



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LOS SISTEMAS DEPENDIENTES DE GLUTATIÓN Y TIORREDOXINA
EN EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO REDOX DEL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTÍNEZ GONZÁLEZ JOSÉ DE JESÚS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **MARTÍNEZ GONZÁLEZ JOSÉ DE JESÚS** con número de cuenta **99216580** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LOS SISTEMAS DEPENDIENTES DE GLUTATIÓN Y TIORREDOXINA EN EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO REDOX DEL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Secretario: DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
Suplente: DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO
Suplente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de diciembre de 2015

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

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

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

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo otorgado a los proyectos PAPIIT IN-207308-2 y IN-219414-25.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

Dr. Mina Konigsberg Fainstein

Dra. Irene Patricia del Arenal Mena

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre y mi padre; que sin importar que no conocían ni la meta ni el camino que seguiría, me ayudaron a comenzar el viaje y darme ánimos para salir adelante. El fruto de sus trabajo, esfuerzo, sacrificio y de su amor, está en cada uno de los humildes logros que he alcanzado.

A mis hermanos y a mi familia; porque a pesar del largo y penoso recorrido, siempre he podido contar con ustedes. Porque cada meta alcanzada y cada sueño cumplido se han cristalizado por el amor que les tengo.

A la Dra. Patricia del Arenal y al Dr. Alberto Guevara; que han sido lo mismo maestros y amigos, quienes me han ayudado y apoyado en todos los aspectos que es posible ayudar a alguien y que han creído en mi cuando ni yo mismo lo hice. Por enseñarme a que, a pesar de lo negro del horizonte, siempre hay una esperanza.

A mi comité tutorial, las doctoras Emma Saavedra y Mina Konigsberg, cuya guía y consejo me ayudó a llevar a buen término mi investigación y a crecer como profesionalista.

A mi comité sinodal, por sus atinadas observaciones que ayudaron a mejorar este escrito.

A la UNAM, por darnos a muchos la oportunidad de soñar y de trabajar por un país mejor.

A todos mis amigos; que aunque es imposible enumerarlos a todos, me han dado un espacio (inmerecido) en sus corazones y en sus vidas. No alcanzo a expresar en palabras lo importantes que son para mi.

A mis alumnos de licenciatura así como a todos aquellos que me han permitido compartirles lo poco que he aprendido en mi camino. Por ayudarme a descubrir la pasión por la docencia y que uno nunca deja de aprender.

A mis amigos de la Tuna del Centro Universitario Cultural. Que aunque los tiempos sean otros y cada quién tome su rumbo, podamos conservar la amistad y la lealtad a los colores negro y blanco. Por lo que fueron, los que son y los que serán...

PENSAMIENTOS

“...Cometí todos los errores
que cualquiera en su vida podría cometer;
tomé y tomé y tomé lo que me ofrecías,
pero nunca notaste que vivía en dolor.

Sabía lo que quería; fui y lo tomé.

Hice todas las cosas que dijiste que no
haría,
te dije que nunca me habrían de olvidar...
y todo a pesar de ti.

Y aún respiro, estoy respirando.
Estoy vivo...”

Alive (Fragmento), Sia.

“...A veces llega la lluvia,
para limpiar las heridas;
a veces solo una gota
puede vencer la sequía.

¿Y para qué llorar? Pa' qué.

Si duele una pena, se olvida.

¿Y para qué sufrir? Pa' qué.

Si así es la vida, hay que vivirla...”

Vivir mi vida (Fragmento) Mark Anthony.

“...Voy a probar que puedo hacer sin
limitar mi proceder,
ni mal ni bien ni obedecer...jamás.

Libre soy, libre soy.

El viento me abrazará.

Libre soy, libre soy.

No me verán llorar...

Firme así, me quedó aquí...

Firme así, a la luz del sol...”

Libre soy (Fragmento), Frozen

“...Libre de los obstáculos camino al éxito.

Libre de la necesidad de tener éxito e
impresionar.

Libre del dinero ganado exhaustivamente.

Libre de las lecciones que nos falta
aprender.

Yo sé quien eres.

Y te amo tal cual.

Libre de la sonrisa falsa que llevas.

Libre de la destrucción que no puedes
reparar.

Libre del arte que creas y deshechas.

Libre de las palabras encerradas en tu
boca...”

I know you (Fragmento) The passersby.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
Imagen. Vermes; Platodes; Cestodes.	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Los platelmintos.	4
1.2 Los céstodos.	5
1.3 Biología de <i>Taenia crassiceps</i> .	6
1.4 Relevancia del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> como modelo de estudio.	10
1.5 La homeostasis redox en los sistemas biológicos.	13
1.6 El sistema dependiente de glutatión.	17
1.7 El sistema dependiente de la tiorredoxina.	21
1.8 Diferencias entre los sistemas dependientes de glutatión y tiorredoxina.	27
1.9 El sistema de la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR).	28
1.10 Estrés oxidante asociado al parasitismo.	32
1.11 La TGR como blanco farmacológico.	35
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS GENERALES	38
4.1 Objetivos particulares del objetivo general I.	38
4.2 Objetivos particulares del objetivo general II.	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Reactivos.	41
5.2 Obtención del material biológico.	41
5.3 Mantenimiento y tratamiento de los cisticercos.	41
5.4 Determinación de la viabilidad de los cisticercos.	42
5.5 Determinación de la actividad de la gamma-glutamilcisteín sintetasa (GCS) en extractos crudos.	42
5.6 Determinación de la actividad de la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) en extractos crudos.	43
5.7 Efecto del AF en la viabilidad y en la actividad de la TGR del cisticerco de <i>T. solium</i> .	43
5.8 Determinación del pH citosólico en el cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	44
5.9 Obtención de extractos desproteinizados.	44
5.10 Reducción del glutatión acomplejado a proteínas.	45
5.11 Determinación de la cantidad de glutatión.	45

5.12 Cálculo para obtener la distribución global del glutatión en el cisticerco.	46
5.13 Cálculo del potencial redox del glutatión.	47
5.14 Detección de las especies reactivas de oxígeno producidas por el cisticerco.	47
5.15 Búsqueda de tioles de bajo peso molecular en extractos desproteinizados de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .	48
5.16 Efecto de los tioles de bajo peso molecular en el auranofín.	48
5.17 Evaluación de la reducción de GSSG por parte de los tioles de bajo peso molecular.	49
5.18 Presentación de los datos y análisis estadístico.	49
5.19 Búsqueda de homólogos de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) en los genomas de platelmintos parásitos.	49
5.20 Búsqueda de homólogos de la fitoquelatina sintasa (PCS) en los genomas de platelmintos parásitos.	50
5.21 Búsqueda de homólogos de los transportadores de glutatión en el genoma de <i>T. solium</i> .	50
5.22 Purificación de la tiorredoxina.	51
5.23 Secuenciación <i>de novo</i> de la tiorredoxina de <i>T. crassiceps</i> .	51
5.24 Ensayo de actividad de la tiorredoxina.	52
5.25 Obtención y alineamiento de secuencias de tiorredoxinas de platelmintos parásitos.	53
5.26 Modelado de la TcTrx y del complejo de interacción TcTrx-TGR.	53
6. RESULTADOS	54
6.1 Los cambios en el estado redox promueven un cambio en la distribución de las distintas especies de glutatión.	54
6.1.1 El NAC inhibe el efecto letal ocasionado por el AF en los cisticercos mientras que el BSO lo potencia.	54
6.1.2 El NAC atenúa el efecto inhibitorio del AF sobre la TGR mientras que el BSO lo potencia.	56
6.1.3 El BSO potencia la disminución de la concentración interna del glutatión ocasionado por el AF mientras que el NAC lo mantiene en condiciones basales.	58
6.1.4 El BSO promueve el aumento en la producción de ERO ocasionado por el AF mientras que el NAC mantiene la producción en niveles fisiológicos.	60
6.1.5 El AF promueve el incremento de las formas oxidadas del glutatión.	62
6.1.6 El AF disminuye la relación [GSH]/[GSSG] y genera un ambiente redox más oxidante al interior del cisticerco.	64

6.1.7 El AF disminuye los equivalentes de glutatión internos y ocasiona la redistribución sus distintas formas.	67
6.1.8 El AF incrementa la tasa de expulsión del glutatión oxidado y promueve la síntesis de novo de glutatión.	68
6.1.9 Los genomas de los platelmintos parásitos revelan nuevos elementos para entender el metabolismo del glutatión.	70
6.2 La interacción entre la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) esta conservada en platelmintos.	75
6.2.1 Secuenciación y caracterización de la Trx de <i>T. crassiceps</i> .	75
6.2.2 La TGR de <i>T. crassiceps</i> puede discriminar entre tiorredoxinas de origen eucarionte y procarionte.	77
6.2.3 La región de interacción TcTrx-TGR presenta complementareidad estructural y de cargas.	78
7. DISCUSIÓN	82
7.1 Avances en el conocimiento de la importancia del metabolismo del glutatión en los platelmintos parásitos.	82
7.2 Avances en el análisis de la estructura de la tiorredoxina de platelmintos parásitos y su interacción con la TGR.	85
7.3 La diferencia entre la arquitectura redox entre parásitos y hospederos es de interés farmacológico.	88
8. CONCLUSIONES	90
9. LITERATURA CITADA	92
10. ANEXO (ARTÍCULO REQUISITO)	111
10.1 Sobretiro del artículo "Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in <i>Taenia crassiceps</i> cysticerci."	112

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2-VP	2-vinilpiridina
AA	ácido ascórbico
AF	auranofin
AT-M	viabilidad azul tripano – movimiento
BSO	butionina sulfoximina
CAT	catalasa
DMSO	dimetilsulfóxido
DTNB	5',5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzónico)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamintetraacético (en inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ERN (RNS)	especie(s) reactiva(s) derivadas del nitrógeno (del inglés <i>reactive nitrogen species</i>)
ERO (ROS)	especie(s) reactiva(s) derivadas del oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
DCF-DA	diclorodihidrofluoresceína diacetato
FAD	flavina adenina dinucleótido
<i>g</i>	fuerza centrífuga relativa
GGT	gamma-glutamil transpeptidasa
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
Grx –(S ₂)	glutarredoxina (forma oxidada)
Grx –(SH) ₂	glutarredoxina (forma reducida)
GSH	glutación (forma reducida)
GSSG	disulfuro de glutación (forma oxidada)
GST	glutación S-transferasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
HO ⁻	ión hidroxilo

HO [•]	radical hidroxilo
IC ₅₀	constante de inhibición media
NADP ⁺	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
•NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
NAC	N-acetil cisteína
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
ONOO ⁻	peroxinitrito
PBS	solución amortiguadora de fosfato salina (del inglés <i>phosphate buffer saline</i>)
PCA	ácido perclórico
PCS	fitoquelatina sintetasa
PDB	coordenadas de los átomos de una proteína depositadas en el Protein Data Bank, que pueden ser interpretados como una estructura tridimensional
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PSH	tiol protéico reducido
PSSG	tiol protéico glutacionilado
Prx	peroxirredoxina
redox	reducido / oxidado
Sec , U	selenocisteína
SOD	superóxido dismutasa
TGR	tiorredoxina glutatión reductasa
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato

TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
Trx -S ₂	tiorredoxina (forma oxidada)
Trx -(SH) ₂	tiorredoxina (forma reducida)
TrxP	tiorredoxina peroxidasa
TrxR	tiorredoxina reductasa

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Pag.
Figura A. Diversidad de platelmintos.	5
Figura B. Estructura y ultraestructura de <i>Taenia crassiceps</i> .	8
Figura C. Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> .	9
Figura D. Mecanismo de generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.	13
Figura E. Producción de las ERO por diversos procesos celulares.	14
Figura F. La homeostasis redox es un mecanismo en estado estacionario.	15
Figura G. Los mecanismos antioxidantes actúan a diferentes niveles.	16
Figura H. El sistema dependiente de glutatión.	21
Figura I. El sistema dependiente de tiorredoxina.	24
Figura J. Estructura de las reductasas de glutatión y tiorredoxina.	26
Figura K. Mecanismo propuesto para la reducción del glutatión y la tiorredoxina por la TGR.	31
Figura L. Mecanismo generalizado del sistema antioxidante en organismos parásitos.	32
Figura M. Diferencia entre la arquitectura de los sistemas redox de vertebrados y platelmintos parásitos.	34
Figura 1. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la viabilidad del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> .	55
Figura 2. Efecto del AF en la viabilidad del cisticerco de <i>T. solium</i> .	56
Figura 3. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la actividad de la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	57
Figura 4. Los tioles de bajo peso molecular son incapaces de quelar al AF.	58
Figura 5. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en el contenido de equivalentes de glutatión internos en el cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	59
Figura 6. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	60
Figura 7. El NAC y la cisteína tienen la capacidad de reducir directamente al GSSG.	61
Figura 8. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la aparición de las formas oxidadas de glutatión en el cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	63
Figura 9. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en el estado redox del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	65
Figura 10. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la distribución interna de las especies de glutatión en el cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	68
Figura 11. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la distribución global de las especies de glutatión en el cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	69
Figura 12. Perfil cromatográfico de los principales tioles de bajo peso molecular del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	73

Figura 13. Análisis electroforético de los distintos pasos de purificación de la Trx del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	75
Figura 14. Alineamiento de las secuencias de tiorredoxinas de diferentes platelmintos.	77
Figura 15. Modelo de la estructura tridimensional de la tiorredoxina del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	79
Figura 16. Potencial electrostático de superficie de la Trx y la TGR.	80
Figura 17. Modelo de interacción Trx-TGR.	81
Figura 18. Esquema propuesto del metabolismo de glutatión en platelmintos parásitos	83
Cuadro A. Inhibidores de la TGR.	35
Cuadro 1. γ - glutamil transpeptidasa en platelmintos parásitos.	71
Cuadro 2. Fitoquelatina sintasa en platelmintos parásitos.	72
Cuadro 3. Proteínas exportadoras de glutatión en <i>T. solium</i> .	74
Cuadro 4. Secuencias de los extremos amino y carboxilo terminal y fragmentos LC/MS/MS obtenidos de la Trx del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .	76
Cuadro 5. Parámetros cinéticos de la TGR de <i>T. crassiceps</i> en presencia de tiorredoxinas de distinto origen.	78

RESUMEN

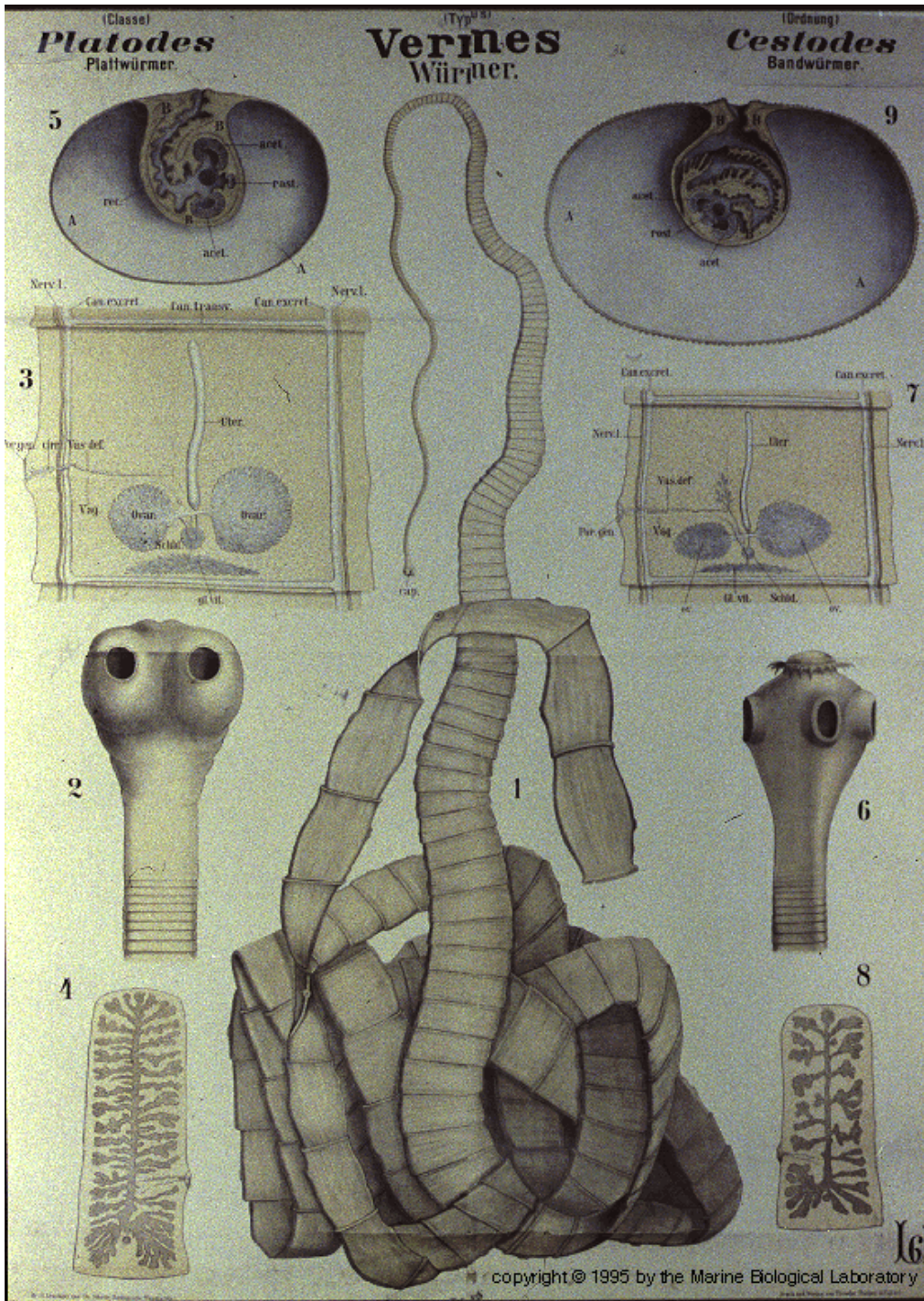
Anteriormente, hemos estudiado el efecto del compuesto derivado de oro auranofín (AF) sobre la actividad de la enzima tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) y la viabilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps*. Se demostró que se necesitan concentraciones micromolares de AF para inhibir *in vivo* a la TGR y matar a los parásitos. En este trabajo, se analizaron los cambios en la distribución de la poza en glutatión de los cisticercos después de la adición de AF, observando una disminución dosis-dependiente de la concentración interna de glutatión, concomitante con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Estos cambios fueron simultáneos al aumento en la formación de complejos proteína-glutatión y la exportación de disulfuro de glutatión (GSSG) al medio de cultivo. La incubación de cisticercos en presencia de AF y N-acetil cisteína (NAC) de manera simultánea evita los cambios antes descritos, manteniendo la viabilidad de los cisticercos. Por el contrario, la presencia tanto de AF y butionina sulfoximina (BSO) dieron lugar a una potenciación de los efectos del AF, lo que repercute en la viabilidad de los cisticercos. Estos resultados sugieren que el efecto letal de AF en los cisticercos de *T. crassiceps*, observado en concentraciones micromolares, puede explicarse como consecuencia de los grandes cambios que ocurren en la distribución de las distintas formas moleculares de glutatión, lo que se traduce en un aumento significativo en el estrés oxidante de los parásitos.

Además se evaluó la reducción diferencial de la TGR nativa por diferentes tiorredoxinas, así como su estructura-3D Trx. Hemos demostrado que los residuos Cys²⁸ y Cys⁶⁵ son conservados en las tiorredoxinas de cestodos previamente secuenciados. Los parámetros cinéticos que se obtuvieron para la TGR con su tiorredoxina endógena fueron: una Km de 3.1 μM , una kcat de 10 s⁻¹ y una eficiencia catalítica de $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ por lo que sugerimos que el parche negativo alrededor de la hélice $\alpha 3$ de la Trx está implicado en la interacción con TGR, en la especificidad y eficiencia catalítica variable de esta reductasa hacia tiorredoxinas de diferentes orígenes.

ABSTRACT

Previously we have studied the effect of the gold-compound auranofin (AF) on both thioredoxin-glutathione reductase (TGR) activity and viability of *Taenia crassiceps* cysticerci. It was demonstrated that micromolar concentrations of AF were high enough to fully inhibit TGR and kill the parasites. In this work, the changes in the glutathione pool of *T. crassiceps* cysticerci following the addition of AF, was analyzed. A dose-dependent decrease in the internal glutathione concentration, concomitant with an increase in ROS production was observed. These changes were simultaneous with the formation of glutathione-protein complexes and the export of glutathione disulfide (GSSG) to the culture medium. Cysticerci incubation in the presence of both AF and N-acetyl cysteine (NAC) prevents all the above changes, maintaining cysticerci viability. By contrast, the presence of both AF and buthionine sulfoximine (BSO) resulted in a potentiation of the effects of the gold compound, jeopardizing cysticerci viability. These results suggest that the lethal effect of AF on *T. crassiceps* cysticerci, observed at micromolar concentrations, can be explained as a consequence of major changes in the glutathione status, which results in a significant increase in the oxidative stress of the parasites.

