la clona 1 de Trx en pRSET a diferentes tiempos. Una vez alcanzada la DO_{600nm} se tomaron alícuotas de cultivo de Trx-BL21 c1 sin IPTG a las 6 h, 12 h y 24 h, así mismo se tomaron alícuotas de cultivo adicionadas con 1 mM de IPTG a las 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h bajo las mismas condiciones que el control.

Se observó en el patrón de proteínas que a las 4, 12 y 24 horas se producía el máximo de expresión de la Trx recombinante. Para confirmar la presencia de la Trx durante el proceso de inducción se hizo una inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos monoclonales anti-histidina. Se observó en un cultivo inducido por 24 h un alto reconocimiento con los anticuerpos anti-histidina, en contraste se observó un reconocimiento ligero en un cultivo no inducido por 24 h (control) (Fig. 16).

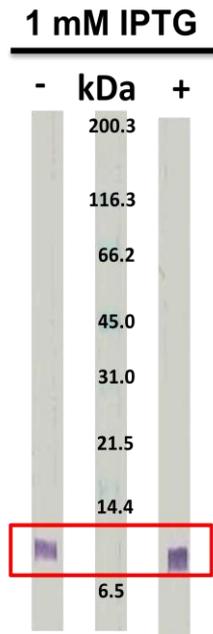


Fig. 16.- Inmunoelctrotransferencia de la Trx recombinante usando anticuerpos monoclonales anti-histidina. Cultivos expresados por 24 h: Sin IPTG y con IPTG 1 mM.

El proceso de purificación utilizando la sonicación de las bacterias con el amortiguador de Tris 20 mM (pH 7.5) y sacarosa al 20 % mostró que la Trx recombinante permanece en la fracción insoluble (datos no mostrados). Esto nos sugiere que se encontraba formando agregados insolubles (cuerpos de inclusión).

Para resolver el problema se utilizó el mismo amortiguador hecho con Urea 4 M, lo que nos permitió solubilizar la TsTrx. Posteriormente se purificó por cromatografía de afinidad con nickel (Hi-Trap). La Figura 17 muestra el proceso de la purificación de la TsTrx recombinante donde se observó que se eluye entre las fracciones de 50 mM y 100 mM de imidazol. Mediante este método se produjeron rendimientos muy similares en los tiempos de expresión evaluados, que oscilaron entre 0.544 mg - 0.714 mg/10ml de cultivo bacteriano (Ver tabla 3).