In addition, we evaluated the native TGR differential reduction with different thioredoxins and we analyzed the Trx 3D-structure. We showed that cysticerci thioredoxin contains conserved Cys²⁸ and Cys⁶⁵ residues in previously sequenced cestode thioredoxins. The following kinetic parameters were obtained for the substrate of TGR: a Km of 3.1 μ M, a kcat of 10s⁻¹ and a catalytic efficiency of 3.2 $\times 10^6$ M⁻¹s⁻¹. The negative patch around the α 3-helix of Trx might be involved in the interaction with TGR suggesting a variable specificity and catalytic efficiency of the reductase toward thioredoxins of different origins.



Leuckart Chart.1882. Series I, Chart 15: Vermes; Platodes; Cestodes; Taenia saginata, T solium. Leuckat Chart Collection. Marine Biological Laboratory Archives. 1995

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los platelmintos.

El phylum *Platyhelminthes* agrupa a más de 18,500 especies distribuidas en cuatro clases de organismos: la clase Turbellaria, compuesta por organismos de vida libre y las clases Trematoda, Monogenea y Cestoda; constituidas por organismos parásitos [1]. Los platelmintos se caracterizan por ser organismos acelomados, triploblásticos, con simetría bilateral y aplanados dorsoventralmente. La capa mesodérmica de origen embrionario forma un conjunto no homogéneo de células denominado parénquima. Este tejido ocupa el espacio entre la pared corporal externa y el endodermo del tubo digestivo ciego (en caso de existir) y en él se encuentran embebidos los órganos internos como el aparato reproductor o las fibras musculares [2].

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

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

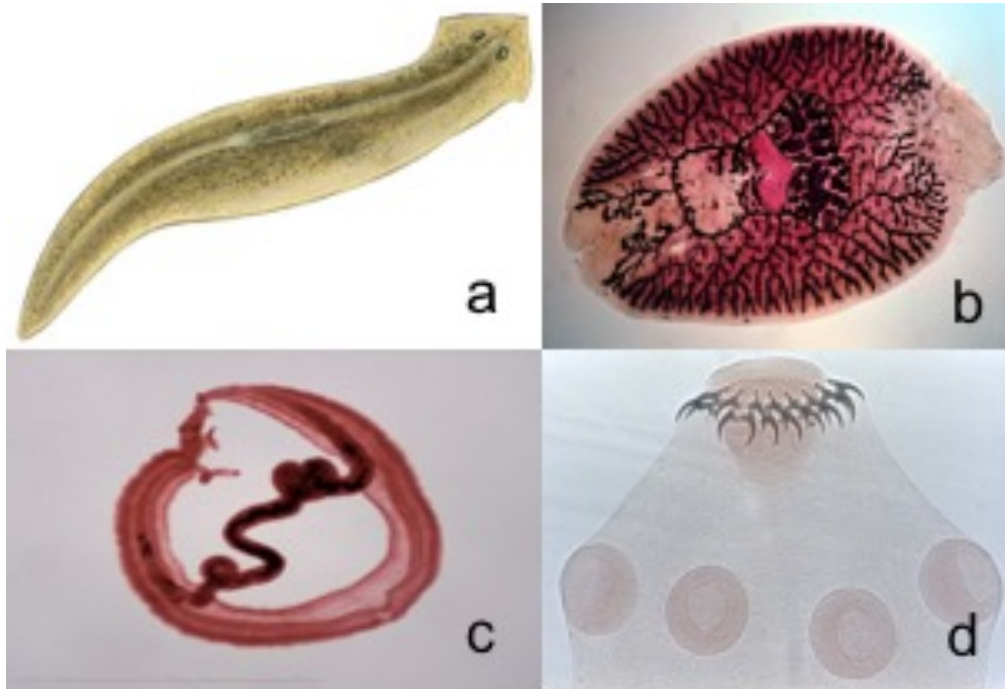


Figura A. Diversidad de platelmintos. En la figura se muestra un tuberculario (*Planaria agilis*) (a), un monogéneo (b), un tremátodo (*Schistosoma mansoni*, macho y hembra) (c) y un céstodo (Detalle del extremo anterior de *Taenia solium*). Fuente de las imágenes: Internet.

1.2 Los céstodos.

Esta clase incluye organismos endoparásitos los cuales tienen por hospederos, en la mayoría de los casos, a organismos vertebrados. En estos organismos (al igual que los demás organismos de vida parasitaria del phylum), la epidermis ciliada característica de los organismos de vida libre (turbelarios) está reemplazada por un tegumento que es un sincicio formado por las extensiones citoplásmicas de células del parénquima. En la base del tegumento se encuentra una membrana basal que lo delimita del parénquima celular. La superficie externa del tegumento presenta proyecciones citoplásmicas llamadas microtricas (tipo borde de cepillo) que son un aumento en la superficie celular que hacen eficiente la obtención de nutrientes mediante ósmosis y pinocitosis [3,4]. El parénquima puede variar de células mesenquimatosas empaçadas densamente hasta redes sinciciales y fibrosas con espacios llenos de fluido [2].

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

1.3 Biología de *Taenia crassiceps*.

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

La clasificación de *T. crassiceps*, según Pechenick [1], es la siguiente:

División: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia*

Especie: *Taenia crassiceps*

El estado adulto (tenia) es alargado, adaptado al aparato digestivo del hospedero vertebrado. El cuerpo está dividido en zonas claramente diferenciadas: i) un escólex que es un órgano de fijación que presenta estructuras como ganchos y ventosas (Figura Ba). Inmediatamente del escólex se localiza una pequeña región diferenciada denominada ii) cuello, la cual es una zona germinativa que da origen a un segmento alargado denominado iii) estróbilo, compuesto por proglótidos individuales. Cada proglótido está provisto de aparatos reproductores masculinos y femeninos; existen proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, en función de su madurez sexual [2] (Figura Bb y Bc).

La forma larvaria o cisticerco (también denominada metacéstodo) es una vesícula ovoide, llena de un fluido opalescente y en algunas cepas contiene un escólex invaginado identificable (Figura Bd). La vesícula consiste en una región interna (parénquima celular) y en una región externa (tegumento) similares a las descritas anteriormente. El tegumento tiene un rol protector y también sirve para absorber nutrientes (Figura Be). Entre la parte interna (la cual esta claramente delimitada de la parte externa mediante una lámina basal) hay fibras musculares, células en flama, corpúsculos calcáreos, una red neural sencilla y un grupo de células germinales no diferenciadas, entre otros constituyentes. Cualquier cambio en la presión osmótica causa la evaginación del escólex [5]

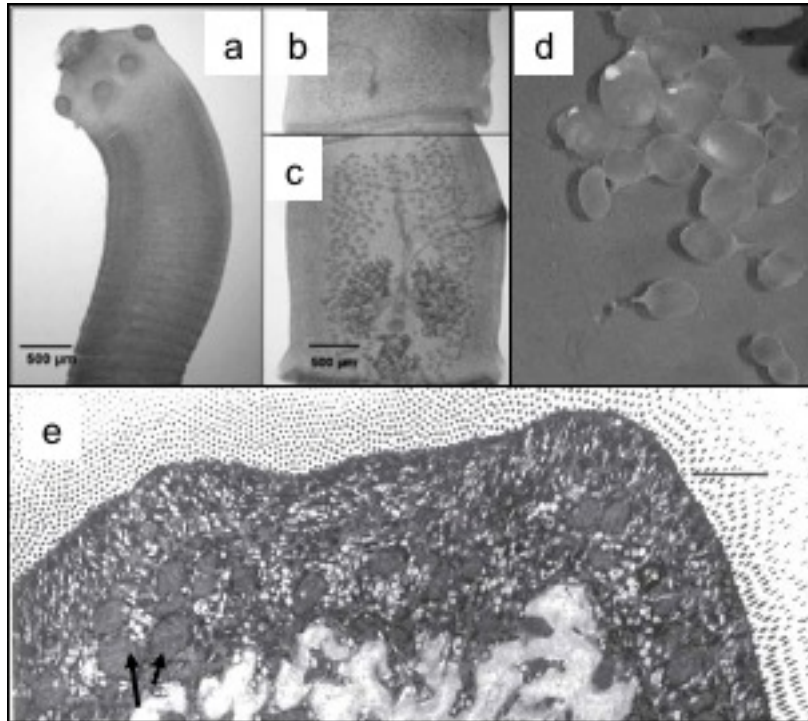


Figura B. Estructura y ultraestructura de *T. crassiceps*. En la imagen se puede apreciar la forma adulta tenia (a-c) y la forma larval cisticerco (d y e). En la forma tenia podemos distinguir el escólex y el cuello (a) así como proglótidos maduros (b) y grávidos (c). En el caso de la forma cisticerco se observa su forma vesicular (d). En (e) se muestra un corte transversal de un cisticerco. Las flechas indican numerosas mitocondrias en la capa más superficial del tegumento (a-c) Fueron tomados de [6], (d) fue tomado de [7] y (e) fue tomado de [8].

El ciclo de vida del céstodo *T. crassiceps* (Figura C) incluye la maduración y posterior expulsión de proglótidos grávidos (Figura Bc) a través de las heces del hospedero definitivo. Los huevos fértiles se liberan al medio al desintegrarse el proglótido. Durante este tiempo, en cada cigoto se desarrolla a un estadio denominado oncósfera, rodeada por una cubierta resistente llamada embrióforo, la cual permite al embrión permanecer en el medio hasta por dos o tres meses. Usualmente seis pequeños ganchos son evidentes en el embrión; debido a esto la oncósfera también es conocida como hexacanto. Si naturalmente un roedor pequeño ingiere los huevos, la oncósfera es liberada de su cubierta y se fija a la pared del tracto digestivo del hospedero. Posteriormente atraviesa la pared intestinal y migra al peritoneo (o a otros órganos o tejidos) para ahí desarrollarse en

la forma larvaria denominada *cisticerco* (Figura Bd). En el caso del modelo experimental de cisticercosis de *T. crassiceps*, los cisticercos se inoculan directamente en el peritoneo del ratón, por lo que pueden reproducirse asexualmente por gemación, limitados sólo por su capacidad infectiva y por el espacio físico; además de múltiples factores como son la carga genética, sexo y la madurez del sistema inmune del hospedero, entre otros [6]. Cada cisticerco puede contener un escólex desarrollado invaginado, aunque se ha observado la pérdida de esta estructura en cepas aneuplóides de *Taenia* spp. [9]. Finalmente, si el hospedero intermediario es ingerido por el hospedero definitivo [10], el escólex (Figura Ba) evagina para anclarse al intestino del hospedero definitivo, donde la forma adulta ó *tenia* puede crecer, madurar y producir proglótidos grávidos completando el ciclo del parásito [11].

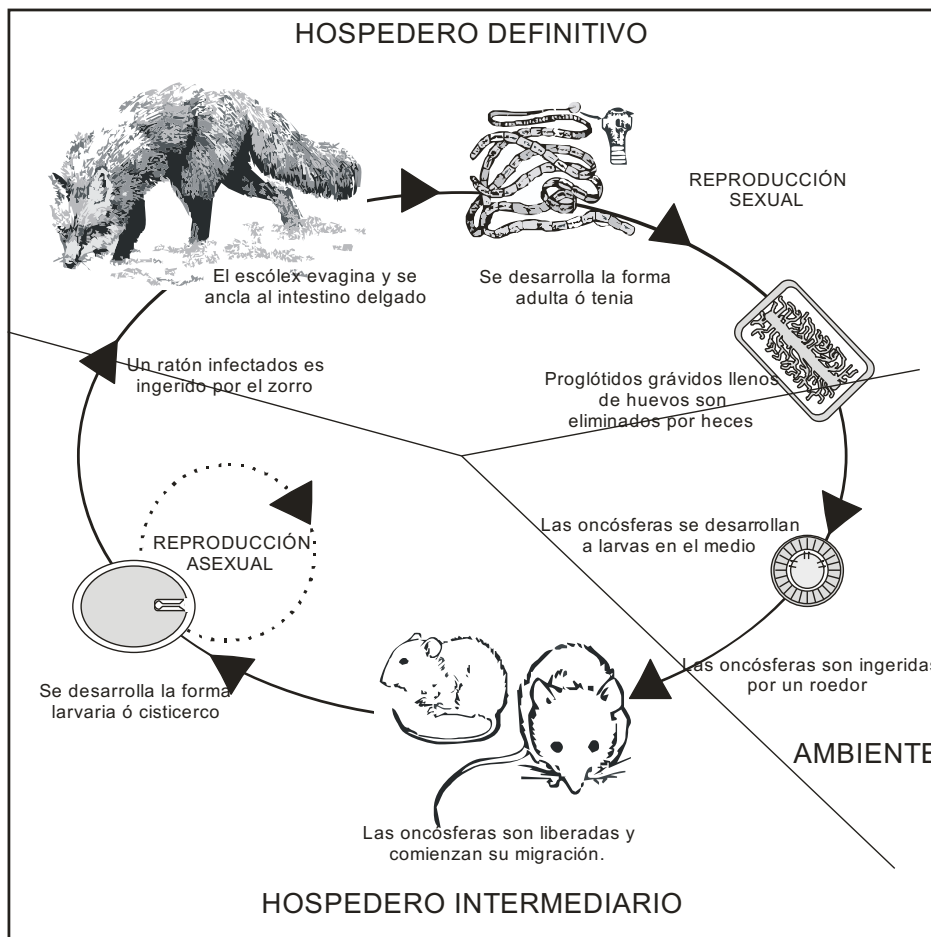


Figura C. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

1.4 Relevancia del cisticerco de *T. crassiceps* como modelo de estudio.

En la actualidad, hay 42 especies del género *Taenia* reconocidas ampliamente en mustélidos, vivéridos, felinos, cánidos y humanos hospederos [12]. Los hospederos intermediarios son conservados evolutivamente y la reproducción asexual en cisticercos es relativamente rara, ocurriendo en solo 10 especies de la familia *Taeniidae*, entre las que se incluye a *T. crassiceps* [13].

Los cisticercos del género *Taenia* han sido ampliamente estudiados debido a su importancia en medicina y veterinaria. Las parasitosis causadas por la forma adulta de éste grupo de parásitos se denomina **teniasis** mientras que las parasitosis ocasionada por su forma larvaria se le conoce como **cisticercosis**.

T. solium es el principal agente causal de la teniasis-cisticercosis en el humano [14]. Dichas zoonosis prevalecen de manera importante en países en desarrollo asociada principalmente a regiones pobres donde se consume carne de cerdo (hospedero intermediario) y en donde las condiciones de marginación propician la transmisión de la enfermedades. [15]

En este sentido es importante señalar que mientras la teniasis esta asociada con síntomas gastrointestinales inespecíficos y es fácilmente erradicable, la cisticercosis sigue siendo un problema de salud pública en México [16] y en otros países en vías de desarrollo [17].

Tras la ingestión de huevos de *T. solium* por vía fecal-oral, los embriones cruzan la mucosa intestinal y llegan al sistema circulatorio, distribuyéndose de manera sistémica. Una vez establecido, se desarrolla a su forma cisticerco, con una morfología particular al lugar donde se localiza [18]. En este punto, el cisticerco puede sobrevivir por un lapso de meses a años gracias a mecanismos de evasión inmune activa [19].

Se ha observado que el cisticerco en su forma vesicular sobrevive por mayor tiempo en lugares inmunológicamente protegidos, como el sistema nervioso o el globo ocular [18,20]. Sin embargo, en algún momento de la evolución de la infección, el sistema inmune logra detectar al parásito, lo que desencadena un proceso inflamatorio que tiene por objetivo acabar con dicho organismo. En casos graves, la inflamación inducida puede ocasionar la pérdida de la visión (en el caso de la cisticercosis ocular) [21] ó un abanico de patologías neuronales como cefaleas crónicas, epilepsia y muerte, en el caso de la neurocisticercosis [22, 23]. Al respecto, el Instituto Nacional de Neurología y Neurociencia “Manuel Velasco Suárez” reporta a la neurocisticercosis como una de las principales causas de epilepsia en México [24].

Debido a la importancia de la cisticercosis, el establecimiento de modelos experimentales como el de la cisticercosis por inoculación intraperitoneal con el cisticerco de *T. crassiceps*, ha sido un referente para el estudio de la forma larval de *T. solium* que no sólo ha ayudado a la descripción de importantes características ultraestructurales, biológicas y de la interface hospedero-parásito [25], sino también ha permitido el análisis de su metabolismo y su respuesta ante fármacos antiparasitarios así como su interacción con el sistema inmune [26].

Al respecto, el cisticerco de *T. crassiceps* ofrece diversas ventajas como modelo de estudio [27]:

- a) A diferencia del cisticerco de *T. solium*, el cisticerco de *T. crassiceps* puede reproducirse asexualmente en el peritoneo del ratón, lo que permite la obtención de grandes cantidades de material biológico en relativamente poco tiempo en forma segura y controlada.
- b) El hombre no es susceptible a la parasitosis ocasionada por *T. crassiceps*.
- c) Existe una gran cercanía evolutiva entre *T. solium* y *T. crassiceps* [28], lo que permite evaluar en forma directa en *T. solium* los resultados obtenidos en *T. crassiceps*.

- d) La cisticercosis experimental en ratón permite tener un modelo de estudio de la cisticercosis humana [29].

En este trabajo, proponemos a *T. crassiceps* como modelo para el estudio de los mecanismos de defensa antioxidante en los platelmintos parásitos en lo general y en el género *Taenia* en particular, debido a que estos organismos no sólo están sujetos a oxidantes endógenos, sino también están bajo un continuo estrés oxidante por parte de las células de su hospedero [30] por lo que el estudio de los mecanismos antioxidantes se vuelve relevante en el diseño de fármacos contra las parasitosis ocasionadas por este grupo de organismos.

1.5 La homeostasis redox en los sistemas biológicos.

El término especie reactiva de oxígeno (ERO) es un término colectivo que describe a las especies químicas que son formadas de la reducción incompleta del oxígeno e incluyen a los radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), peróxido (RO_2^{\cdot}) y alcoxilo (RO^{\cdot}), así como las especies no radicales derivadas del oxígeno como por ejemplo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno en singulete (1O_2) [31] (Figura D).

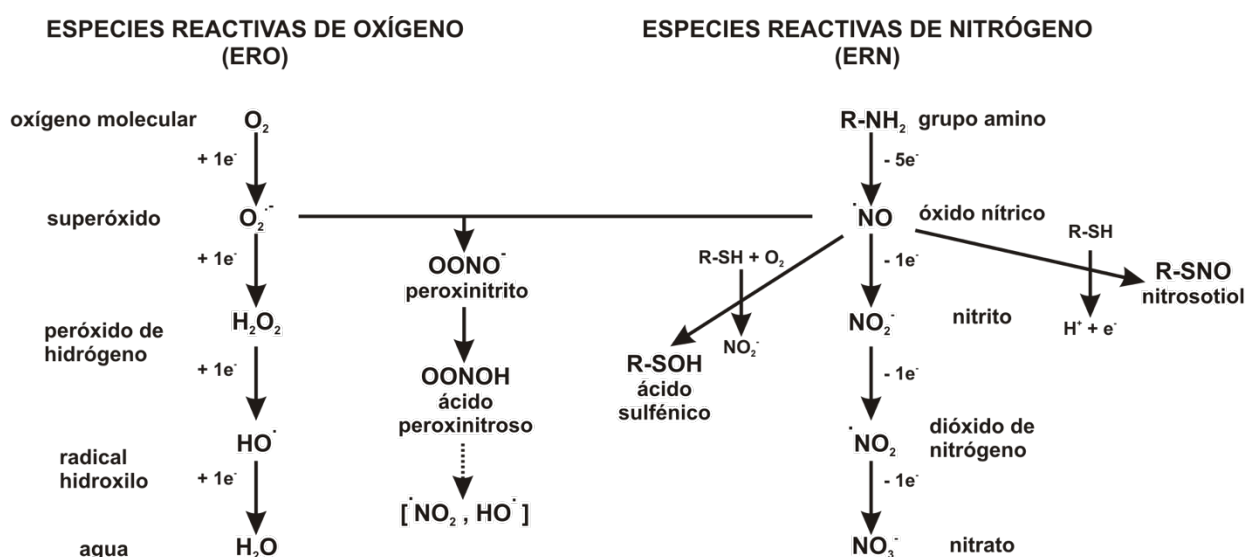


Figura D. Mecanismos de generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

De manera similar, el término especie reactivas de nitrógeno (ERN), engloba a las especies químicas derivadas del nitrógeno como son el radical óxido nítrico (ON^{\cdot}), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2) entre otros [32].

Las ERO (así como las ERN) son una consecuencia de la vida en condiciones aerobias pues ambas son productos del metabolismo celular normal [33] (Figura E) y han sido reconocidas por jugar un papel dual, ya que pueden ser dañinas o benéficas para los sistemas vivos en función de la concentración en la que se encuentran [34]:

- El efecto dañino de las ERO y ERN ocurre por un fenómeno denominado estrés oxidante. Esto ocurre en sistemas biológicos donde hay una sobreproducción de ERO/ERN ó un deficiente sistema de depuración de las mismas.
- Los efectos benéficos de ERO y ERN ocurren a bajas o moderadas concentraciones y participan en diversos procesos fisiológicos como la diferenciación celular, la defensa contra agentes patógenos y en múltiples mecanismos de señalización celular [35, 36].

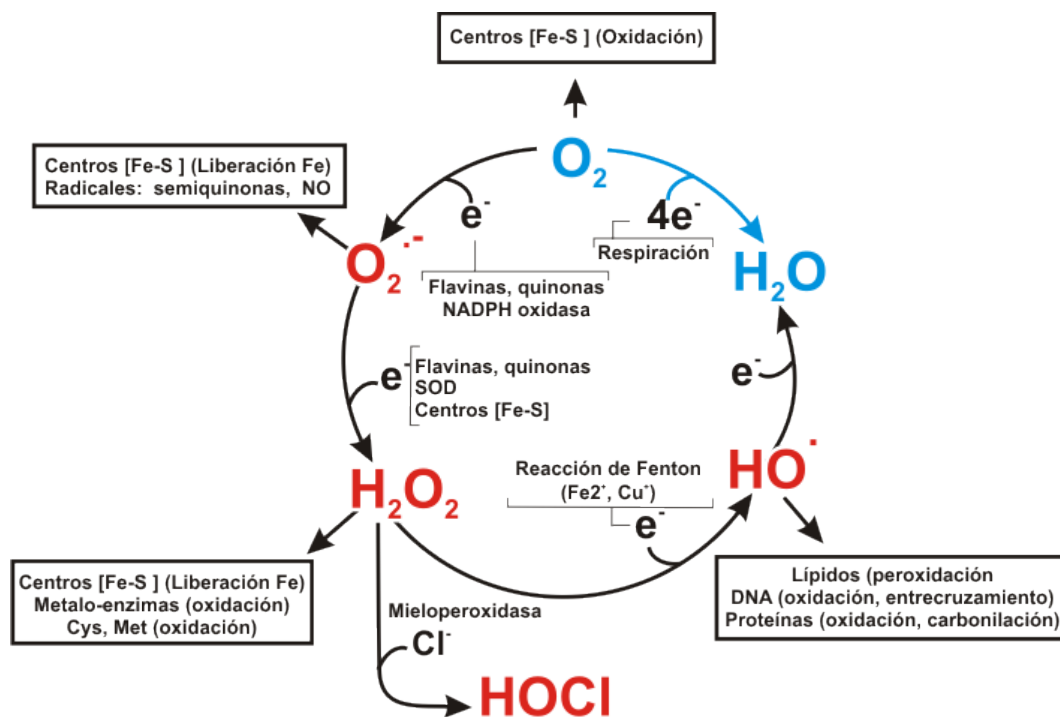


Figura E. Producción de las ERO por diversos procesos celulares. Modificado de [37]

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

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

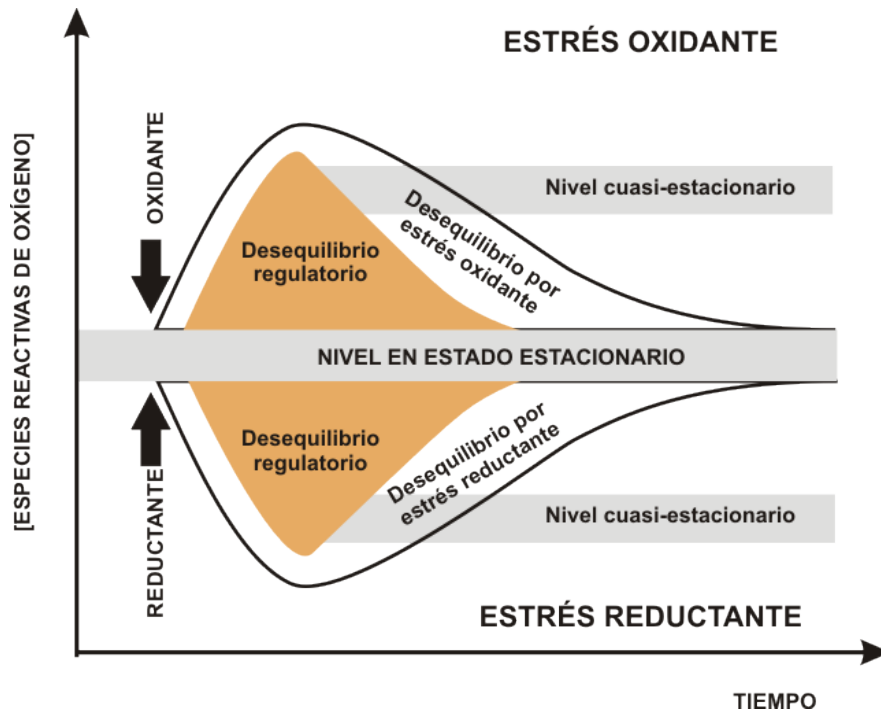


Figura F. La homeostasis redox es un mecanismo en estado estacionario. a) equilibrio entre producción y depuración. Modificado de [33].

De acuerdo a esto, Drogüe [38] expone que la homeostasis redox se logra, en principio, mediante un balance entre la tasa de producción de especies reactivas y la tasa de eliminación de éstas, por medio de los diversos mecanismos antioxidantes que posee el organismo (Figura G). Una sobre-exposición ó sobreproducción de dichos compuestos (por ejemplo, el peróxido de hidrógeno o el óxido nítrico), pueden desencadenar diversos eventos que tienen por finalidad inducir una respuesta protectora contra el posible daño ocasionado y tratar de recuperar su estado redox fisiológico. Dicha respuesta puede consistir en aumentar la eficiencia de sus mecanismos de defensas antioxidantes, tanto enzimáticos como no-enzimáticos. Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen, entre otras, a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa

(CAT) y peroxirredoxinas (Prx) [38, 39]. Los antioxidantes no enzimáticos están representados por el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (predominantemente en forma de vitamina E), el glutatión, carotenoides y flavonoides; entre otros [39]. Bajo condiciones normales, hay un balance entre su actividad detoxificante y los niveles intracelulares de estos antioxidantes. Este balance es esencial para la sobrevivencia de los organismos y su salud.

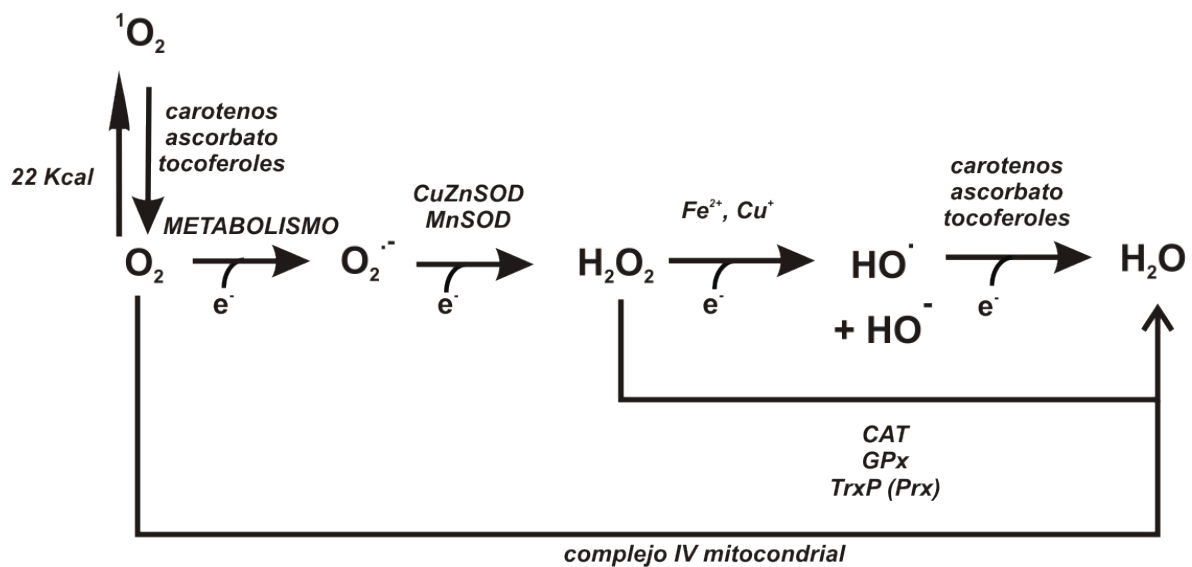


Figura G. Los sistemas antioxidantes actúan a diferentes niveles.

El estado redox de una célula se mantiene dentro de un rango estrecho de forma similar a la manera en como un sistema biológico regula su pH. Bajo condiciones patológicas el estado redox puede ser alterado a valores inferiores o superiores. Es importante señalar que el estado redox es particular al tipo celular y en estrecha relación con la función que ésta lleve a cabo [34].

Adicionalmente a los sistemas antioxidantes antes mencionados, los sistemas antioxidantes enzimáticos dependientes de glutatión (GSH) y de tiorredoxina (Trx) constituyen los principales sistemas redox en la célula [40].

Ambos sistemas tienen componentes similares: un sustrato (GSH ó Trx – [SH]₂) que transfiere sus electrones a su respectiva peroxidasa (GPx ó TPx) para llevar la detoxificación de peróxidos y una reductasa (GR o TrxR) encargada de regenerar al sustrato a su forma reducida. Sin embargo, a pesar de que ambos sistemas trabajan de forma paralela [41], no son redundantes en cuanto a sus funciones [42] por lo que es importante ahondar en cada uno de ellos.

1.6 El sistema dependiente de glutatión.

El sistema dependiente del glutatión comprende a las enzimas glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx) además del tripéptido glutatión (GSH) y la proteína glutarredoxina (Grx) [43] (Figura H):

- *Glutatión.* El **glutatión** (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina (Figura Ha), con una masa molecular de aproximadamente 307 Da [44]. Contiene un enlace peptídico poco común γ entre el glutamato y la cisteína lo que previene que sea hidrolizado por la mayoría de las peptidasas [45]. El glutatión no es fácilmente oxidado a diferencia de sus precursores, la cisteína y la γ -glutamilcisteína.

El glutatión ha sido encontrado en diversos compartimientos celulares como el citosol, el retículo endoplásmico, las vacuolas y las mitocondrias, entre otros [39]. Algunas de sus funciones celulares son:

- a) El mantenimiento del estado redox del citosol y de los diversos compartimientos celulares [46], así como de tioles protéicos y de otras moléculas de bajo peso molecular (como por ejemplo el ácido ascórbico) [39].
- b) Ser fuente de intermediarios (cisteína, glutamato, cisteín-glicina y glutamil-cisteína) al hidrolizarse [47].

- c) Participar en la formación de deoxirribonucleótidos al donar sus equivalentes reductores a la ribonucleótido reductasa a través de la glutarredoxina [48].
- d) Participar en la depuración de compuestos xenobióticos al reaccionar enzimáticamente a través de la superfamilia de las enzimas glutatión-S-transferasas (GST) [49], ó de manera no enzimática, para aumentar la solubilidad de dichos compuestos [50].
- e) Reestablecer la conformación nativa de proteínas afectadas durante el estrés oxidante a través de las glutarredoxinas [51].
- f) Participar en mecanismos de señalización celular a través de la regulación y modulación de la actividad de diversas proteínas, enzimas y factores de transcripción, mediante su unión covalente reversible (glutathionilación) [52].

El glutatión puede existir en su forma reducida ó tior (GSH) y en su forma oxidada ó disulfuro (GSSG) (Figura Ha). En condiciones normales, la relación entre las concentraciones de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en citosol es aproximadamente de 100: 1 en mamíferos [50]. Dicha relación es un indicador importante del ambiente redox y el principal determinante del potencial redox celular [53]. Dicho potencial está en función del estadio celular y cambia ligeramente durante la progresión celular hacia la proliferación, la diferenciación celular y la apoptosis. En dichos procesos celulares existe una progresión natural hacia un estado más oxidado, por lo que la relación GSH / GSSG cambia [54].

En la mayoría de los organismos, el glutatión (GSH) es el principal tior de bajo peso molecular más abundante (0.2-10 mM) [51]. Sin embargo, se conocen algunos grupos de organismos que no sintetizan glutatión. Estos organismos ocupan diversos tioles para sustituirlo; en el caso de algunos prozoarios como las amebas se ha observado que la cisteína libre (Cys-SH) es el principal tior de bajo peso molecular [55], mientras que en el caso de algunas bacterias se ha observado la presencia de otros tioles como el micotior (MSH) en *Mycobacterium tuberculosis* [56] o el bacilitior (BSH) en bacterias del género *Bacillus* y *Staphylococcus aureus* [57]. Un caso aparte es el grupo de los tripanosomatídeos (por ejemplo *Trypanosoma*

cruzi), en donde se ha observado que a pesar de sintetizar glutatión, las funciones redox las lleva a cabo el tripanotión (TrySH), el cual es una molécula derivada del glutatión [58] y que ha sido propuesto como blanco farmacológico [59].

- *Glutatión Peroxidasa (GPx)*. La **glutatión peroxidasa** (E.C. 1.11.1.9 GSH : H₂O₂ oxidorreductasa) fue la primera selenoproteína (proteína con un residuo de selenocisteína incorporado naturalmente durante la traducción) específica de mamífero que fue identificada y se le conoce actualmente como GPx-1 [60]. Actualmente se sabe que esta familia está constituida por ocho isoenzimas en humanos, de las cuales sólo las GPx-5, GPx-7 y GPx-8 no son selenoenzimas, por lo que éstas últimas no son inhibidas por compuestos derivados del oro (I) [61].

De manera general, estas enzimas son homotetrámeros con un peso molecular de alrededor de 70-100 kDa (aunque algunas como la GPx-4 es monomérica). Pueden ser de localización intracelular (citosol, mitocondria y núcleo), asociadas a membranas, o de localización extracelular y llevan a cabo la reducción de distintos tipos de peróxidos a sus respectivos alcoholes utilizando como sustrato a dos moléculas de GSH que se oxidan dando lugar a GSSG [62] (Figura Hb).

- *Glutatión Reductasa (GR)*. La **glutatión reductasa** (E.C. 1.6.4.2. NAD[P]H : GSSG oxidoreductasa), es el miembro representativo de la familia de las flavoproteínas disulfuro reductasas [50]. Estas enzimas son dependientes de la presencia de un grupo prostético FAD, el cual actúa como un intermediario de la transferencia de electrones del NADPH al GSSG (Figura Hb).

La GR se encuentra formando un homodímero con un peso molecular de 50 kDa por subunidad. Desde su descubrimiento en 1935 en extractos de eritrocitos, la GR ha sido purificada de representantes de la mayoría de los grupos de los seres vivos, sin embargo, no es una proteína universal. La ausencia de esta enzima ha sido reportada en varios organismos, que en su caso, utilizan diversos mecanismos

para suplir su carencia por ejemplo: i) en el caso de *Drosophila melanogaster* se ha encontrado GSH no así la GR, por lo que se propone que la reducción del primero es dependiente directamente de la tiorredoxina [63], ii) en el caso de los organismos que utilizan otros compuestos tioles diferentes al glutatión es posible encontrar una enzima disulfuro reductasa especializada en la reducción del tiol utilizado, por ejemplo, la micotiol reductasa (MSH-R) en el caso de *Mycobacterium* y *Streptomyces* [56] y la tripanotión reductasa (TryR) en el caso de los tripanosomatídeos [58].

- *Glutarredoxina (Grx)*. Las **glutarredoxinas** son proteínas pequeñas, usualmente alrededor de 9-15 kDa, las cuales existen en varias isoformas en los organismos que sintetizan glutatión [53]. Basados en el número de cisteínas en su sitio activo, las glutarredoxinas pueden dividirse en dos categorías principales: i) con motivo ditiol (Cys-Pro-Tyr-Cys) y ii) con motivo monotiol (Cys-Gly-Phe-Ser) diferenciándose además por su mecanismo de acción [64].

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

Las principales funciones de las glutarredoxinas son [65]: 1) reducir directamente al GSSG (o a ciertas proteínas) a través de electrones provenientes del NADPH (mecanismo ditiol); 2) reducir proteínas generando disulfuros mixtos con GSH (glutationilación) utilizando un mecanismo que requiere sólo uno de los residuos del sitio activo de la glutarredoxina (mecanismo monotiol). Además, debido a su capacidad de donar electrones, puede participar como un regulador de la respuesta ante el estrés oxidante [51] (Figura Hc).

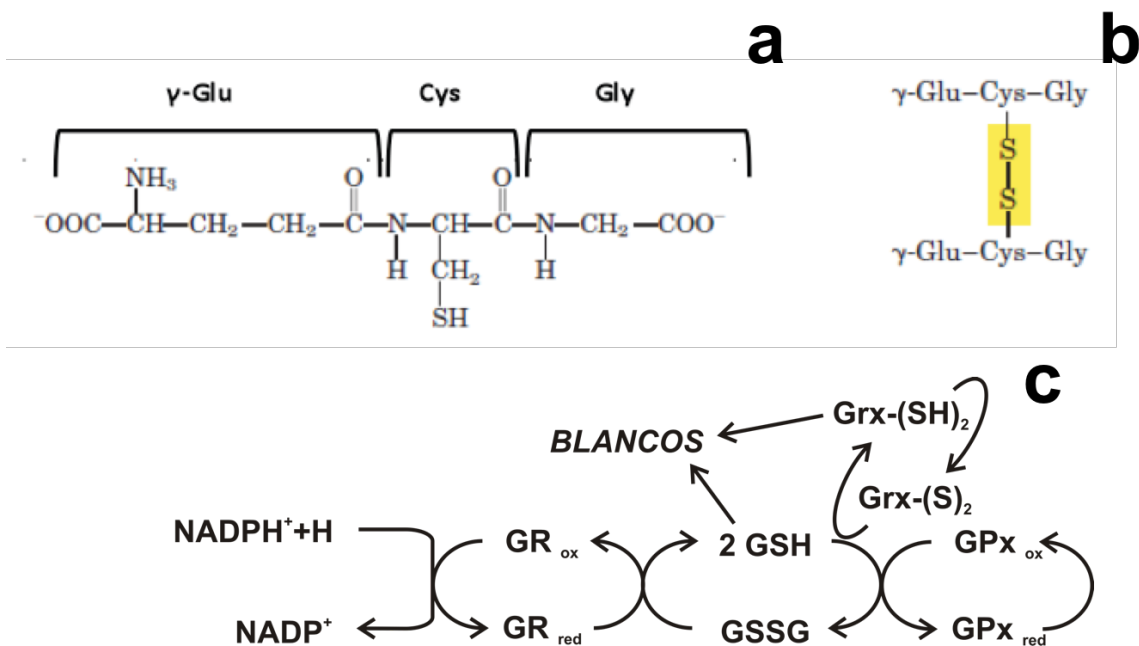


Figura H. El sistema dependiente de glutatión. a) residuos que componen al glutatión, b) disulfuro de glutatión (forma oxidada), c) sistema antioxidante dependiente de glutatión.

1.7 El sistema dependiente de tiorredoxina.

El sistema de tiorredoxina (Trx) comprende a las enzimas tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina peroxidasa o peroxirredoxina (Prx), además de la proteína tiorredoxina [66] (Figura I).

- *Tiorredoxina (Trx).* La **tiorredoxina** es una proteína pequeña de aproximadamente 12 kDa, con un plegamiento característico (5 hebras β rodeadas por 4 hélices α) (Figura la) y un sitio catalítico con un motivo conservado WCGPC [67] . Puede existir en su forma oxidada ($\text{Trx} - [\text{S}_2]$) o reducida ($\text{Trx} - [\text{SH}]_2$). Participa en reacciones redox a través de la oxidación reversible de tioles en su sitio activo [68].

Está ampliamente distribuida a través de la escala filogenética pues es posible encontrarla en distintos grupos, desde bacterias hasta vertebrados [69-

74]. En plantas hay al menos 20 genes que codifican para 6 isoformas [74], mientras que en *E. coli*, en levaduras y en células de mamífero solo se ha encontrado de uno a dos genes [51,73].

Las principales funciones de la tiorredoxina son:

- a) Proveer equivalentes reductores a una amplia variedad de rutas metabólicas y procesos intracelulares [67].
- b) Proveer equivalentes reductores a la ribonucleótido reductasa para la síntesis de deoxirribonucleótidos [48, 75].
- c) Participar en la depuración de peróxido de hidrógeno a través de las tiorredoxina peroxidasas [76].
- d) Regenerar a las proteínas que han sufrido sobre-oxidación al regenerar directamente a las cisteínas mediante un intercambio tiol-disulfuro [77] e indirectamente al proveer equivalentes reductores al sulfóxido de metionina (forma oxidada de la metionina) a través de las isoformas de la enzima metionina sulfóxido reductasa (MSR) [78].
- e) Asistir en el correcto plegamiento de las proteínas mediante su actividad de chaperona, ya sea en condiciones de estrés oxidante y de choque térmico [51, 79].