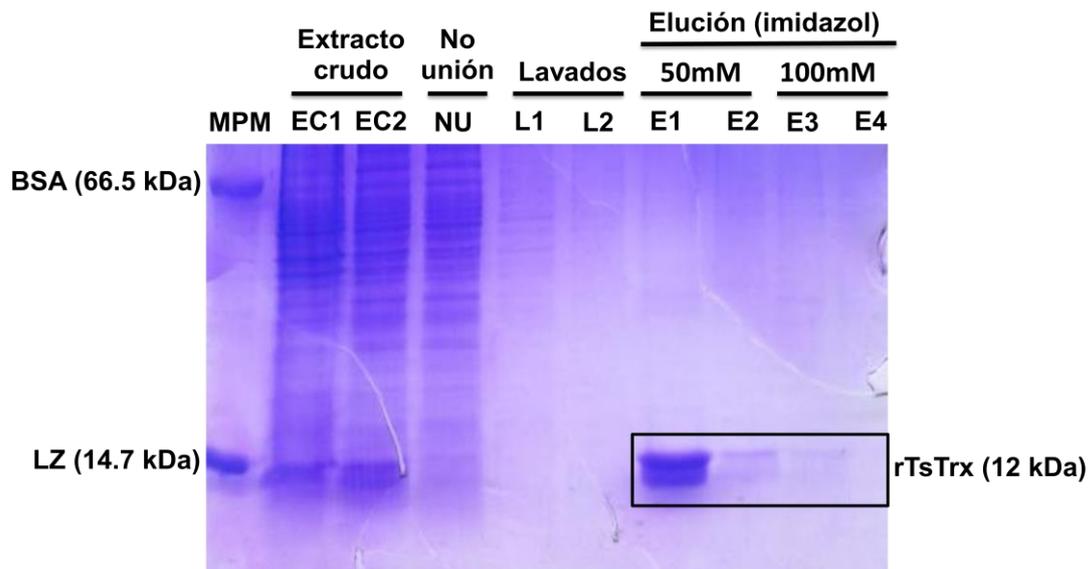


Fig. 17. Purificación de la TsTrx recombinante (rTsTrx) por cromatografía de afinidad. En este PAGE-SDS se muestran las fracciones del extracto crudo de *E. coli* producido con 4 M de urea (EC1) el cual fue sonicado y centrifugado (EC2). NU, representa la fracción de no unión a la resina. Además se hicieron dos lavados (L1 y L2) y finalmente se obtuvieron dos fracciones de elución por cada concentración de imidazol utilizada (E1 a E4). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizó una mezcla de 5 μ g de la albúmina sérica bovina (BSA) más 5 μ g de la lisozima (LZ). La fracción E2 corresponde a 20 μ g de la rTsTrx.

| Fracción | Rendimiento mg/10 ml de cultivo bacteriano |
|-------------------------------|--|
| EXPRESIÓN POR 4 HORAS | |
| Extracto bacteriano crudo | 6.144 |
| TsTrx pura (4h) | 0.714 |
| EXPRESIÓN POR 6 HORAS | |
| Extracto bacteriano crudo | 4.856 |
| TsTrx pura (6h) | 0.544 |
| EXPRESIÓN POR 12 HORAS | |
| Extracto bacteriano crudo | 5.568 |
| TsTrx pura (12h) | 0.643 |
| EXPRESIÓN POR 24 HORAS | |
| Extracto bacteriano crudo | 6.352 |
| TsTrx pura (24h) | 0.714 |

Tabla 3. Se muestra la proteína total y el rendimiento obtenido durante el proceso de purificación a diferentes tiempos de expresión. Se evaluaron los tiempos de expresión de 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h.

Finalmente, la Trx pura se le determinó su actividad de disulfuro oxidoreductasa, mediante un ensayo espectrofotométrico (650 nm) basado en la reducción de insulina por ditiotreitól, que genera la precipitación de la cadena libre de la insulina B. Para

realizar este ensayo se cuantificó la proteína TsTrx por el método de Lowry y se usaron dos concentraciones conocidas (1.125 μM y 5.0 μM); como control positivo se utilizó a la Trx de *E. coli* (0.566 μM y 2.5 μM); como control negativo la reacción sólo contenía el DTT como agente reductor. El análisis mostró que la TsTrx tiene actividad de reducir la insulina si la comparamos con la reacción sin enzima (sólo DTT). Los datos de la gráfica indican que 1.125 μM y 5.0 μM de la Trx de *T. solium* tiene una actividad similar a 0.566 μM y 2.5 μM de la Trx de *E. coli* (Ver fig. 18).