En diferentes estirpes celulares de mamífero, la Trx-1 (citoplásmica) se expresa de manera constitutiva aunque se ha demostrado que el incremento en su nivel de expresión puede ser inducido por diversos factores como la infección viral, la exposición a radiación de alta energía, el estrés oxidante, entre otros [68]. Adicionalmente, se sabe que la activación de ciertos tipos celulares puede conducir su secreción al espacio extracelular (donde puede tener actividad similar a citosina o participar en la reducción de proteínas blanco [80] o su translocación al núcleo en donde puede facilitar las interacciones proteínas- ácidos nucleicos, prevenir daño oxidante y proveer de equivalentes reductores [81].

- **Tiorredoxina Peroxidasa (TrxP).** Las peroxirredoxinas dependientes de tiorredoxina de tipo 2-Cys, también llamadas **tiorredoxina peroxidasas** (E.C. 1.11.1.15 ; reductante que contiene tioles : hidroperóxido oxidoreductasa) forman un gran grupo de proteínas con actividad de peroxidasa seleno-independiente. Son capaces de reducir directamente peróxidos, como el H₂O₂ o hidroperóxidos de origen lipídico, a costa de los equivalentes provenientes de la tiorredoxina reducida (Trx – [SH]₂), llevándola a esta última, a su forma oxidada (Trx – [S₂]) [82,83]; la cual será nuevamente reducida por la tiorredoxina reductasa (TrxR), cerrando así el ciclo de la tiorredoxina (Figura 1b).
- **Tiorredoxina Reductasa (TrxR).** La **tiorredoxina reductasa** (E.C. 1.6.4.3. NAD[P]H : Trx oxidoreductasa) es una flavoenzima homodimérica NADPH-dependiente que mantiene a la tiorredoxina en su estado reducido [76]. En la naturaleza, es posible encontrar dos grandes grupos de TrxR : i) una forma de bajo peso molecular (35 kDa por monómero) presente en bacterias, en la mayoría de los eucariontes inferiores (incluyendo levaduras) y en plantas; y ii) una forma de alto peso molecular de aproximadamente 55 kDa por monómero [84] que guarda una estrecha relación filogenética con la GR [85] y que está presente principalmente en el grupo de los animales, aunque también se ha reportado en *Plasmodium falciparum* [72].

Se sabe que las TrxR de bajo peso molecular presentan gran especificidad por su sustrato natural [86], mientras que las TrxR de muchos otros organismos, por ejemplo en los mamíferos, presentan afinidad variable por distintos sustratos [87].

Como otros miembros de la familia de las disulfuro oxidoreductasas, la TrxR muestra dominios de unión a NADPH y FAD, una secuencia de interfase necesaria para la dimerización de la enzima y un sitio activo redox cerca del extremo aminoterminal [63]. Las TrxR de alto peso molecular presentan un sitio activo redox

carboxilo-terminal adicional al de las TrxR de bajo peso molecular que sólo presentan uno [86] (Figura Ja).

Adicionalmente, se sabe que la TrxR en la mayoría de los animales (excluyendo a algunos grupos de artrópodos [88] y algunas isoformas mitocondriales en nemátodos [89]), presentan en su sitio activo redox carboxilo terminal un residuo de selenocisteína (Sec, U en el código de una letra) [90], lo que le confiere la capacidad de reducir una amplia variedad de compuestos adicionales a su sustrato natural [84,91]. La presencia de Sec convierte a esta enzima en una selenoproteína, lo que le confiere atributos particulares a este tipo de proteínas [92].

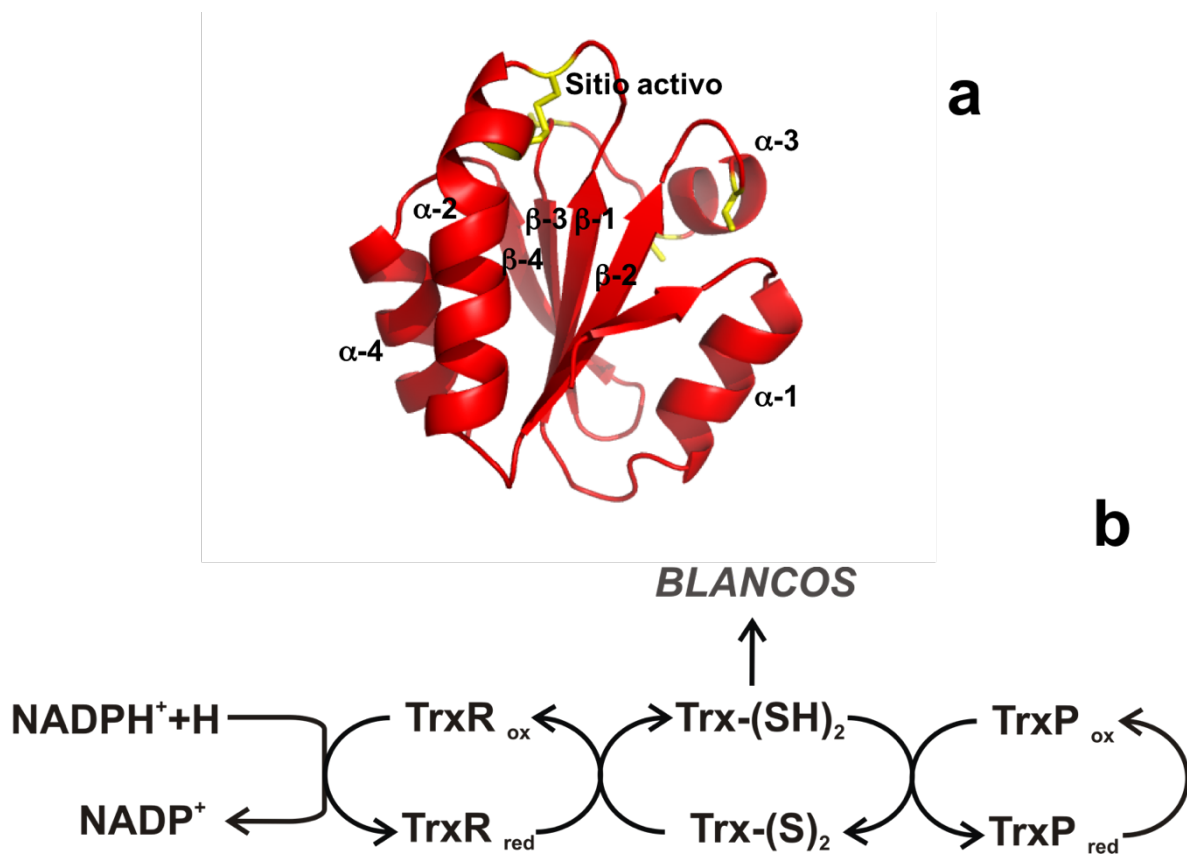


Figura 1. El sistema dependiente de tiorredoxina. a) Estructura tridimensional de la Trx humana (PDB: 3TRX). Se observa las estructuras secundarias así como la configuración característica de este plegamiento. b) Sistema antioxidante de tiorredoxina.

Existen tres isoformas de TrxR humanas: citoplásmica (TrxR-1), mitocondrial (TrxR-2) y una TrxR capaz de reducir tanto al glutatión como a la tiorredoxina oxidados. Esta última isoforma se denomina tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR, E.C.1.8.1.B1. NAD[P]H:GSSG-tiorredoxina oxidoreductasa) y se encuentra en altos niveles en testículos [93]. Las tres isoformas poseen los mismos dominios estructurales y están caracterizadas por la presencia de selenocisteína (Sec) en el centro redox carboxilo terminal (Gly-Cys-Sec-Gly-COOH). Existe un dominio adicional similar a glutarredoxina en el extremo amino en el caso de la TGR [50] (Figura J). Debido a la importancia de la TGR para este trabajo, se describirá con más detalle posteriormente.

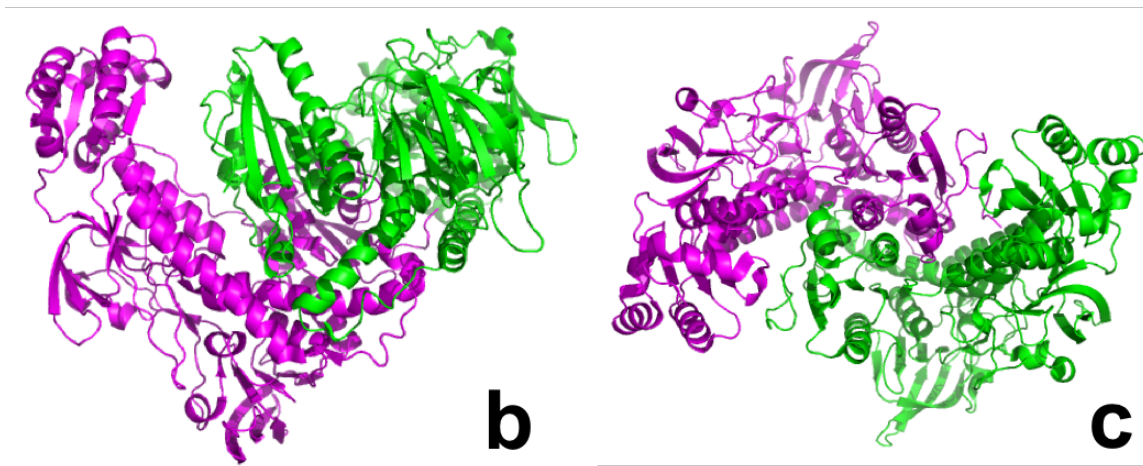
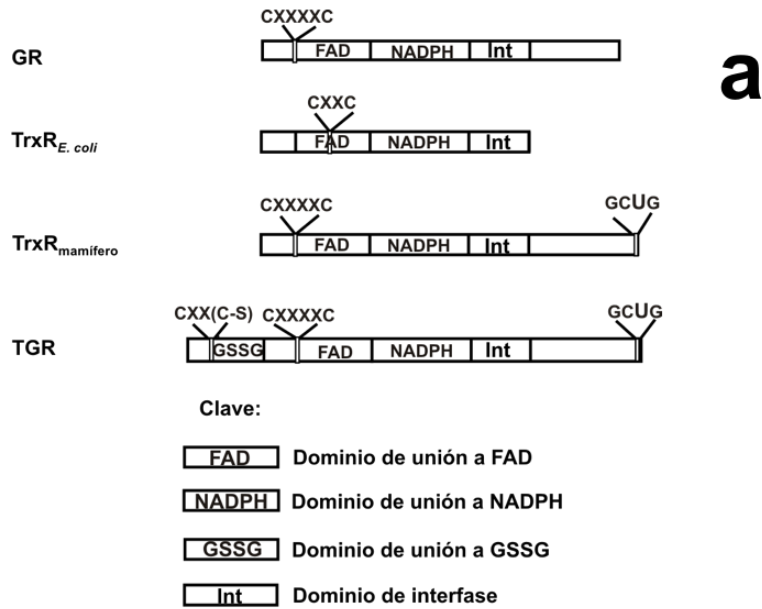


Figura J. Estructura de las reductasas de glutatión y tiorredoxina. a) Diagrama bidimensional comparativo de las reductasas de los sistemas de glutatión y tiorredoxina, modificado de [94]; b) Estructura tridimensional de la TGR de *S. mansoni* (PDB: 2X8C), se muestra en distintos colores cada una de las subunidades; c) Vista aérea del homodímero. Nótese la conformación tipo “ying yang”. Los modelos fueron elaborados con PyMol.

1.8 Diferencias entre los sistemas dependientes de glutatión y tiorredoxina.

Debido a que la concentración de GSH es mucho más alta que la concentración de la Trx (de 100 a 1,000 veces), la poza GSH/GSSG dentro de la célula domina el ambiente redox intracelular y comprende el principal amortiguador (e indicador del estado redox) de la célula [95]. Por otro lado, la Trx tienen por función mantener (o reestablecer) la estructura ditiol/disulfuro de las proteínas que han sufrido oxidación [51].

Una función importante de la Trx es mantener reducidos a los residuos de cisteína críticos presentes en los dominios de unión a ADN de varios factores de transcripción sensibles a oxidación para mantenerlos funcionalmente activos [67]. Otra forma de participación de Trx en los procesos de señalización es mediante el secuestro de factores transcripcionales que pasan a su forma libre dependiendo de las condiciones redox de la célula [96]. Por otro lado, la participación del glutatión en los mecanismos de señalización se da principalmente por la activación/inactivación de las proteínas mediante su acomplejamiento a través de intercambio tiol-disulfuro, como en la glutationilación [97].

Finalmente, se sabe que durante el ciclo celular ambos sistemas, tanto el de GSH como el de Trx, responden de manera diferente e independiente. Por ejemplo, se ha observado en diversos linajes celulares que durante el proceso de diferenciación ocurre una disminución en la relación GSH / GSSG mientras que no hay un cambio significativo en la relación $\text{Trx}-(\text{SH})_2 / \text{Trx}-(\text{S}_2)$ [54].

1.9 El sistema de la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR).

La tiorredoxina-glutatión reductasa ó TGR fue descrita por el grupo de Gladyshev y colaboradores [98]. Esta enzima al igual que la TrxR clásica forma parte de la familia de las piridin-nucleótido-disulfuro óxido-reductasas que comparten los siguientes dominios estructurales a nivel monomérico:

- a) un dominio de unión a FAD, un dominio de unión a NADPH
- b) un dominio de interfase para llevar a cabo la dimerización y
- c) un centro activo redox ditiol/disulfuro en su extremo amino.

Adicionalmente, la TGR posee un centro activo redox ditiol/disulfuro en su extremo C-terminal, común a las TrxR de alto peso molecular (Figura J). En el caso de las TrxR de mamífero (y las TGR de platelmintos) pertenecen también al grupo de las selenoproteínas, ya que se ha encontrado en su centro activo redox carboxilo terminal un residuo de selenocisteína (como parte del motivo conservado Gli-Cis-Sec-Gli) lo que le permite llevar a cabo la formación de un enlace intramolecular selenol-tiol / selenenuro-sulfuro.

La TGR fue aislada inicialmente de testículo de ratón [96] mientras que el gen codificante para la TGR ha sido identificado en el genoma de distintos organismos vertebrados [99]. En el caso del hombre se ha demostrado que la expresión significativa de esta enzima sólo ocurre en las espermátidas, mientras que en el espermatozoide maduro cesa su expresión y pasa a tener un papel estructural [100].

En el caso de los invertebrados, el primer reporte de esta disulfuro reductasa con comportamiento atípico fue en el céstodo *Moniezia expansa* en 1995 [101], aunque fue considerada erróneamente como una GR. Después de la descripción de la TGR de ratón (MmTGR) fue posible identificar correctamente y purificar esta enzima en varios platelmintos parásitos: *Schistosoma mansoni* (SmTGR) [102], *Echinococcus granulosus* (EgTGR) [103], *Taenia crassiceps* (TcTGR) [104],

Fasciola hepatica (FhTGR) [105], *S. japonicum* (SjTGR) [106] , *T. solium* (TsTGR) [107] y *F. gigantica* [108]. En estos organismos se ha sugerido que la unión de los dominios de TrxR y Grx puede representar una adaptación a la vida parasitaria [109], pues sólo es necesario sintetizar una enzima capaz de reducir sustratos pertenecientes a dos sistemas redox independientes [94].

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

- a) En las TGR de mamíferos se ha encontrado el motivo monotiol CXXS dentro del dominio de glutarredoxina [98], mientras que en las TGR de *S. mansoni* y *E. granulosus* este motivo es un ditiol CXXC [102,103].
- b) Aunque en mamíferos es posible observar niveles bajos de expresión de TGR en los diversos tejidos, se ha observado que su expresión es abundante únicamente en el testículo, a diferencia de los niveles de expresión de las isoformas TrxR-1 y TrxR-2, los cuales son prácticamente los mismos en todos los tejidos. En el caso de los platelmintos parásitos no se ha encontrado ni evidencia experimental ni genómica de la presencia de una tiorredoxina reductasa clásica ni de una glutatión reductasa por lo que sólo existe en estos organismos la TGR y que dicha enzima lleva a cabo la función de reductasa de los sistemas dependientes de glutatión y de la tiorredoxina [102-104].

El mecanismo básico de acción de la TGR, inicialmente propuesto por Sun y colaboradores [93], y comprobado experimentalmente mediante cristalografía de rayos X por Angelucci y colaboradores [110], es similar al observado en las otras isoformas de TrxR (Figura K). A continuación detallamos el mecanismo de transferencia de electrones de la TGR a sus sustratos:

- 1) Primero ocurre la transferencia de electrones provenientes del NADPH al grupo prostético FAD, reduciéndolo (Figura Ka).

- 2) En segundo lugar ocurre la formación de un complejo de transferencia de carga entre el FAD reducido (FADH_2) y un residuo de cisteína del sitio catalítico del extremo amino, dejando reducido al otro residuo.
- 3) Posteriormente se lleva a cabo la transferencia de electrones del sitio activo amino al sitio activo carboxilo de la subunidad adyacente.
- 4) Finalmente, en el caso de la tiorredoxina, se lleva a cabo la formación temporal de un enlace selenenuro-sulfuro entre el residuo de selenocisteína de la enzima y un residuo de cisteína del sustrato. Al ser reducido dicho enlace libera al sustrato reducido, regenerando con esto a la enzima a su forma basal (Figura Kb).
- 5) En el caso de la reducción del glutatión se propone que éste es reducido por el dominio de glutarredoxina, el cual transfiere los electrones provenientes del sitio catalítico del extremo carboxilo (Figura Kc) [111].

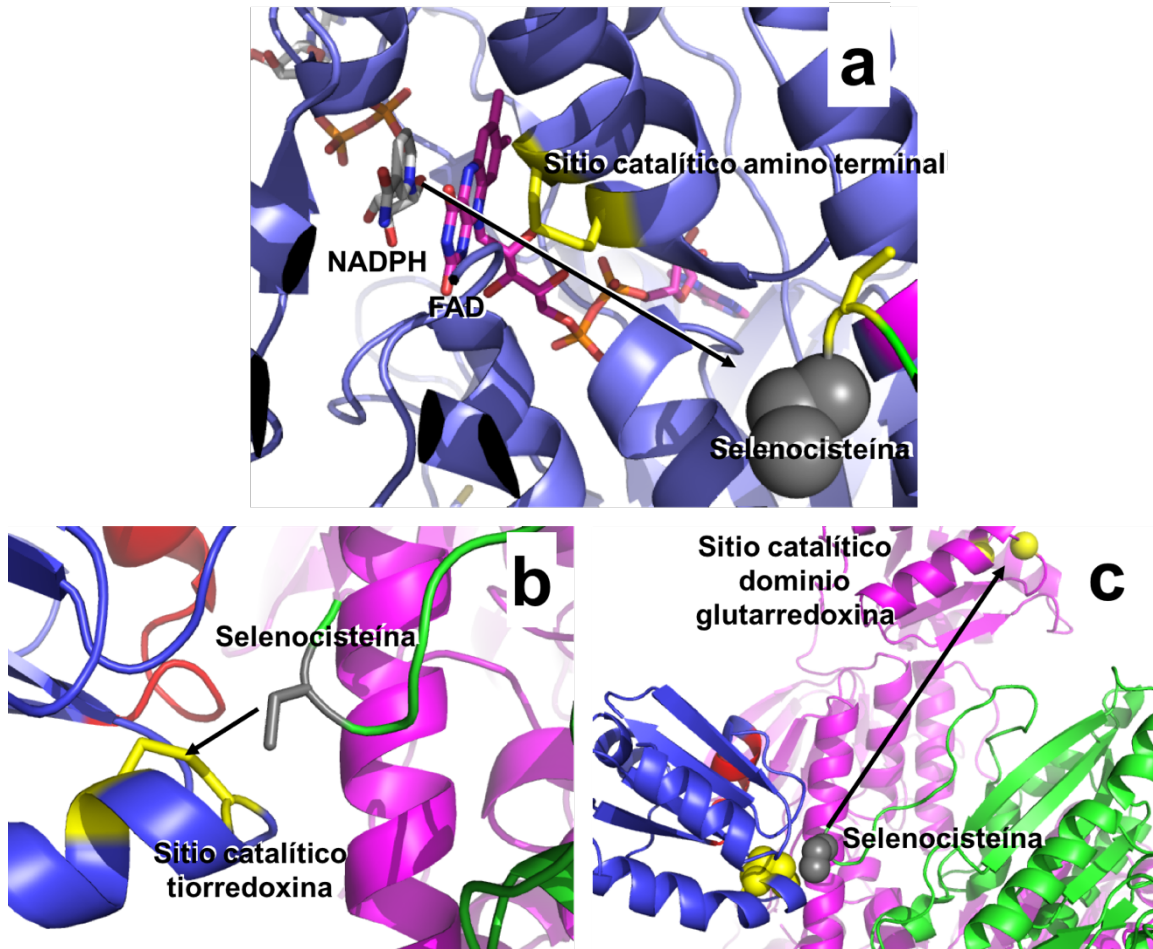


Figura K. Mecanismo propuesto para la reducción del glutatión y la tiorredoxina por la TGR.

a) Los electrones provenientes del $\text{NADPH} + \text{H}^+$ pasan al FAD unido covalentemente a la subunidad y de ahí pasan al primer sitio catalítico amino terminal del dominio de TrxR para después pasar al segundo sitio catalítico carboxilo terminal de la segunda subunidad y reducir a la selenocisteína, b) en el caso de la tiorredoxina, el residuo de selenocisteína reduce directamente a su sitio activo mientras que c) en el caso del glutatión, primero regresan los electrones del residuo de selenocisteína de la segunda subunidad al sitio activo del dominio de glutarredoxina de la primera subunidad y de ahí al glutatión. Los residuos de cisteína se marcan en amarillo mientras que el residuo de selenocisteína se muestra en gris. Los modelos fueron creados por acomodo de sustratos por homología (Resultados no publicados).