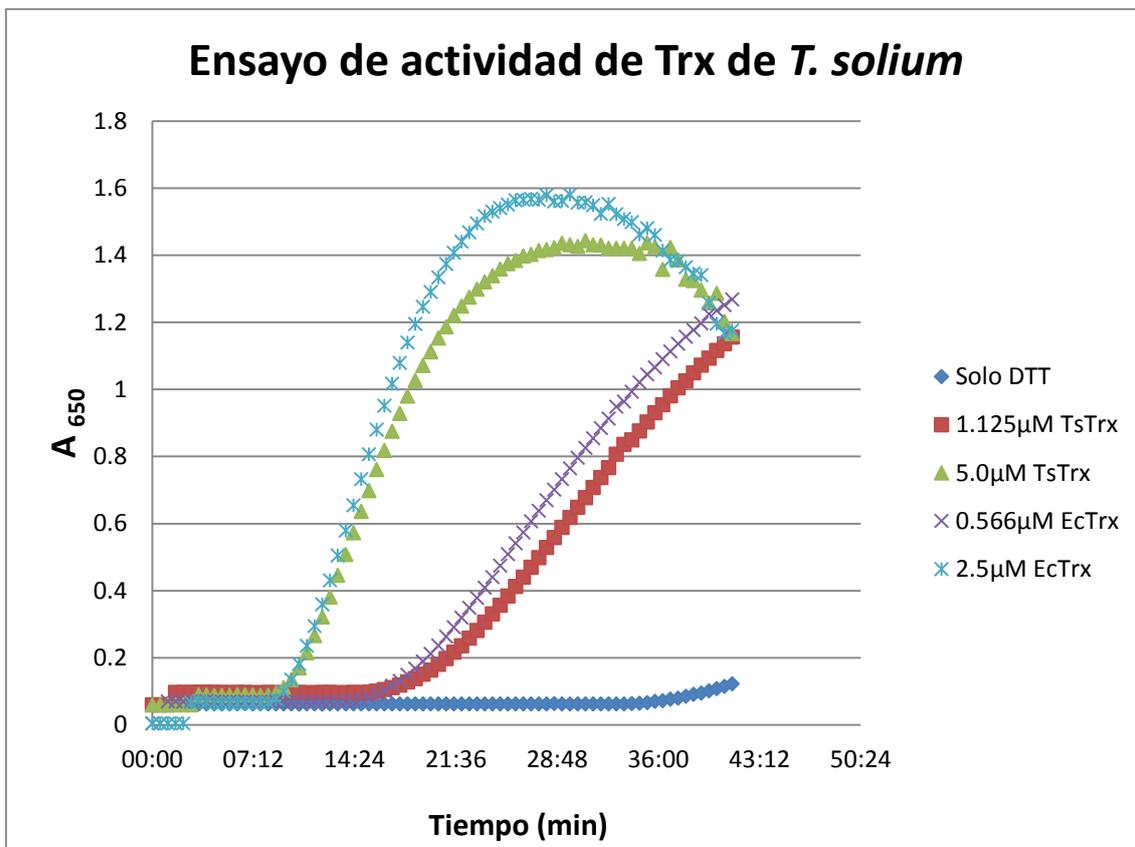


Fig. 18. Catálisis de reducción de insulina con la TsTrx. El experimento se llevó a cabo por 40 min. Se observa que la TsTrx tiene actividad oxidorreductasa ya que fue capaz de catalizar la reducción de insulina como lo hace la Trx de *E. coli* utilizada como control positivo, a diferencia del control que no contiene enzima y sólo 1 mM de DTT.

XI. Discusión de resultados

El fragmento obtenido por la amplificación de la RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados de las regiones conservadas de las Trx fue del tamaño esperado (153 pb), el análisis de la secuencia nucleotídica nos indicó que el fragmento codifica para una Trx. Mediante el método de escrutinio y tamizaje de una biblioteca de ADNc, similar al utilizado en otros estudios de otras Trx [Wollman E, *et al.* 1988], se aislaron las clonas que contenían el gene completo de la TsTrx.

El dato más relevante del análisis bioinformático de la clona obtenida del tamizaje terciario fue que la secuencia de aminoácidos de la TsTrx presentaba el “motivo catalítico Trx” (CXXC) que es una secuencia conservada en todas las Trx reportadas hasta la fecha [Holmgren, 1968]. El análisis de alineamiento con otras Trx muestra que aislamos una Trx completa. Se demostró *in silico* que la composición de aminoácidos y las características físico-químicas de la TsTrx son similares a las encontradas en otras Trx reportadas (Holmgren, 1968., Wollman 1988), incluso a la Trx de *S. mansoni* (Alger, *et al.*, 2002). También se encontró que la TsTrx contiene dos residuos de cisteínas (Cys27 y Cys 64) fuera del sitio catalítico, a diferencia de las Trx de otros helmintos [Alger H, *et al.* 2002] que no las contienen. No sabemos si estos residuos tienen alguna importancia biológica, tal como sucede en la Trx-1 que contiene tres residuos de cisteína en otras posiciones al sitio activo, que están implicadas en funciones reguladoras y en la formación de los homodímeros (como la Cys73) [Ren, X., *et al.*, 1993; Weichsel, A., *et al.* 1996]. Cabe destacar que la TsTrx presentó mayor identidad con la EgTrx, debido a que estos organismos están filogenéticamente más emparentados. Es interesante que la TsTrx tiene una identidad pobre con respecto a las Trx de mamíferos (*H. sapiens*, *M. musculus*), por lo que las regiones diferentes se podrían usar para elaborar una vacuna.

En algunos estudios que usaron condiciones similares de expresión a las nuestras y pudieron obtener Trx recombinantes de trigo en la fracción soluble [Yang, Z. J., *et al.* 2013; Kunchithapautham, K., *et al.*, 2013.]. Sin embargo, durante la producción de la TsTrx se formaron cuerpos de inclusión, lo que explica el porqué los rendimientos de purificación son muy similares a los tiempos de expresión de las 4 h, 12 h y 24 h. Por lo

que en estudios posteriores para la recuperación de la proteína, utilizamos urea a una mayor de concentración molar [Singh, M. S., Panda, K. A. 2005.]. Asimismo los rendimientos de la proteína en los tiempos evaluados también podrían estar afectados por la expresión basal sin control de la TsTrx [Pan, S., *et al*, 2000.], tal como se muestra en la inmunoelectroforesis con los anticuerpos monoclonales anti-polihistidina en el cultivo no inducido.