1.10 Estrés oxidante asociado al parasitismo.

La adaptación al estilo de vida parasitario trae consigo diversas adecuaciones morfológicas, metabólicas y genómicas encaminadas a permitir la invasión, permanencia y reproducción de los parásitos al interior de su hospedero [109]. Una de las adaptaciones más evidentes al parasitismo son las modificaciones a los sistemas antioxidantes, ya que esta forma de simbiosis trae consigo la exposición a fuentes adicionales de ERO [30] (Figura L):

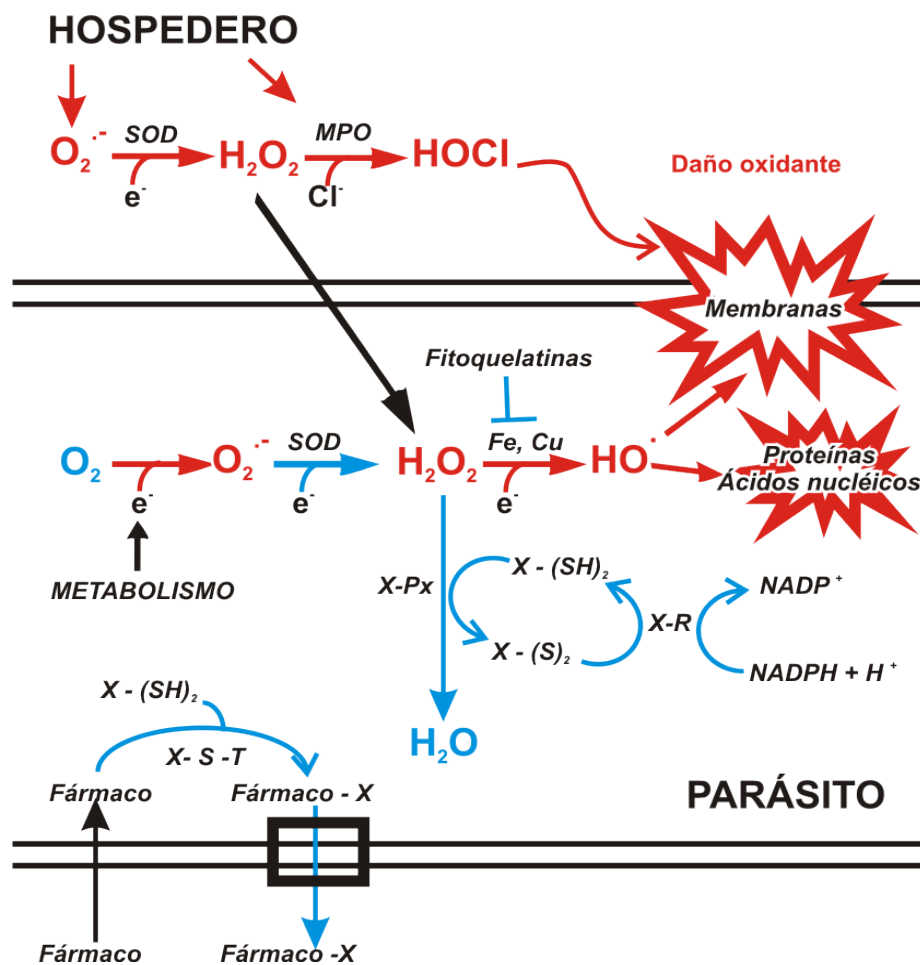


Figura L. Mecanismo generalizado del sistema antioxidante en organismos parásitos.

- El cambio de un medio aerobio (medio ambiente) a un medio microaerófilo (tejidos) o anaerobio (tracto digestivo) durante una o más fases del ciclo de

vida del parásito [112]; lo que favorece la generación de ERO al someter al parásito a ciclos de hipoxia-normoxia, similares a los que se observan en los tejidos que sufren isquemia-reperfusión [68,82,113].

- b) La invasión del parásito al hospedero [114] y el establecimiento de una infección [115] desencadena una respuesta inmune en el hospedero en la cual se generan grandes cantidades de ERO para contender y eliminar al agente patógeno [116]. Sin embargo, se ha demostrado que los parásitos también generan grandes cantidades de ERO de manera fisiológica [8].

Adicionalmente, se ha observado que la proliferación celular se inhibe en presencia de altas concentraciones de ERO [117,118], por lo que se requiere un sistema antioxidante robusto por parte de los parásitos para asegurar su establecimiento, sobrevivencia y proliferación al interior del hospedero [115, 119].

Se ha observado en los organismos aerobios (y en los parásitos anaerobios facultativos o microaerofílicos) la presencia de, al menos, una isoforma de la metalo-enzima superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1), la cual tiene por función reducir al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a una ERO menos tóxica, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura L) [39]. Sin embargo, en los organismos parásitos la ausencia de la principal enzima detoxificante de H_2O_2 , la catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6), hace que sus sistemas enzimáticos antioxidantes tengan una configuración distinta a la de su hospedero (Figura M).

Otra diferencia entre los platelmintos parásitos y sus hospederos es que en los primeros, sólo se ha observado una GPx, aparentemente asociada a la membrana plasmática [120]. Sin embargo, la principal actividad de peroxidasa se ha relacionado experimentalmente con tres isoformas de Prx (los mamíferos presentan seis tipos diferentes de GPx [121] y seis Prx [122]), una de las cuales tiene la capacidad de utilizar tanto al GSH como a la Trx [123].

Adicionalmente, se ha observado un aumento del sistema para contrarrestar de xenobióticos ya que los parásitos presentan una mayor diversidad de isoformas de la familia de las GST, así como la presencia de la enzima fitoquelatina sintasa (PCS, E.C. 2.3.2.15) [109], la cual toma GSH para formar un derivado denominado fitoquelatina que es un péptido necesario para la detoxificación de cationes mono y divalentes [124].

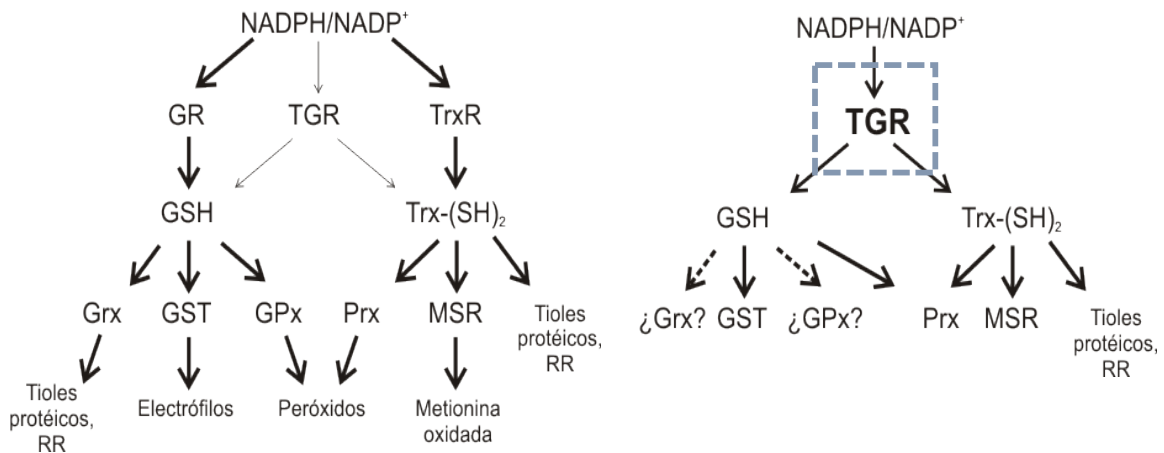


Figura M. Diferencias entre la arquitectura de los sistemas redox de vertebrados (izquierda) y platelmintos parásitos (derecha).

1.11 La TGR como blanco farmacológico.

A partir del descubrimiento de la importancia de la TGR para los platelmintos parásitos, esta enzima ha sido propuesta como un blanco farmacológico de interés, desarrollándose una serie de compuestos con diferente capacidad inhibitoria. En el cuadro A se enlistan las familias químicas de algunos de estos compuestos.

Cuadro A. Principales familias de inhibidores de la TGR reportados a la fecha.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Referencia
Prazicuantel*	No inhibe	[125]
Auranofín*	0.007-0.01	[102-107]
Aurotioglucosa*	0.07-3	[125]
Aurotiomalato*	0.05-0.07	[125]
Tartrato antimonil de potasio*	0.037-0.051	[125]
Naftazarina*	2.5-10	[125]
Derivados de amida fosfínica	0.025-12	[126]
Derivados de oxidiazol N-óxido	0.02-2	[126]
Derivados de bis oxidiazol N-óxido	0.35-6.3	[127]
Derivados de isoxazolona	0.08-9	[126]
Derivados de fosforamidita	0.2-4	[126]
Tiadiazol	10	[128]
Derivados de bistiadiazolidinas	14-24	[129]
Furoxan 3-carbonitrilo	6.3	[130]
Derivados de prazicuantel-furoxano	0.01-8.3	[130]
Derivados de difluorometilmenadiona	0.046-0.784	[131]
Derivados de 2,3-dihidrobenzofurano	0.003-2	[132]
Derivados de 3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoxiisindol-1,3(2H)-diona	0.42	[132]
Derivados de quinolin- 2(1H)-ona	2.9	[132]

* Estos compuestos fueron diseñados originalmente para el tratamiento de otros padecimientos.

Como se mencionó anteriormente, las isoformas de la TrxR (entre ellas, la TGR) presentan un residuo de Sec en su sitio activo [90], por lo que pueden ser inhibidas específica e irreversiblemente por el auranofín (AF) en concentraciones nanomolares [84, 87, 102-107 actuales] a diferencia de otros compuestos que requieren concentraciones mayores, como se muestra en el cuadro A. El AF (trietilfosfina (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -1-D-tiopiranosato-S) de oro (I)) es una sal derivada de oro, altamente hidrófoba que fue introducida en la clínica inicialmente para el tratamiento de la artritis reumatoide [133]. Actualmente, el AF es utilizado para inhibir selectivamente a las selenoproteínas [134] debido a que este compuesto se une covalentemente a la selenocisteína (Sec) la cual es más reactiva a pH fisiológico que la Cys [135].

En el caso de los platelmintos parásitos, se ha demostrado que la inhibición química [125,136,137] o por RNA de interferencia [125] de la TGR mata a estos organismos en condiciones *in vitro*. Adicionalmente, se han desarrollado compuestos derivados de artesunato que afectan directamente la expresión de la TGR, lo que compromete de igual modo la viabilidad de los platelmintos [138]. Sin embargo, al tratar a los hospederos parasitados con dichos compuestos, no se ha podido eliminar el 100% de los parásitos [132], observándose que no hay una relación directamente proporcional entre la inhibición de la enzima y la erradicación del parásito.

De igual modo, no se ha estudiado a detalle las implicaciones de la inhibición de la TGR en la acumulación de los sustratos oxidados de esta enzima, ni la respuesta del parásito a dichos fármacos por lo que obtener mayor información de estos procesos podrían ayudar a implementar mejores esquemas para el desarrollo de fármacos para erradicar la parasitosis ocasionadas por estos organismos.

2. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas dependientes del glutatión y de la tiorredoxina son fundamentales para mantener la homeostasis redox en los organismos [34, 42, 73]. Diversos estudios han demostrado que la arquitectura de sistemas dependientes de glutatión y tiorredoxina en platelmintos parásitos difieren de los sistemas redox de sus hospederos siendo la principal diferencia la ausencia de la TrxR y GR clásicas y la sustitución de éstas por una única reductasa TGR expresada durante todo el ciclo de vida de los parásitos [139].

La TGR pertenece al grupo de las selenoenzimas, las cuales presentan un residuo de selenocisteína (Sec) siendo este residuo fundamental para la reducción de sus sustratos [110]. Debido a la alta accesibilidad y reactividad de Sec, la TGR (al igual que la TrxR de mamífero) puede ser fácilmente inhibida por muy diversos compuestos como son los metales y metales de transición, agentes alquilantes, dinitrohalobenzenos, quinonas, flavonoides y otros polifenoles [140]. En particular, los complejos derivados de oro son potentes inhibidores actuando a bajas concentraciones [141], siendo el AF uno de los más potentes inhibidores de selenoproteínas.

A pesar de que se ha desarrollado un considerable número de compuestos que pueden inhibir a la TGR en condiciones *in vitro* e *in vivo*, no se conoce actualmente los mecanismos por los cuales la inhibición de esta enzima compromete la viabilidad de los platelmintos parásitos.

3. HIPÓTESIS

- Si se inhibe a la tiorredoxina-glutatión reductasa *in vivo*, se producirá un desequilibrio en el sistema dependiente de glutatión al interior del cisticerco de *T. crassiceps*, lo que activará mecanismos de protección para el mantenimiento del estado redox.
- Si se evalúa la estructura de la TGR del cisticerco de *T. crassiceps* será posible explicar su afinidad selectiva por tiorredoxinas de distinto origen.

4. OBJETIVOS GENERALES

- I.- Caracterizar la participación del glutatión en el mantenimiento del estado redox del cisticerco de *T. crassiceps* en condiciones basales y en las condiciones de estrés oxidante producidas al inhibir a la TGR.
- II.- Estudiar si existe una relación entre el reconocimiento selectivo de la TGR por tiorredoxinas de distinto origen así como diferencias estructurales.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES DEL OBJETIVO GENERAL I.

- Implementar las técnicas para cuantificar las diferentes especies de glutatión: reducido (GSH), oxidado (GSSG) y acomplejado a proteínas (PSSG).
- Cuantificar GSH, GSSG y PSSG en el cisticerco de *T. crassiceps* en presencia de auranofín (AF), de N-acetil cisteína (NAC) y de butionina sulfoximina (BSO) para evaluar su efecto en la homeostasis redox de este parásito.

- Evaluar el estado redox general del cisticerco mediante sondas químicas redox-sensibles (diclorofluoresceína diacetato) en condiciones fisiológicas y de estrés oxidante.
- Determinar la relación GSH/GSSG y potencial redox del glutatión en condiciones basales y bajo estrés oxidante.
- Evaluar la cantidad de glutatión en el medio de cultivo para conocer si su salida puede ser un mecanismo de protección ante el estrés oxidante.
- Determinar la distribución interna y global de las distintas especies de glutatión en el cisticerco.
- Identificar y cuantificar si hay otros tioles de bajo peso molecular de importancia redox en el cisticerco.
- Realizar búsquedas en las bases de datos de los genomas de platelmintos parásitos disponibles, de las principales enzimas y proteínas relacionadas con el metabolismo del glutatión.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES DEL OBJETIVO GENERAL II.

- Purificar y secuenciar a la Trx citosólica del cisticerco de *T. crassiceps*.
- Evaluar las diferencias cinéticas de TGR con tiorredoxinas de distinto origen.
- Modelar la estructura tridimensional de la tiorredoxina de *T. crassiceps* así como de otros platelmintos parásitos.
- Modelar la interacción TGR-tiorredoxina.

- Explicar el reconocimiento diferencial de la TGR por tiorredoxinas de distinto origen en términos estructurales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

La sal derivada de oro Auranofin (AF) fue obtenido de Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). El disolvente Dimetilsulfóxido (DMSO) grado HPLC fue adquirido de MERCK (Hohenbrunn, Germany), mientras que el medio mínimo de mantenimiento RPMI-1640 fue adquirido de Life Technologies-Gibco (Grand Island, NY, USA). Todos los demás compuestos químicos fueron comprados a SIGMA-ALDRICH Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Se utilizó agua purificada por ósmosis reversa para la preparación de las soluciones.

5.2 Obtención del material biológico.

Ratones hembras de la cepa Balb/c de 18 g de peso fueron inoculados con 20 cisticercos de *T. crassiceps* cepa HYG por inyección intraperitoneal [142]. Transcurridos 3 meses posteriores a la infección, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los cisticercos fueron recuperados en condiciones estériles de la cavidad peritoneal y lavados cuidadosamente con solución salina de fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4. Con el propósito de obtener una población de cisticercos de un tamaño de aproximadamente 3.0 mm de diámetro, se utilizó una malla estéril con un tamaño de poro de 1 mm².

Los ratones fueron mantenidos y sacrificados de acuerdo a los lineamientos emitidos por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM (FMED/CI 098-2013).

5.3 Mantenimiento y tratamiento de los cisticercos.

Las condiciones del mantenimiento de los cisticercos han sido previamente descritas [137]. Brevemente, se colocaron 300 cisticercos (con un volumen aproximado de 3 mL) en 17 ml de medio RPMI-1640 (pH 7.0) con penicilina-

estreptomycin al 1% y se preincubaron durante 3 horas en condiciones aeróbicas y en agitación a 37°C, en presencia de N-acetil cisteína (NAC) 10 mM disuelta en HEPES 100 mM (pH 7) ó en presencia de butionina sulfoximina (BSO) 100 µM disuelta en PBS. Acabado el tiempo de preincubación, se añadió auranofin (AF) disuelto en 100% de DMSO a las concentraciones finales de 0, 2, 4 ó 10 µM respectivamente y se mantuvieron las condiciones de incubación antes mencionadas por 13 h adicionales. Los cisticercos control fueron mantenidos en presencia de medio más DMSO. Después del tratamiento, los cisticercos fueron recuperados, lavados con PBS y separados en alícuotas. Adicionalmente, el medio de mantenimiento también fue recuperado y almacenado a -70°C para posteriores análisis.

5.4 Determinación de la viabilidad de los cisticercos.

La viabilidad de los cisticercos fue determinada mediante el uso del colorante vital azul tripano al 0.02% y la inducción de movimiento por temperatura, como previamente reportamos [137]. Como control, se evaluó el efecto en la viabilidad de cada uno de los compuestos utilizados (NAC, BSO, NAC + BSO) en presencia y ausencia de auranofin.

5.5 Determinación de actividad de gamma-glutamyl-cistein sintetasa (GCS) en extractos crudos.

Inmediatamente después del tratamiento, se tomó una alícuota de 100 cisticercos, se lavaron con PBS y fueron homogeneizados con un vástago de teflón en presencia del inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 86 µM, Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 14,600 x g por 15 minutos para eliminar la fracción mitocondrial. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 269,000 x g por 45 minutos para descartar la fracción microsomal y después el nuevo sobrenadante fue dializado contra 10 volúmenes de un buffer Tris/HCl 100

mM EDTA 1 mM (pH 8.0) con el fin de eliminar los metabolitos de bajo peso molecular.

Para llevar a cabo la determinación de la actividad de gamma-glutamyl-cistein sintetasa, una alícuota de 100 μ L del sobrenadante libre de metabolitos fue incubada con glutamato 0.8 mM, cisteína 0.8 mM, ATP 5 mM y $MgCl_2$ 20 mM. Después de 30 minutos, la reacción se detiene por la adición de ácido perclórico (PCA) al 6%. La mezcla de reacción fue centrifugada y 100 μ L del sobrenadante fueron analizados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC) usando una columna analítica C-18 Spherisorb S5 ODS2 (PSS 831913), acorde a lo reportado por Avilés y colaboradores [143]. Gamma-glutamyl cisteína de origen comercial fue usada como estándar.

5.6 Determinación de la actividad de tiorredoxina-glutati3n reductasa (TGR) en extractos crudos.

Una muestra de 100 cisticercos fue homogeneizada como se mencion3 en la secci3n anterior. El homogeneizado fue centrifugado a 38,800 x g por 30 minutos. El sobrenadante obtenido fue recuperado y dializado toda la noche contra 10 volúmenes de un buffer Tris 50 mM EDTA 1 mM pH 7.8 a 4°C.

La actividad TGR fue medida usando un buffer de Tris/HCl 100 mM EDTA 2 mM (pH 7.8) y NADPH a una concentraci3n final de 120 μ M. La reacci3n fue iniciada por la adici3n de 200 μ L del extracto dializado y se sigui3 espectrofotométricamente el consumo de NADPH debido a la presencia de tiorredoxina end3gena a 340 nm.

5.7 Efecto del AF en la viabilidad y en la actividad de la TGR del cisticerco de T. solium.

Una muestra de 10 cisticercos de *T. solium* (obtenida de cerdos naturalmente infectados) fue incubada durante 13 horas en presencia de distintas

concentraciones de AF (0, 2, 4 y 10 μM). Pasado el tiempo de tratamiento, los cisticercos fueron recuperados, lavados con PBS y se determinó su viabilidad y actividad de TGR de la misma manera que se mencionó para el cisticerco de *T. crassiceps*.

5.8 Determinación del pH citosólico en el cisticerco de T. crassiceps.

Alrededor de 500 cisticercos fueron pinchados con una aguja estéril para extraer y descartar el líquido vesicular. A continuación, los cisticercos fueron cuidadosamente lavados 3 veces con agua bidestilada (pH 7) y posteriormente fueron exprimidos por centrifugación a 68,000 x g por 45 minutos. Finalmente, el pH en el sobrenadante (fracción citosólica) fue determinado usando un potenciómetro 320 (CORNING, USA). Las mediciones fueron hechas por triplicado en diez muestras independientes de cisticercos.

5.9 Obtención de extractos deproteinizados.

Se recuperaron 200 cisticercos correspondientes a cada uno de los tratamientos, se lavaron con PBS y se homogeneizaron con un vástago de teflón en presencia de un volumen igual de una solución fría de PCA 2.0 M EDTA 4 mM. La suspensión resultante fue centrifugada a 68,000 x g durante 1 hora para remover la proteína precipitada. El sobrenadante fue neutralizado cuidadosamente con una solución de KOH 2.0 M y ácido N-morfolinopropanosulfónico (MOPS) 0.3 M y después fue dividido en alícuotas para la determinación de los equivalentes internos de glutatión (GSH + 2 x [GSSG]) y del glutatión oxidado (GSSG): una alícuota del sobrenadante ácido fue inmediatamente derivatizada con 2-vinilpiridina (2-VP) a una concentración final de 180 mM para llevar a cabo la determinación de GSSG. Reportes previos han demostrado que la 2-VP no interfiere con las determinaciones de glutatión [144]. La muestra sin 2-VP fue usada para la determinación de los equivalentes internos de glutatión.

5.10 Reducción del glutatión acomplejado a proteínas.

Para determinar la cantidad de glutatión unido a proteínas (PSSG), el precipitado protéico obtenido en el apartado anterior fue recuperado y lavado dos veces con PCA 2 M EDTA 4 mM y centrifugado por 30 minutos a 25,000 x *g* a temperatura ambiente. El precipitado fue resuspendido en 1.0 ml de buffer de fosfato de potasio 100 mM EDTA 1 mM (pH 7.4), y se neutralizó con una solución de NaOH 1 N para alcanzar un pH en el rango de 8.2-8.4; después se adicionó ditioneitol (DTT) a una concentración final de 8 mM y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. La muestra reducida fue nuevamente desproteinizada y neutralizada como fue mencionado anteriormente. El sobrenadante obtenido en este último paso contiene el glutatión liberado de las proteínas. El exceso de DTT no interfiere con la cuantificación de glutatión [145].

5.11 Determinación de la cantidad de glutatión.

La determinación de los equivalentes de glutatión no acomplejados se realizó mediante espectrofotometría de acuerdo al método desarrollado por Akerboom y Sies [146] como se describe a continuación: una alícuota de 50 μ l del extracto desproteinizado y neutralizado fue incubado en presencia de NADPH (128 μ M) y DTNB (582 μ M) en buffer de fosfato de potasio 100 mM más EDTA 1 mM (pH 7.0), en un volumen final de 1 mL. Se registró la absorbancia de la mezcla a 412 nm durante 10 minutos a 25°C y después se adicionó 50 mU de glutatión reductasa proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGR) para iniciar la reacción. En este caso, se registró espectrofotométricamente la formación de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) a 412 nm. El contenido de glutatión presente en la alícuota fue determinado mediante la interpolación de la pendiente inicial en una curva patrón realizada con cantidades conocidas de GSSG. El mismo procedimiento fue usado para la determinación del contenido de glutatión oxidado en muestras que fueron previamente derivatizadas con 2-VP.

5.12 Cálculo para obtener la distribución global del glutatión en el cisticerco.

La cantidad del glutatión interno no acomplexado (equivalentes internos de glutatión) fue obtenido mediante la suma de las cantidades aportadas por la forma reducida (un equivalente por molécula) y la forma oxidada (dos equivalentes por molécula) de acuerdo a la ecuación 1:

$$[\text{Equivalentes internos de glutatión}] = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}] \quad (1)$$

El glutatión en su forma reducida (GSH) se calculó a partir de la diferencia entre los equivalentes internos de glutatión y el glutatión en su forma oxidada (GSSG):

$$[\text{GSH}] = [\text{Equivalentes internos de glutatión}] - 2 \times [\text{GSSG}] \quad (2)$$

La cantidad del glutatión interno total se calculó por sumar la cantidad de glutatión acomplexado a proteínas (PSSG) (un equivalente por molécula) a los equivalentes internos de glutatión:

$$[\text{Glutatión interno total}] = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}] + [\text{PSSG}] \quad (3)$$

Los equivalentes total de glutatión fueron obtenidos a partir del glutatión interno total y el glutatión oxidado expulsado al medio (dos equivalentes por molécula):

$$[\text{Equivalentes totales de glutatión}] = [\text{Glutatión interno total}] + 2 \times [\text{GSSG}_{\text{expulsado}}] \quad (4)$$

5.13 Cálculo del potencial redox de glutatión.

El valor E fue calculado acorde a lo reportado por Shen y colaboradores [147]:

$$E = \{E^{\circ} + (RT/nF) \times (\text{pH}_{\text{actual}} - \text{pH}_{\text{estándar}})\} - \{RT/nF \ln([\text{GSH}]^2 / [\text{GSSG}])\} \quad (5)$$

donde n corresponde al número de electrones transferidos, R es la constante universal de los gases ($8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura en Kelvin, y F es la constante de Faraday ($9.65 \times 10^4 \text{ J vol}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Considerando la temperatura fisiológica del cisticerco dentro del hospedero (37°C):

$$E = \{-240 \text{ mV} + (-61.5 \text{ mV} / 2e^{-}) \times (\text{pH}_{\text{actual}} - 7)\} - \{(61.5 \text{ mV} / 2 e^{-}) \times \log ([\text{GSH}]^2 / [\text{GSSG}])\} \quad (6)$$

Estos cálculos se realizaron considerando un valor pH fisiológico citoplásmico de 8.2 en el cisticerco de *T. crassiceps* ($n=10$).

5.14 Detección de las especies reactivas de oxígeno producidas por el cisticerco.

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) inducidas por AF, 10 cisticercos correspondientes a cada uno de los tratamientos antes descritos fueron recuperados inmediatamente después de la exposición a los químicos, se lavaron con PBS, y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y a 37°C en presencia de una solución de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) $10 \mu\text{M}$, diluida en PBS. Los cisticercos fueron recuperados, lavados dos veces con PBS frío y colocados en una placa oscura de 96 pozos para determinar la fluorescencia (absorción 485 nm /emisión 530 nm) producida por la oxidación de H_2DCFDA debida a la presencia de ERO. Se realizaron diversos controles para evaluar la autofluorescencia de cada compuesto (AF, NAC, BSO), de los disolventes (DMSO, PBS) y de los cisticercos. Estos valores se restaron en los ensayos realizados. Cada experimento se realizó por quintuplicado.

5.15 *Búsqueda de tioles de bajo peso molecular en extractos desproteinizados de cisticercos de T. crassiceps.*

Muestras de 200 cisticercos fueron incubados en presencia de 0, 2, 4 y 10 μM de AF por 13 h, en las mismas condiciones de mantenimiento detalladas anteriormente. Acabado el tiempo de incubación, los cisticercos fueron recuperados y procesados para la obtención de un extracto desproteinizado. Una alícuota de 100 μL de cada uno de los extractos se trató con borohidruro de sodio (NaHBr_4) y DTT 20 mM durante 10 minutos a 4°C . El exceso de NaHBr_4 fue destruido por la adición de PCA 3%. La mezcla resultante fue centrifugada por 10 minutos a $16,000 \times g$ a 4°C . El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm (Millex-Millipore) e inyectado a una columna de fase reversa Symmetry C-18 HPLC (tamaño de partícula 3.5 mm, 4.6 mm x 75 mm, Waters Milford, USA), previamente equilibrada con una solución de acetonitrilo 0.1%. Al inicio de la separación, la fase móvil fue de 99% de solvente A (ácido trifluoroacético al 0.1%) y 1% de solvente B (acetonitrilo 100%), después de 10 minutos se aplicó un gradiente hasta alcanzar 80% de solvente A y 20% de solvente B, durante 50 minutos. Los tioles de bajo peso molecular fueron posteriormente oxidados con DTNB y se detectó la generación de TNB a 412 nm mediante un detector post-columna (Water, Milford, USA).

5.16 *Efecto de los tioles de bajo peso molecular en el auranofin.*

Se disolvió AF 1 μM en DMSO 100% y se adiciono a las siguientes soluciones: cisteína 1.0 M, NAC 1.0 M, GSH 1.0 M ó BSO 10 μM preparadas en un buffer Tris/HCl 200 mM más EDTA 2 mM (a pH 7 ó pH 8.2), estas muestras se incubaron durante 3 horas en agitación y oscuridad, a 37°C . Posteriormente, con una alícuota de cada una de las muestras se evaluó su capacidad para inhibir a la TGR purificada a homogeneidad, como reportamos previamente [104].

5.17 *Evaluación de la reducción de GSSG por parte de los tioles de bajo peso molecular.*

Se preparó una solución de GSSG 100 μ M en Tris/HCl 200 mM EDTA 2 mM (pH 8.2) y se incubó 1 h en presencia de NAC o cisteína a una concentración final de 1 mM, en agitación y oscuridad, a 37°C. Después se añadió a la mezcla 2-VP 180 mM y se incubó 1 h a temperatura ambiente, con el objetivo de derivatizar todo el GSH generado por la reducción química. Finalmente, se determinó la cantidad de GSSG remanente de acuerdo al método de cuantificación antes expuesto.

5.18 *Presentación de los datos y análisis estadístico.*

Todos los datos se muestran como la media \pm DE (desviación estándar) de 4 experimentos independientes, cada uno hecho por duplicado. La significancia estadística de los datos fue evaluada mediante el programa OriginPro (versión 8) y ANOVA de una cola así como la prueba *post hoc* de Tukey (Se consideró significativo $p < 0.05$).

5.19 *Búsqueda de homólogos de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) en los genomas de platelmintos parásitos.*

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de GGT en la base de datos GeneDB, en donde se encuentran depositados los genomas de los platelmintos parásitos *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Hymenolepis microstoma*, *S. mansoni*, *S. japonicum* y *T. solium* (GENEDB, <http://www.genedb.org>). La búsqueda se realizó mediante blast-p, usando las secuencias de la GGT-1 humana (HsGGT-1; gi:93140064 NCBI database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y la GGT de *Rattus norvegicus* (RnGGT; gi: 145280505 NCBI database). El análisis de las secuencias de las hipotéticas GGT se realizó mediante su alineamiento por medio del software Clustal W.

5.20 *Búsqueda de homólogos de la fitoquelatina sintasa (PCS) en los genomas de platelmintos parásitos.*

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de PCS en la base de datos GeneDB, donde se encuentran depositados los genomas de los platelmintos parásitos *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *S. mansoni*, y *T. solium* (GENEDB, <http://www.genedb.org>). Esta búsqueda se realizó mediante blast-p, usando las secuencias de la PCS de *Arabidopsis thaliana* (AtPCS-1; gi:332007672 NCBI database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). El análisis de las secuencias de las hipotéticas PCS se realizó mediante su alineamiento por medio del software Clustal W.

5.21 *Búsqueda de homólogos de los transportadores de glutatión en el genoma de T. solium.*

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas a diversos transportadores de glutatión en la base de datos GeneDB, donde se encuentra depositado el genoma de *T. solium* (GENEDB, <http://www.genedb.org>). La búsqueda se realizó mediante blast-p, usando las secuencias de las siguientes proteínas humanas: proteína de resistencia a multidroga (multidrug resistance protein 1, MRP1; gi:134142337; NCBI database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>); la familia de transportadores de aniones orgánicos (solute carrier organic anion transporter family, member 1A2 ; SLCO1A2 = OATP; gi: 10835099); el regulador transmembranal de la fibrosis quística (cystic fibrosis transmembranal regulator; CFTR, gi: 147744553); y los transportadores ABCG (ABCG subfamily cassette transporters type ABCG2 ; gi:15418734). El análisis de las secuencias de los transportadores hipotéticos se realizó mediante su alineamiento utilizando el software Clustal W.

5.22 Purificación de la tiorredoxina.

La purificación de la tiorredoxina se hizo de la siguiente manera: se homogeneizaron cisticercos de *T. crassiceps* en un volumen igual de Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM (pH 8.5) en presencia de PMSF 172 mM a 4°C. El homogenado resultante se centrifugó a 800 x g por 20 minutos y el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 106 000 x g por 45 minutos. Este nuevo sobrenadante se dializó toda la noche contra amortiguador Tris-HCl 100 mM más EDTA 1 mM (pH 8.5) (buffer TE). Antes de someter el extracto crudo a cromatografía, se preincubó con DTT 2 mM por media hora. Todos los amortiguadores utilizados durante la purificación, se complementaron con DTT 0.1 mM (concentración final).

El extracto crudo se inyectó a una columna DEAE-Trisacril (2.6 x 20 cm) y la elución de la Trx se realizó mediante un gradiente lineal de NaCl 0-0.3 M. Las fracciones con actividad de Trx se juntaron, se dializaron contra amortiguador de fosfato de sodio 5 mM (pH 7) y se aplicó a una columna de Ultrogel (1.8 x 7 cm). Se colectaron las fracciones que no se unieron a la resina y se dializaron contra sulfato de amonio 1.7 M preparado en el mismo amortiguador de fosfato. Finalmente, este último dializado se aplicó a una columna de Fenil-Sefarosa CL4B (1 x 18 cm). La tiorredoxina se eluyó con un gradiente lineal de sulfato de amonio de 1.4 a 0.5 M, posterior a la aplicación de tres volúmenes de sulfato de amonio 1.4 M. Las fracciones con actividad de Trx se juntaron, se dializaron con agua destilada y se concentraron con tubos Amicon Ultra 5K (Millipore; Bedford, USA). La trx purificada se guardó a -20°C.

5.23 Secuenciación de novo de la tiorredoxina de *T. crassiceps*.

Una alícuota de Trx se sometió a electroforesis en un gel de acrilamida al 16% en condiciones desnaturalizantes. Al término de la corrida, se cortó la banda correspondiente a la tiorredoxina, se destiño, se sometió a reductores y se carbamido-metiló. Finalmente, se digirió la proteína con tripsina porcina modificada

y se analizaron los espectros MS/MS obtenidos por espectrometría de masas en tándem (LC/ESI-MS/MS) mediante la búsqueda en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), así como la base de datos GeneDB (<http://www.genedb.org>) en la cual se encuentran alojados los genomas de diversos platelmintos parásitos.

5.24 *Ensayo de actividad de la tiorredoxina.*

El ensayo para evaluar la actividad de Trx se basa en su propiedad de oxidoreductasa de disulfuros y su capacidad para reducir a la insulina en presencia de ditioneitol (DTT) como fuente de electrones [148]. La mezcla de reacción contiene una alícuota de Trx e insulina humana 100 μ M en Tris-HCl 0.1 M EDTA 2 mM (pH 7.8) en un volumen final de 500 μ L. La reacción se inició al añadir DTT 0.33 mM y la turbidez producida por la precipitación de las cadenas β de la insulina se monitoreó a 650 nm.

Adicionalmente, se midió la actividad de Trx mediante el ensayo propuesto por Arner y colaboradores [149] en el cual se sigue el consumo de NADPH a 340 nm. La mezcla de reacción consistió en NADPH 45 μ M, una alícuota de Trx 100 μ M en Tris-HCl 0.1 M EDTA 1 mM (pH 7.8) en un volumen final de 500 μ L. Se inició la reacción mediante la adición de TcTGR. Si la cantidad de tiorredoxina fue baja, se administró insulina humana a una concentración final de 11 nM, con el objetivo de reciclarla.

La TcTGR se purificó de cisticercos de *T. crassiceps* de acuerdo a lo reportado por Rendón y colaboradores [104]. Las tiorredoxinas usadas se adquirieron en Sigma-Aldrich y la de *Plasmodium falciparum* fue donada por la Dra. Katja Becker.

5.25 Obtención y alineamiento de secuencias de tiorredoxinas de platelmintos parásitos.

Para obtener las secuencias de las Trx y TGR, se realizó un blast-p en las bases de datos de los genomas de *S. mansoni*, *S. japonicum*, *E. granulosus* y *T. solium* (GeneDB, <http://www.genedb.org>) [150] usando a la Trx1 humana (HsTrx, PDB 3TRX) y a la TrxR humana (HsTrxR, PDB 2CFY) para llevar a cabo la búsqueda. La secuencia de la Trx de *Spirulina subsalsa* (SsTrx) se obtuvo de las bases de datos del NCBI (ID: WP_017305605.1). Las secuencias obtenidas y la secuencia obtenida *de novo* de la Trx de *T. crassiceps* (TcTrx) se alinearon con el software Clustal W utilizando los parámetros preestablecidos [151] mientras que el alineamiento fue editado por el programa JalView [152].

5.26 Modelado de la TcTrx y del complejo de interacción TcTrx-TGR.

Los modelos estructurales de las Trx utilizadas para los alineamientos y la TGR de *T. solium* (TsTGR) se obtuvieron mediante el servidor automatizado Swiss-Model (<http://www.swissmodel.expasy.org>) [153-155]. La calidad global y local de los modelos se estimó de acuerdo a los programas Qmean [156], Analea [157] y Gromos [158], incluidos dentro del servidor automatizado. Se evaluó el potencial electrostático de superficie de los modelos obtenidos, así como de las estructuras cristalográficamente resueltas de las Trx de *P. falciparum* (PDB 1YSR), humano (PDB 3TRX) y *E. coli* (PDB 2TRX) mediante el programa ABPS [159-161]. Las representaciones moleculares se generaron utilizando el software PyMol (<http://www.pymol.org>). El modelo de sobreposición e interacción intermolecular entre la TsTrx y TsTGR se obtuvo a partir de la estructura cristalográfica de la interacción homóloga HsTrx-HsTrxR (PDB:3QFA) [162].

6. RESULTADOS

6.1 LOS CAMBIOS EN EL ESTADO REDOX PROMUEVEN UN CAMBIO EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS DISTINTAS ESPECIES DE GLUTATIÓN.

6.1.1 El NAC inhibe el efecto letal ocasionado por el AF en los cisticercos mientras que el BSO lo potencia.

Para evaluar la importancia del glutati3n en la viabilidad de los cisticercos de *T. crassiceps*, los metac3stodos fueron preincubados durante 3 horas en presencia de: i) N-acetil ciste3na (NAC) 10 mM, un tiol de bajo peso molecular promotor de la s3ntesis de glutati3n [163] y con propiedades antioxidantes [164] 3 ii) en presencia de butionina sulfoximina (BSO) 100 μ M, un inhibidor de la glutamil-ciste3n ligasa [165], enzima responsable del primer paso de bios3ntesis del glutati3n. Despu3s de la preincubaci3n se adicion3 al medio AF (0, 2, 4 y 10 μ M) y se incub3 por 13 horas m3s. Previamente reportamos que en este tiempo se tiene el 100% de letalidad cuando se incuban a los cisticercos con la concentraci3n m3s alta de AF utilizada [137].

La preincubaci3n con NAC suprime el efecto letal del AF en los cisticercos ya que el 100% de la poblaci3n permanece viable a pesar de encontrarse en presencia de concentraciones letales de AF (Fig 1a). Por otro lado, en el caso de los cisticercos preincubados con AF y BSO se present3 una mayor susceptibilidad al tratamiento con AF ya que el 100% de la poblaci3n de metac3stodos muri3 con 4.0 μ M de AF (Fig 1a). En los controles de NAC y BSO probados en ausencia de AF no se apreciaron alteraciones en la viabilidad de los cisticercos. Estos datos, sugieren que el glutati3n tiene un papel importante en la viabilidad de los cisticercos. Sin embargo es importante conocer si estos compuestos tienen alg3n efecto sobre la reductasa.