Cabe señalar que cuando se purificó la TsTrx no se le eliminó la etiqueta de histidinas presente en el extremo amino terminal de la proteína. Se ha reportado que al parecer ésta no afecta la actividad enzimática de las Trx recombinantes expresadas en *E. coli* [Tanaka, R., *et al*, 2004.].

Por último el ensayo de reducción de insulina nos muestra que la TsTrx (pH 7.5 con 1 mM DTT) presenta la mitad de actividad catalítica que la Trx de *E. coli*, lo que nos sugiere que la TsTrx tiene actividad de óxido-reductasa.

En este estudio se aisló el ADNc que codifica para la TsTrx y produjimos una enzima funcional. Esto abre las puertas al estudio detallado de la importancia de la Trx y del sistema redox en la vida de este parásito.

XII. CONCLUSIONES

- ❖ Se aisló la primera tiorredoxina de *Taenia solium* (TsTrx).
- ❖ Esta TsTrx presenta una alta identidad con las Trx de otros céstodos.
- ❖ Se produjo un método para producir la rTsTrx-H₆.
- ❖ La rTsTrx producida tiene actividad de oxidoreductasa.

XIII. Referencias bibliográficas

Alger, H. M., Sayed, A. A., Stadeckerb, M. J., Williams, D. L. (2002). "Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin." International Journal for Parasitology, **32**(10): 1285-1292.

Allan, J. C., Ávila, G., García, N. J., Flisser, A., Craig, P. S. (1990). "Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection." Parasitology, **101**(3): 473-477.

Arnér, E. S., Holmgren A. (2000). "Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase." Current Protocols in Toxicology. I. John Wiley & Sons: 7.4.1-7.4.14.

Brusca, R. C., Brusca, G. J. (2005). "Invertebrados", McGraw-Hill Interamericana de España S.L.

Callahan, H. L., Crouch, R. K., James, E. R. (1988). "Helminth anti-oxidant enzymes: A protective mechanism against host oxidants?" Parasitology Today, **4**(8): 218-225.

Chiumiento, L., Bruschi, F. (2009). "Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites." Parasitology research, **105**(3): 593–603.

Cioli, D., Valle, C., Angelucci, F., Miele, A. (2008). "Will new antischistosomal drugs finally emerge?" Trends in Parasitology, **24**(9): 379-382.

Collet, J. F., Messens, J. (2010). "Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins." Antioxidants & redox signaling, **13**(8): 1205-1218.

Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S.G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A.K., Just, U., Sinowatz, F., Schmahl, W., Chien, K.R., Wurst, W., Bornkamm, G.W., Brielmeier, M. (2004). "Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function." Molecular and cellular biology, **24**(21): 9414–9423.

Czczot, H., Skrzycki, M., Majewska, M., Podsiad, M., Salamatin, R., Grytner-Ziecina, B. (2012). "Enzymatic antioxidant system in the cestode *Hymenolepis diminuta* after chronic infection of the rat." Central European Journal of Biology, **7**(6): 987-995.

Dorny, P., Brandt, J., Zoli, A., Geerts, S. (2003). "Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis." Acta Tropica, **87**(1): 79-86.

Dorny, P., Brandt, J. Geerts, S. (2005). "Detection and diagnosis." WHO/FAO/OIE guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. K. D. Murrell. Paris, Francia.

Dzik, J. M. (2006). "Molecules released by helminth parasites involved in host colonization." Acta Biochimica Polonica, **53**(1): 33-64.