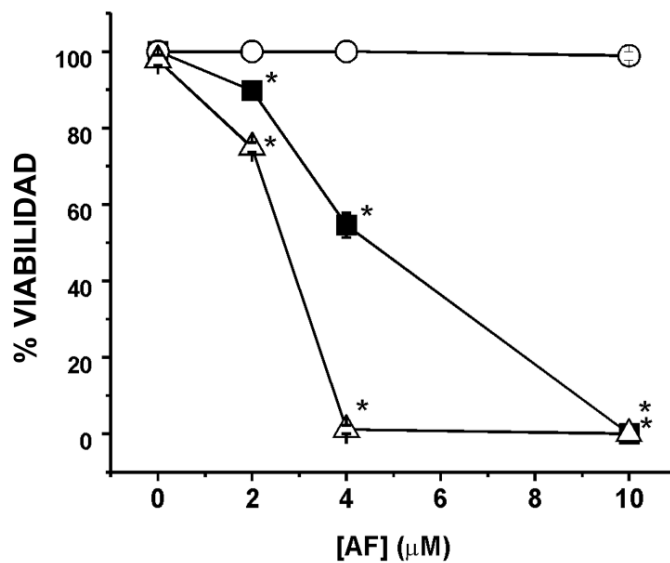


Figura 1. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la viabilidad del cisticerco de *T. crassiceps*. Cisticercos de *T. crassiceps* fueron preincubados por 3 h con una concentración final de NAC 10 mM (círculos vacíos), BSO 100 µM (triángulos vacíos), ó DMSO (vehículo del AF) (cuadros llenos). Después, se adicionó AF al medio en las concentraciones indicadas y se incubaron en las mismas condiciones de mantenimiento por 13 h más. Al finalizar, se recuperaron los cisticercos y se examinó su viabilidad (ver *Material y métodos*). Cada punto representa la media \pm error estándar (n=4). Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

Previamente, ha sido reportado el efecto inhibitorio de las sales derivadas de oro como AF [141], así como de otros compuestos nucleofílicos [126], sobre las isoformas de las tiorredoxinas reductasas dependientes de selenocisteína. En el caso específico de la TGR, se ha observado que esta enzima en estado puro se inhibe con concentraciones nanomolares [125,136,137] mientras que en condiciones *in vivo* se requiere AF en una concentración 10 µM para inhibir el 100% de la enzima en el cisticerco de *T. crassiceps* [137] y en el cisticerco de *T. solium* (Fig 2).

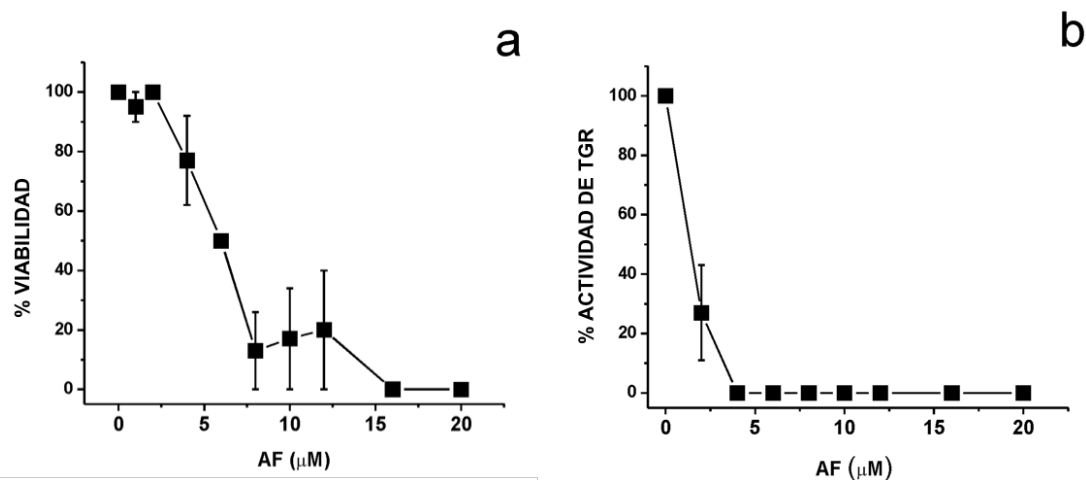


Figura 2. Efecto del AF en la viabilidad y la actividad de la TGR del cisticerco de *T. solium*. Una muestra de cisticercos de *T. solium* obtenidos de cerdos infectados naturalmente se incubaron por 13 horas en presencia de AF a las concentraciones indicadas en la figura. Acabado el tiempo de incubación, los cisticercos se colectaron y se dividieron en facciones para evaluar su viabilidad (a) y la actividad remanente de la TGR en un extracto crudo (b). Cada punto representa la media \pm error estándar (n=4).

6.1.2 El NAC atenúa el efecto inhibitorio del AF sobre la TGR mientras que el BSO lo potencia.

Para analizar el efecto del NAC y el BSO en la inhibición de la TGR por el AF, se preincubó una población de cisticercos en presencia de dichos compuestos antes del tratamiento con 2, 4 y 10 µM de AF. Acabado el tiempo de exposición, los cisticercos fueron recuperados y homogeneizados para determinar la actividad enzimática residual de la TGR en el extracto crudo. Con AF en presencia de NAC se observó aproximadamente un 50% de actividad residual de la TGR, mientras que BSO y AF, se observó un 100% de inhibición a partir de 4.0 µM de AF. (Figura 3).

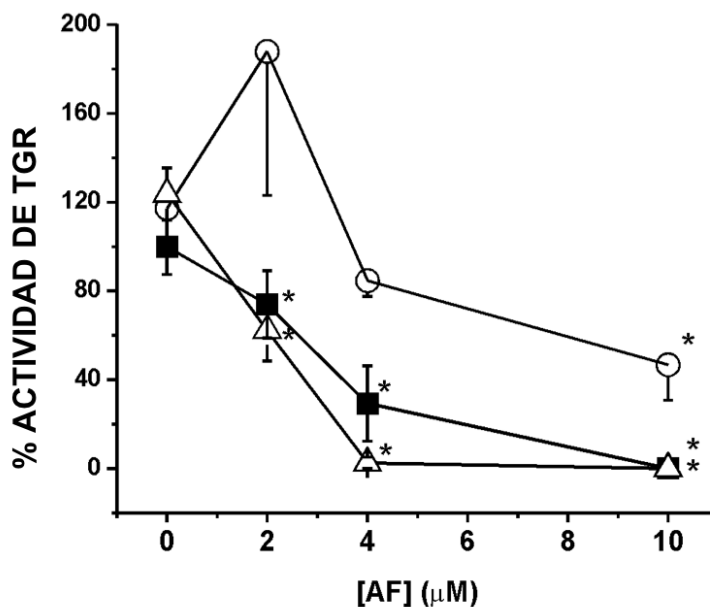


Figura 3. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la actividad de la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) del cisticerco de *T. crassiceps*. El esquema de incubación y tratamiento se explica en el pie de la figura 1. Al término del tratamiento los cisticercos fueron recuperados, se homogeneizaron y se obtuvo el extracto crudo para determinar la actividad de la TGR después de cada tratamiento como se describe en *Materiales y métodos*. Los símbolos representan la incubación en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (círculos vacíos) ó BSO-AF (triángulos vacíos). Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

Para descartar que si el NAC o el BSO pueden interactuar directamente con el AF, alterando con ello la concentración efectiva de este fármaco, se preincubó AF en presencia de cisteína, NAC y glutatión (tioles de bajo peso molecular) y de BSO en condiciones equivalentes a los esquemas de incubación usadas en los experimentos con cisticercos. Los ensayos se hicieron tanto al pH de mantenimiento (pH = 7) como a pH fisiológico del cisticerco (pH = 8.2), esto último con el fin de evaluar si la reactividad de los compuestos aumenta conforme ingresan al parásito. Los resultados mostrados en la figura 4 muestran que ninguno de los compuestos, afectan la capacidad inhibitoria del AF sobre la TGR.

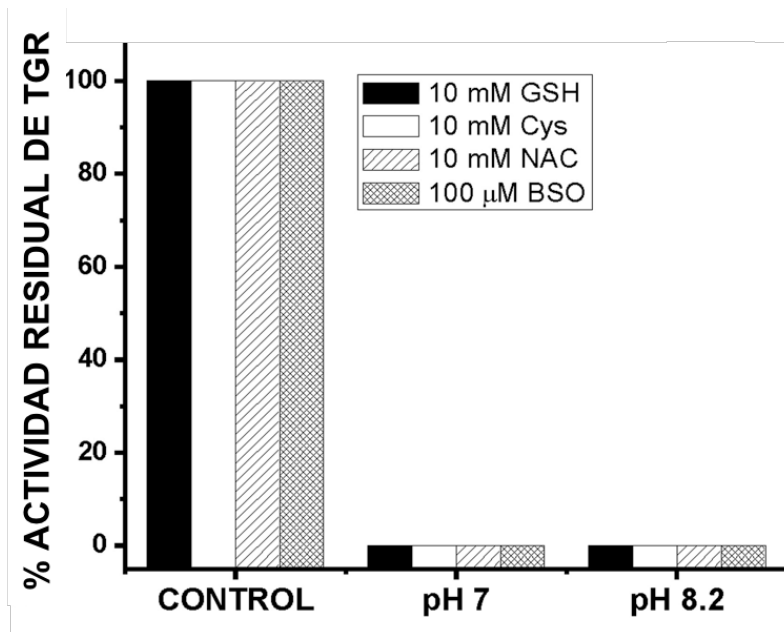


Figura 4. Los tioles de bajo peso molecular y el BSO no quelan al AF. Se incubó AF 1 μ M por 3 h en presencia de cisteína (Cys, barra blanca), N-acetil cisteína (NAC, barra rayada) ó glutatión reducido (GSH, barra negra) a una concentración final de 1 mM respectivamente y con butionina sulfoximina 10 μ M (BSO, barra con doble raya); en amortiguador Tris/HCl buffer 200 mM + EDTA 2 mM (a pH 7 y a pH 8.2), a 37°C bajo condiciones aeróbias y en oscuridad. Después del periodo de incubación, una alícuota de cada mezcla fue usada para evaluar la capacidad del AF, para inhibir a la TGR pura.

6.1.3 El BSO potencia la disminución de la concentración interna del glutatión ocasionado por el AF mientras que el NAC lo mantiene en condiciones basales.

Para determinar si el efecto protector del NAC se debe a su capacidad de promover la síntesis de glutatión ó a su actividad potencial para depurar directamente ERO (ver adelante), se midieron los equivalentes de glutatión internos (GSH + 2 x (GSSG)) (Figura 5) en cisticercos preincubados con NAC ó BSO y posteriormente expuestos a AF. La cantidad de glutatión en un cisticerco, en

condiciones fisiológicas, es de 7 ± 1 nmolas de equivalentes de glutatión, lo que corresponde a una concentración de 1.2 ± 0.3 mM ($n=4$) (Figura 5). Por si mismo, el AF disminuye el contenido de glutatión interno de una manera dosis dependiente y este efecto es potenciado de manera significativa en el caso del tratamiento, donde se administró de manera conjunta con el BSO. Cuando se administró AF en presencia de NAC, no se observó un cambio significativo en los niveles de glutatión interno. Finalmente, en los tiempos de incubación empleados, tampoco se observó un cambio significativo en los cisticercos expuestos solo a NAC ó BSO.

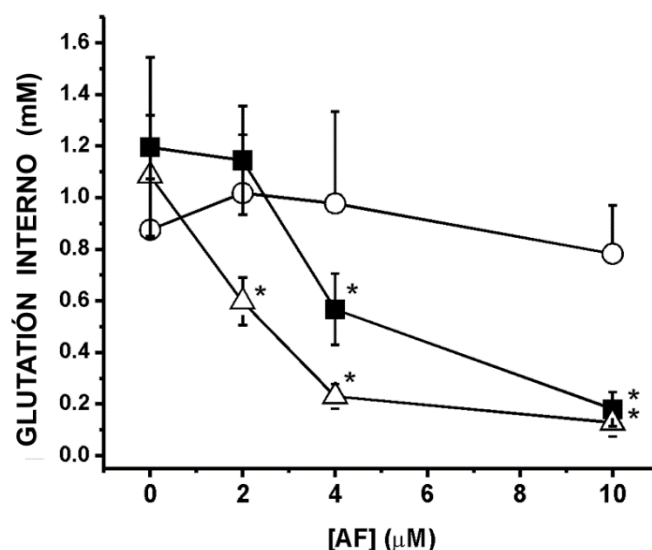


Figura 5. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en el contenido de equivalentes de glutatión internos en el cisticercos de *T. crassiceps*. El esquema de incubación y tratamiento se explica en el pie de la *Figura 1*. Al término del tratamiento los cisticercos fueron recuperados y se determinó la concentración de equivalentes internos de glutatión ([GSH] + 2[GSSG]) como se describe en *Materiales y métodos*. Los símbolos representan la incubación en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (círculos vacíos) ó BSO-AF (triángulos vacíos). Cada punto representa la media \pm error estándar ($n=4$). Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

6.1.4 El BSO promueve el aumento en la producción de ERO ocasionado por el AF mientras que el NAC mantiene la producción en niveles fisiológicos.

En principio, los resultados antes expuestos sugirieron que el efecto protector del NAC podría deberse a su actividad potencial para depurar ERO y con ello contender contra el estrés oxidante.

Para evaluar esta hipótesis, se determinó la producción de ERO en cisticercos tratados (Figura 6). En presencia del AF, se observó un incremento significativo de ERO, mientras que en el tratamiento BSO-AF la producción de ERO sufrió un incremento de ocho veces lo observado en condiciones basales. En este caso, sí se observó un aumento de 4 veces de ERO con respecto al grupo control, en cisticercos tratados únicamente con BSO. Por el contrario, no se observó un cambio significativo en la producción de ERO con respecto al grupo en condiciones de mantenimiento.

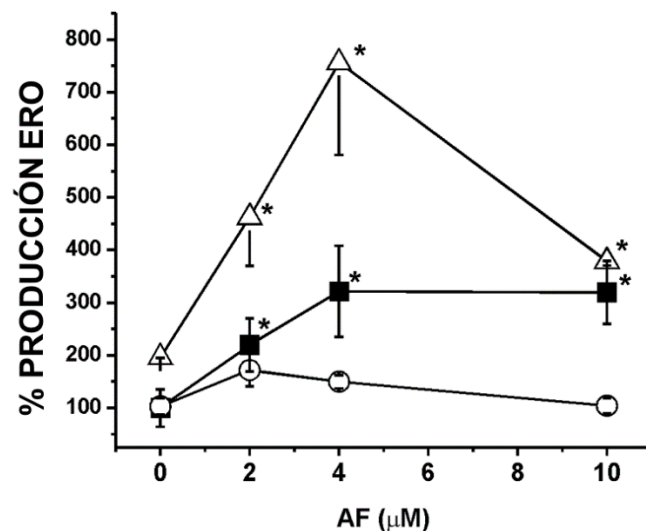


Figura 6. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el cisticercos de *T. crassiceps*. El esquema de incubación y tratamiento se explica en el pie de la *Figura 1*. Al término del tratamiento los cisticercos fueron recuperados y se evaluó la presencia de ERO utilizando dicloro-fluoresceína diacetato 10 μM (H₂DCF-DA) como se describe en

Materiales y métodos. Los símbolos representan la incubación en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (círculos vacíos) ó BSO (triángulos vacíos). Cada punto representa la media \pm error estándar (n=4). Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

Aunque estos resultados sugieren que NAC participa directamente en la depuración de ERO, se ha reportado que la depuración de ERO mediada por NAC es despreciable [166]. Considerando esto, se diseñó un experimento para evaluar si el NAC (y otros tioles como la Cys) tienen la capacidad de transferir electrones directamente al GSSG. Como lo muestra la figura 7, se observó que estos tioles en exceso pueden reducir directamente al GSSG, indicando que éste podría ser el mecanismo por el cual el NAC protege al cisticerco del estrés oxidante generado por la inhibición de la TGR.

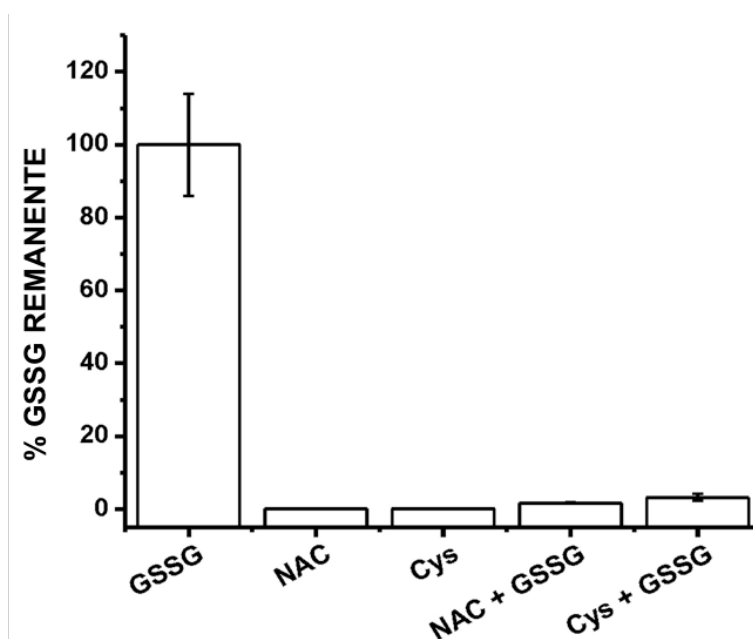


Figura 7. El NAC y la cisteína tienen la capacidad de reducir directamente al GSSG. Se incubó una solución de GSSG 100 μ M en Tris/HCl buffer 200 mM EDTA 2 mM (pH 8.2) en presencia de NAC ó cisteína a una concentración final de 1 h, en condiciones aeróbicas, oscuridad y 37°C. Posteriormente se adicionó 2-vinilpiridina 180 mM (2-VP) y se incubó por 1 h a 25°C para derivatizar el glutatión reducido generado por los tioles. Finalmente el GSSG remanente se determinó de acuerdo a la sección *Material y métodos*. Cada medición se realizó por triplicado.

6.1.5 El AF promueve el incremento de las formas oxidadas del glutatión

Una consecuencia lógica de la inhibición de la TGR por parte del AF es la acumulación de las formas oxidadas del glutatión (de la tiorredoxina) que conduciría a una disminución de la tasa de depuración de ERO a través de las peroxidasas dependientes de estos sustratos (en su forma reducida), dando lugar a un aumento progresivo en las ERO presentes al interior del cisticerco como se demuestra en la Figura 6.

Para corroborar esta predicción, las principales formas oxidadas del glutatión fueron cuantificadas: el disulfuro de glutatión interno (GSSG) (Figura 8a) y glutatión acomplejado a tioles proteicos (PSSG) (Figura 8b). Adicionalmente a esto, se determinó el GSSG presente en el medio de mantenimiento (Figura 8c) para analizar si el cisticerco lo excreta. En condiciones fisiológicas, la distribución de las especies oxidadas del glutatión fue la siguiente: GSSG 0.009 ± 0.001 mM y PSSG 0.044 ± 0.005 mM PSSG al interior del cisticerco mientras que en el medio se detectó la presencia de GSSG 0.045 ± 0.016 mM GSSG ($n=4$).

En presencia de AF $2 \mu\text{M}$, se encontró un incremento significativo, tanto de GSSG interno como de PSSG (Figuras 8a y 8b, respectivamente). Sin embargo, a concentraciones mayores de AF, ambas formas regresaron a una concentración basal. En este caso, se observó el mismo fenómeno en los cisticercos tratados con BSO más AF. Por el contrario, en el caso del tratamiento NAC-AF las diferentes especies oxidadas de glutatión se mantuvieron en condiciones fisiológicas. Es posible notar que, contrariamente a lo esperado, no hubo un aumento debido a la inhibición total de la TGR en el caso de los tratamientos de AF y BSO-AF. De igual modo, tampoco se vió reflejado dicha inhibición en el caso del glutatión acomplejado a proteínas.