- Fleury, A., Escobar, A., Chavarría, A., Carrillo-Mezo, R., Sciutto, E.** (2006). "Cisticercosis en el ser humano." Cisticercosis Guía para profesionales de la salud. C. Larralde, De Aluja, A. S. México, D. F., Fondo de Cultura Económica: 41-80.
- Flisser, A., Viniegra, A. E., Aguilar, V. L., Garza, R. A., Maravilla, P., Ávila, G.** (2004). "Portrait of human tapeworms." Journal of Parasitology, **90**(4): 914-916.
- Flisser, A.** (2013). "State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica* " The Korean journal of parasitology, **51**(1): 43-49.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY Server. The Proteomics Protocols Handbook, J. M. Walker, Humana Press: 571-607.
- González, L. M., Montero, E., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E., Garate, T.** (2000). "Differential Diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* Infection by PCR." Journal of clinical microbiology, **38**(2): 737-744.
- Hancock, K., Pattabhi, S., Greene, R. M., Yushak, M. L., Williams, F., Khan, A., Priest, J. W., Levine, M. Z., Tsang V. C. W.** (2004). "Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis." Molecular & Biochemical Parasitology, **134**(2): 115-124.
- Harrison, L. S. J., Delgado, J., Parkhouse, R. M. E.** (1990). "Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* with DNA probes." Parasitology, **100**(3): 459-461.
- Henkle-Dührsen, K., Kampkötter, A.** (2001). "Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes." Molecular & Biochemical Parasitology, **114**(2): 129-142.
- Holmgren, A.** (1968). "Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B." European Journal of Biochemistry, **6**(4): 475-484.
- Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H., Brändén, C. I.** (1975). "Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin- S2 to 2.8 Å resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences, **72**(6): 2305-2309.
- Holmgren, A.** (1979). "Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide." Journal of Biological Chemistry, **254**(19): 9627-9632.
- Holmgren, A.** (1981). "Thioredoxin: structure and functions." Trends in Biochemical Sciences, **6**: 26-29.
- Holmgren, A.** (1989). "Thioredoxin and glutaredoxin systems." J Biol Chem, **264**(24): 13963-13966.

Holmgren, A. (1995). "Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide." Structure, **3**(3): 239-243.

Horton, J. (2000). Albendazol: A review of antihelminthic efficacy and safety in humans. Parasitology: Controlling intestinal helminths while eliminating lymphatic filariasis. L. S. Stephenson, Chappell, L. H., Holland, C. V., Ottesen, E. A, Cambridge University Press. **121**: S113-S132.

Kunchithapautham, K., Padmavathi, B., Narayanan, R. B., Kaliraj, P., Scott, A.L. (2013). "Thioredoxin from *Brugia malayi*: Defining a 16-kilodalton class of thioredoxins from nematodes." Infection and immunity, **71**(7): 4119-4126.

Kwatia, M. A., Botkin, D.J., Williams, D.L. (2000). "Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase." Journal of Parasitology, **86**(5): 908-915.

Lee, S., Kim, S. M., Lee, R.T. (2013). "Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance." Antioxidants & redox signaling, **18**(10): 1165-1207.

Levine, M. Z., Calderón S, J. C., Wilkins, P. P., Lane, W. S., Asara, J. M., Hancock, K., Gonzalez, A. E., Garcia, H. H., Gilman, R. H., Tsang, V. C. (2004). "Characterization, cloning, and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection." Journal of Parasitology, **90**(3): 631-638.

Mayta, H., Talley, A., Gilman, R. H., Jiménez, J., Verastegui, M., Ruiz, M., Garcia, H. H., Gonzalez, A. E. (2000). "Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR restriction." Journal of clinical microbiology, **38**(1): 133-137.

Mayta H, G. R., Prendergast E, Castillo JP, Tinoco Y. O, Garcia, H. H., Gonzalez, A. E., Sterling, C. R. (2008). "Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis." Journal of clinical microbiology, **46**(1): 286-289.

McGonigle, S., Dalton, J.P., James, E.R. (1998). "Peroxidoxins: a new antioxidant family." Parasitology Today, **14**(4): 139-145.

McManus, D. P., Ito, A. (2005). Application of molecular techniques for identification of the human *Taenia*. WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. K. D. Murrell. Paris, France, OIE (World Organisation for Animal Health),: 52-88.

Molina, L. J., Jiménez, L., Ochoa, S. A., Landa, A. (2006). "Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*." Journal of Parasitology, **92**(4): 796-802.

Montenegro, T. C., Miranda, E. A., Gilman, R. (1996). "Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*." Annals of tropical medicine and parasitology, **90**(2): 145-155.

Nunes, C. M., Dias, A. K. K., Dias, F. E. F., Aoki, S. M., de Paula, H. B., Lima, L. J. F., García, J. F. (2005). "*Taenia saginata*: differential diagnosis of human taeniasis by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay." Experimental parasitology, **110**(4): 412-415.

Oliveira, P. L., Oliveira, M. F. (2002). "Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites." FEBS Lett **525**, **525**(1): 3-6.

Otero, L., Bonilla, M., Protasio, A. V., Fernández, C., Gladyshev, V. N., Salinas, G. (2010). "Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths." BMC Genomics, **11**(1): 237.

Pan, S., Malcom, B. (2000). "Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3)" Biotechniques, **29**(6): 1234-1238.

Ren, X., Björnstedt, M., Shen, B., Ericson M. L., Holmgren, A. (1993). "Mutagenesis of structural half-cystine residues in human thioredoxin and effects on the regulation of activity by selenodiglutathione." Biochemistry, **32**(37): 9701-9708.

Rodríguez, H. R., Geysen, D., Benitez, O. W., Geerts, S., Brandt, J. (2002). "Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenia saginata* and an improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment. ." Journal of Parasitology, **88**(5): 1007-1011.

Ross, F., Hernández, P., Porcal, W., López, G. V., Cerecetto, H., González, M., Basika, T., Carmona, C., Fló, M., Maggioli, G., Bonilla, M., Gladyshev, V. N., Boiani, M., Salinas, G. (2012). "Identification of thioredoxin glutathione reductase inhibitors that kill cestode and trematode parasites." PLoS ONE, **7**(4): 1-12.

Sarti, E. (1997). "La teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*". Salud pública de México, **39**(3): 225-231.

Singh, S. M., Panda, A. K. (2005). "Solubilization and refolding proteins inclusion body proteins." Journal of Bioscience and Bioengineering, **99**(4): 303-310.

Smith, N. C., Bryant, C. (1986). "The role of host generated free radicals in helminth infections: *Nippostrongylus brasiliensis* and *Nematospiroides dubius* compared." Journal for Parasitology, **16**(6): 617-622.

Song, L., Li, J., Xie, S., Qian, C., Wang, J., Zhang, W., Yin, X., Hua, Z., Yu, C. (2012). "Thioredoxin glutathione reductase as a novel drug target: Evidence from *Schistosoma japonicum*." PLoS ONE, **7**(2): e31456.

Tanaka, R., Kosugi, K., Mizukami, M., Ishibashi, M., Tokunaga, H., Tokunaga, M. (2004). "Expression and purification of thioredoxin (TrxA) and thioredoxin reductase (TrxB) from *Brevibacillus choshinensis*." Protein expression and purification, **37**(2): 385-391.

Tay, Z., Gutiérrez, Q. M., Lara, A. R., Velasco, C. O. (2010). Parasitología médica, Méndez Editores.

Thelander, L., Reichard, P. (1979). "Reduction of ribonucleotides." Annual review of biochemistry, **48**(1): 133-158.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic acids research, **22**(22): 4673-4680.

Tsang, V. C., Brand, J. A., Boyer, A. E. (1989). "An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*)." Journal of Infectious Diseases, **159**(1): 50-59.

Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., Montfort, W. R. (1996). "Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer." Structure, **4**(6): 735-751.

WHO. (2011). Report of the WHO expert consultation on foodborne trematode infections and taeniasis/cysticercosis: 17-20.

Wilkins, P. P., Allan, J. C., Verastegui, M., Acosta, M., Eason, A. G., Garcia, H. H., Gonzalez A. E., Gilman, R. H., Tsang, V. C. (1999). "Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis." The American journal of tropical medicine and hygiene, **60**(2): 199-204.

Wilkins, P. P., Wilson, M., Allan, J. C., Tsang, V. C. W. (2002). *Taenia solium* cysticercosis: immunodiagnosis of neurocysticercosis and taeniasis. Taenia solium cysticercosis: From basic to clinical science. G. Singh, Prabhakar, S. London, UK., CABI: 329-.

Williams, D. L., Bonilla, M., Gladyshev, V. N., Salinas, G. (2013). "Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites." Antioxidants & redox signaling, **19**(7): 735-745.

Wollman, E. E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J. P., Wingfield, P., Grabern, P., Dessarps, F., Robin, P., Galibert, F., Bertoglio, J., Fradelizi, D. (1988). "Cloning and

expression of a cDNA for human thioredoxin." Journal of Biological Chemistry, **263**(30): 15506-15512.

Yang, X., Ma, K. (2010). "Characterization of a thioredoxin-thioredoxin reductase system from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." Journal of bacteriology, **192**(5): 1370-1376.

Yang, Z. J., Peng, Z. S., Wu, K., Wei, S. H. (2013). "Cloning and characterization of thioredoxin h in the three-pistil line of common wheat." Genetics and molecular research: GMR, **12**(3): 2688-2701.