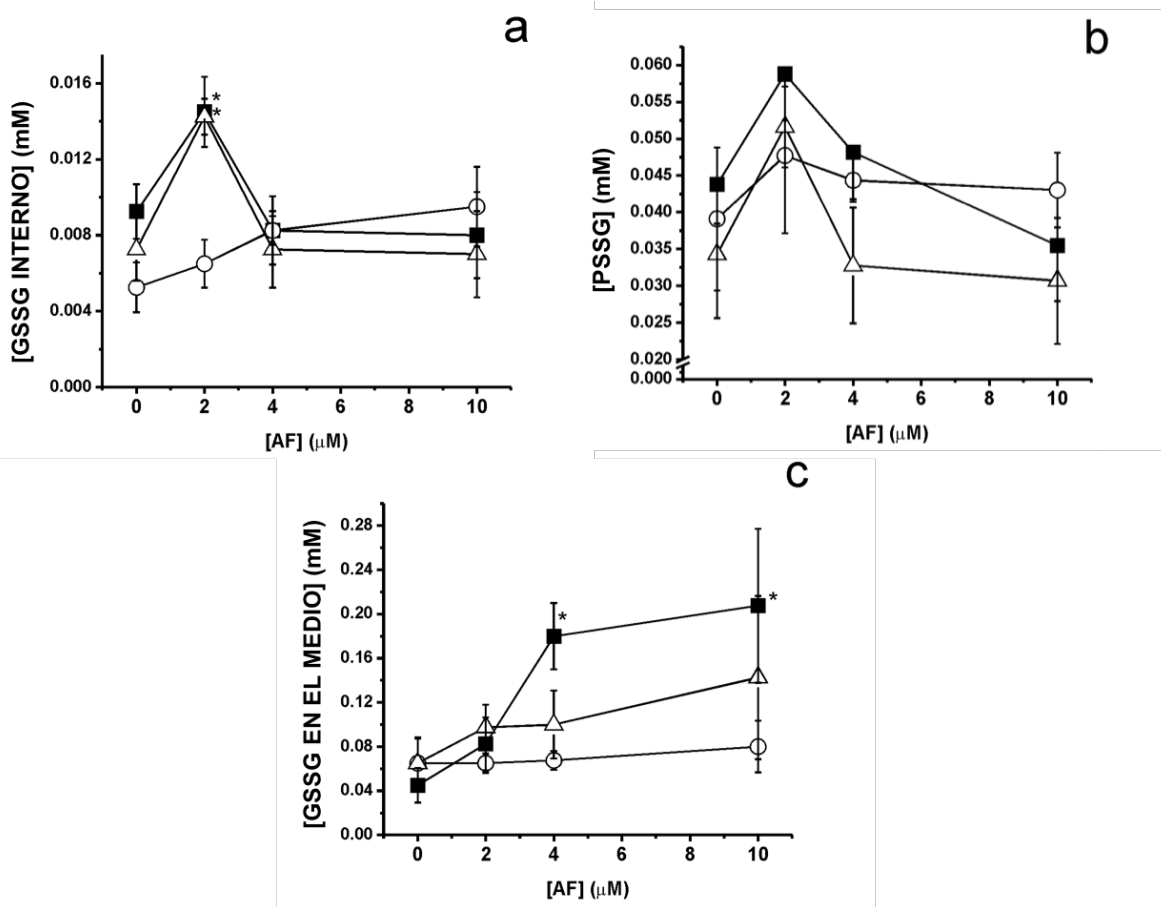


Figura 8. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la aparición de las formas oxidadas de glutación en el cisticerco de *T. crassiceps*. El esquema de incubación y tratamiento se explica en la *Figura 1*. Al término del tratamiento los cisticercos fueron recuperados y procesados como se describe en *Materiales y métodos* para la cuantificación del disulfuro de glutación (GSSG) (a), del glutación acomplejado a proteínas (PSSG) y del GSSG presente en los medios de mantenimiento donde fueron incubados los cisticercos (c). Los símbolos representan la incubación en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (círculos vacíos) ó BSO (triángulos vacíos). Cada punto representa la media \pm error estándar (n=4). Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

En resumen, ambos datos no explican el decremento en el contenido de glutación interno observado con anterioridad (Figura 5), por lo que se exploró la

posibilidad de que el glutatión faltante pudiera haber sido exportado al medio de mantenimiento.

En la figura 8c mostramos la concentración de GSSG en el medio de mantenimiento bajo los tratamientos antes descritos. Se observó una concentración basal de 0.045 ± 0.016 mM ($n=4$), que corresponde a cisticercos vivos. Debido a que se observó que la pared corporal de los cisticercos permaneció intacta, es posible sugerir que el cisticerco exporta de manera fisiológica GSSG a su medio circundante. En el caso de los cisticercos tratados con AF y BSO-AF, se observó un incremento significativo en el GSSG del medio, a concentraciones mayores a AF 4 μ M mientras que en el caso del tratamiento de NAC-AF no se detectó cambio alguno en la concentración del disulfuro, independiente de la concentración de AF. En todos los casos se examinaron los medios para descartar contaminación bacteriana (y evitar una fuente adicional de GSSG) lo que indica que el origen del GSSG es el cisticerco.

Los datos anteriores, sugieren que: i) los cisticercos exportan GSSG al medio en condiciones basales, ii) cuando hay condiciones oxidantes (Figura 6) ocurre una acumulación de las especies oxidadas de glutatión al interior del cisticerco, iii) cuando aumenta el estrés oxidante, ocurre una traslocación de GSSG al medio circundante (Figura 8c) con el fin de mantener constante la concentración de las formas oxidadas del glutatión, iv) el NAC puede reducir directamente al GSSG (Figura 7), evitando su acumulación al interior del cisticerco (Figura 8a).

6.1.6 El AF disminuye la relación [GSH]/[GSSG] y genera un ambiente redox más oxidante al interior del cisticerco.

Para evaluar las condiciones redox al interior del cisticerco usamos dos parámetros: la relación [GSH]/[GSSG] [167] y el potencial redox del glutatión [168]. En mamíferos, se ha reportado una relación [GSH]/[GSSG] alrededor de 100:1 en el compartimiento citosólico [43,146] mientras que el potencial redox del glutatión

en estado estacionario ha sido reportado en un rango de -260 to -200 mV a pH 7 [54,168]. Dado que este último parámetro está relacionado con el pH citosólico, determinamos el pH interno del cisticerco obteniendo un valor de 8.2 ± 0.1 ($n=10$).

En condiciones basales, se encontró en los cisticercos una relación [GSH]/[GSSG] de 131:1 (Figura 9a), correspondiente a un potencial redox de -338 ± 7 mV a pH 8.2 y 37°C (Figura 9b) y de -292 ± 9 mV en condiciones estándar (pH = 7 a 25°C). Aunque existe una ligera diferencia entre los valores obtenidos en presencia de solo NAC ó solo BSO, dichas diferencias no son significativas con respecto al control. Sin embargo, en presencia de AF, la relación [GSH]/[GSSG] disminuyó, aunado a un menor potencial redox (menos negativo), lo que indica una transición a condiciones más oxidantes al interior del cisticerco, en concordancia con la inhibición de la TGR.

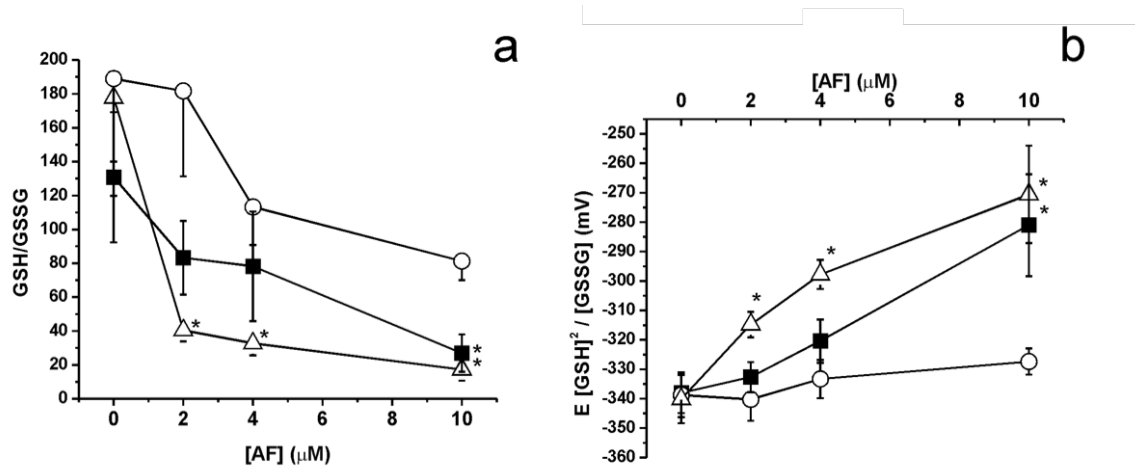


Figura 9. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en el estado redox del cisticerco de *T. crassiceps*.

El esquema de incubación y tratamiento se explica en el pie de la *Figura 1*. Al término del tratamiento los cisticercos fueron recuperados y se evaluó la relación [GSH]/[GSSG] (a) así como el potencial redox del glutati6n (b) en condiciones fisiol6gicas (37°C y pH 8.2) como se describe en *Materiales y m6todos*. Los s6mbolos representan la incubaci6n en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (c6rculos vac6os) 6 BSO (tri6ngulos vac6os). Cada punto representa la media \pm error est6ndar ($n=4$). Se consider6 que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

Cuando analizamos el tratamiento de BSO más AF 4 μ M observamos que el 100% de la población de cisticercos mueren (Figura 1). Esto correlaciona con la inhibición total de la actividad de la TGR *in vivo* (Figura 3), el decremento de la concentración interna de equivalentes de glutatión (Figura 5) y el aumento significativo de la presencia de ERO (Figura 6). En estas condiciones, la relación [GSH]/[GSSG] estuvo alrededor de 33:1, lo que se traduce en un valor E_h de -297 ± 5 mV (Figura 9).

Por otro lado, en el tratamiento con NAC y AF 10 μ M encontramos una relación [GSH]/[GSSG] de 81:1, y un valor E_h -327 ± 5 mV (Figura 9) con una concentración interna de equivalentes de glutatión (Figura 5) y una producción de ERO (Figura 6) en niveles comparables con los controles. En este caso, estos valores corresponden con una viabilidad del 100% de la población de cisticercos (Figura 1) y una actividad residual de TGR del 50% (Figura 3).

Tomando estos datos juntos, sugerimos que la relación [GSH]/[GSSG] mínima para mantener al 100% de la población de cisticercos viables debe estar alrededor de 81:1 (correspondiente a un valor de E_h -327 mV) (Figuras 3 y 9) y que al disminuir esta relación comienza a comprometerse la viabilidad del cisticerco, lo que llevaría a la activación de mecanismos protectores que observamos en los tratamientos de AF y BSO-AF como son: i) la protección inicial de los tioles proteicos de la sobreoxidación mediante la glutationilación (Figura 8b) seguido de ii) un aumento en la excreción de GSSG al medio (Figura 8c). Ambos procesos implicarían la disminución de la suma total de equivalentes internos de glutatión (Figura 5).

6.1.7 El AF disminuye los equivalentes de glutatión internos y ocasiona la redistribución de sus distintas formas.

De acuerdo con nuestros resultados, podemos notar que la concentración de los equivalentes internos de glutatión es similar a la reportada en otros organismos (Figura 5) y que su distribución cambia en ausencia de una TGR funcional debido a su inhibición por AF (Figura 6). Puesto que conocemos el número exacto de cisticercos en cada muestra, es posible conocer la cantidad de glutatión (en nanomolas) y el porcentaje correspondiente a cada una de sus formas (GSH, GSSG y PSSG) en un cisticerco aislado. (Figuras 10a y 10b). Bajo condiciones fisiológicas (y si consideramos al glutatión total interno como 100%) alrededor del 95% de la poza de glutatión se encuentra en su forma reducida mientras que el restante 5% corresponde a las formas oxidadas (GSSG, PSSG) (Figura 10b). Esta distribución es similar a la observada en cisticercos preincubados únicamente en presencia de NAC ó BSO. Sin embargo, en los cisticercos tratados con AF, se observó un incremento dosis-dependiente de la forma disulfuro y de proteínas glutatióniladas cuando se observan los datos normalizados (Figura 10b). En el caso de los cisticercos tratados con AF más BSO se obtuvo un ligero aumento adicional al observado sólo con AF, mientras que el tratamiento NAC-AF previene que exista un cambio en la distribución de las distintas especies de glutatión.

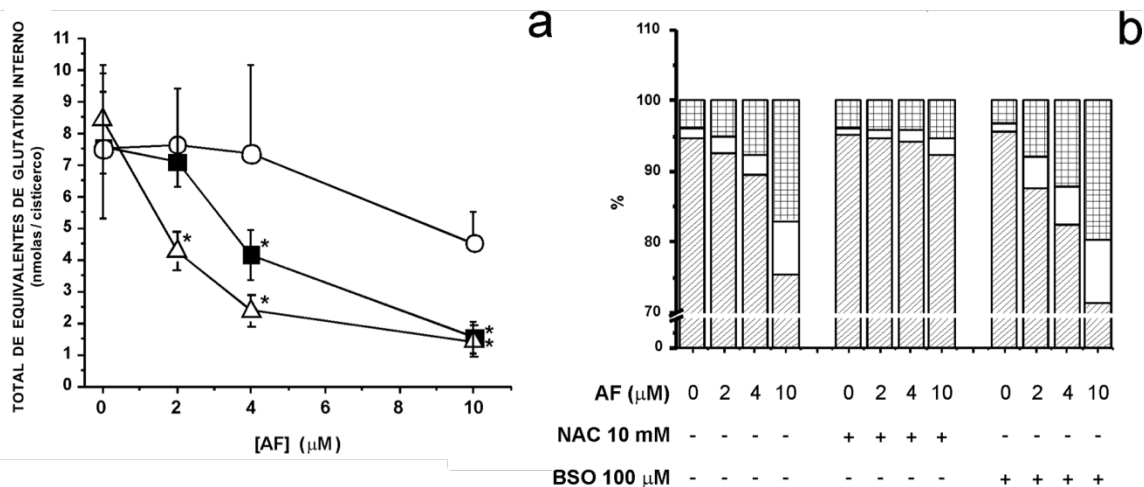


Figura 10. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la distribución interna de las especies de glutatión en el cisticerco de *T. crassiceps*. Se muestra la cantidad total de glutatión al interior de un solo cisticerco (a). Los símbolos representan la incubación en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (círculos vacíos) ó BSO (triángulos vacíos). También se muestra la contribución relativa de cada especie al total interno (b): GSH (rayas), GSSG (Blanco) y PSSG (cuadros). Los resultados mostrados son el producto de cuatro mediciones independientes. Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

6.1.8 El AF incrementa la tasa de expulsión del glutatión oxidado y promueve la síntesis de novo de glutatión.

Dado que nuestros experimentos se realizaron en condiciones de esterilidad y tomando las precauciones para evitar contaminación por parte de metabolitos del hospedero, podemos conocer la poza total de glutatión por cisticerco, al considerar la cantidad de glutatión interno y el glutatión presente en el medio de mantenimiento (Figuras 11a y 11b). Si consideramos la cantidad total de glutatión por cisticerco, observamos que el AF promueve la síntesis de glutatión (Figura 11a), a diferencia de los tratamientos solo con NAC y BSO (o en combinación con AF) en los cuales no se observó un cambio significativo con respecto a los controles. Esto podría deberse a que el NAC puede reducir directamente al GSSG y con ello ayuda a mantener el estado redox del cisticerco (Figura 7) por lo que no se requiere síntesis

de glutatión *de novo*. Por otro lado, aunque el estrés oxidante generado por el AF puede promover la síntesis de las enzimas responsables de la síntesis de glutatión, ésta no ocurre debido a que el BSO inhibe la primera enzima de síntesis, lo que implica que el glutatión no aumente, contrario de lo observado en el tratamiento con solo AF.

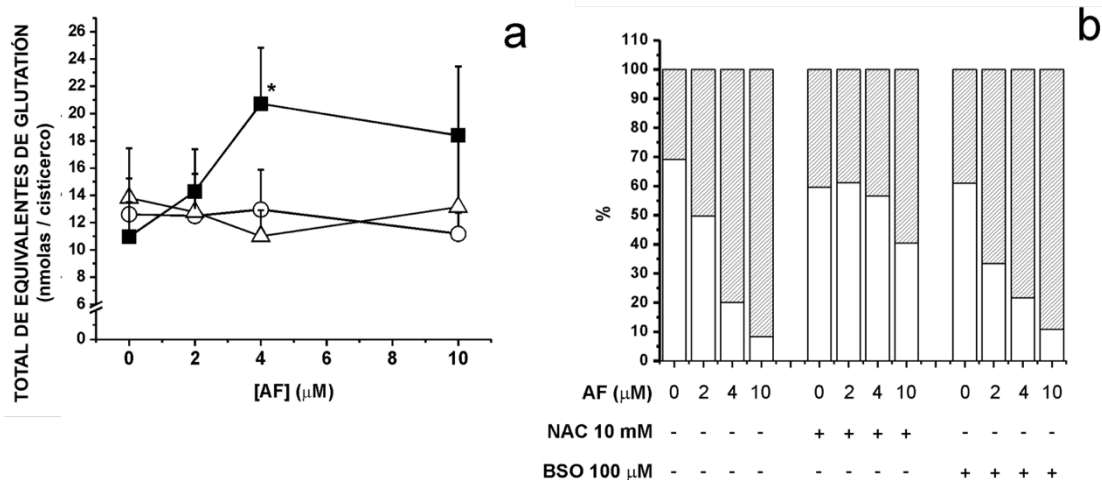


Figura 11. Efecto del AF, NAC-AF y BSO-AF en la distribución global de las especies de glutatión en el cisticerco de *T. crassiceps*. Se muestra la cantidad total de glutatión sintetizado por un cisticerco (a), los símbolos representan la incubación en presencia de AF (cuadros llenos), NAC-AF (círculos vacíos) ó BSO (triángulos vacíos). Se muestra también la ubicación de este tripéptido (b) al interior del cisticerco (barra blanca) o en el medio (barra rayada). Los resultados mostrados son el resultados de cuatro experimentos independientes. Se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (*) cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente.

Cuando comparamos el glutatión interno remanente en el cisticerco y el glutatión expulsado al medio, observamos que el tratamiento con solo AF o AF en presencia de BSO promueven la salida de glutatión, mientras que en los cisticercos tratados con la combinación NAC-AF no hay un cambio significativo en la distribución interna y externa (Fig. 11b). Esto puede ser atribuido a la capacidad del NAC para reducir directamente al GSSG (Figura 7) y con ello evitar la acumulación de ERO al interior del cisticerco (Figura 6), manteniendo su estado redox dentro de

intervalos fisiológicos (Figura 9), por lo que no hay necesidad de hacer una redistribución interna (Figura 10) o global (Figura 11) de las diferentes especies de glutatión.

Uno de los objetivos principales de este trabajo es ofrecer una visión integral de la importancia de los sistemas dependientes de glutatión y tiorredoxina en la homeostasis redox del cisticerco de *T. crassiceps*. Este trabajo aporta información sobre la función del glutatión en este sistema. Si lo complementamos con la información que recientemente se ha obtenido de la secuenciación del genoma de otros cestodos, podemos tener un panorama más completo de cómo funcionan los sistemas redox en estos parásitos.

6.1.9 Los genomas de los platelmintos parásitos revelan nuevos elementos para entender el metabolismo del glutatión.

La importancia médica y económica de las parasitosis ha impulsado la secuenciación y liberación de los genomas de diversos cestodos como son *T. solium*, *E. granulosus*, *E. multilocularis* e *Hymenolepis microstoma* [109]. Estas bases de datos nos han permitido hallar homólogos para diversas proteínas cruciales para entender el metabolismo del glutatión:

- 1) *Proteína homóloga a la enzima γ -glutamyl transpeptidasa (GGT)* (Cuadro 1). En animales, esta enzima es responsable de la degradación exógena del glutatión [47], así como de la obtención de intermediarios necesarios para su síntesis. Este homólogo fue encontrado en todos los genomas de platelmintos parásitos analizados y, a pesar de presentar baja identidad con respecto a la enzima caracterizada en humano y rata (25 y 26 % de identidad respectivamente, considerando al homólogo en *T. solium*), se observó que el porcentaje de identidad es alto entre los platelmintos, alcanzando mayor identidad entre los cestodos (alrededor del 80% de identidad) (Cuadro 1). La presencia de esta enzima sugiere que, al ser potencialmente la degradación

del glutati3n ex3gena, los par3sitos pueden aprovechar el glutati3n proveniente del hospedero.

% ID	HsGGT-1	RnGGT	SmGGT	SjGGT	HmGGT	EgGGT	EmGGT	TsGGT
HsGGT-1	-							
RnGGT	79.44	-						
SmGGT	22.88	23.27	-					
SjGGT	21.65	22.72	69.39	-				
HmGGT	23.49	22.67	33.33	27.49	-			
EgGGT	25.13	25.81	31.25	27.72	61.73	-		
EmGGT	24.92	25.38	31.25	27.50	61.43	97.44	-	
TsGGT	25.57	26.69	35.55	28.30	62.03	82.05	81.51	-

Cuadro 1. γ - glutamil transpeptidasa en platelmintos par3sitos. Abreviaturas: Hs, *Homo sapiens*; Rn, *Rattus norvegicus*; Sm, *S. mansoni*; Sj, *S. japonicum*; Hm, *Hymenolepis microstoma*; Eg, *E. granulosus*; Em, *E. multilocularis*; Ts, *T. solium*.

2) *Hom3logo para la enzima fitoquelatina sintasa (PCS)* (Cuadro 2). Esta enzima es la responsable de la formaci3n de biopol3meros de glutati3n [169] que participan en la detoxificaci3n de metales generadores de ERO [170] y en la eliminaci3n de compuestos generados por la enzima detoxificante de xenobi3ticos; glutati3n S-transferasa (GST) [171].

	AtPCS-1	SmPCS	EmPCS	EgPCS	TsPCS
AtPCS-1	-				
SmPCS	30.63	-			
EmPCS	27.97	30.96	-		
EgPCS	28.11	30.49	96.97	-	
TsPCS	27.04	31.03	80.17	81.2	-

Cuadro 2. Fitoquelatina sintasa en platelmintos parásitos. Abreviaturas: At, *Arabidopsis thaliana*; Sm, *S. mansoni*; Eg, *E. granulosus*; Em, *E. multilocularis*; Ts, *Taenia solium*.

Al observar los datos arrojados por los genomas de platelmintos parásitos, encontramos al menos una proteína homóloga para *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *T. solium* con una identidad del 28%, con respecto a *Arabidopsis thaliana* (Cuadro 2). Aunque se desconoce el papel que tiene, la PCS se ha encontrado en los platelmintos parásitos, no así en los platelmintos de vida libre (turbelarios) [172], por lo que podría deberse a una adaptación a la vida parasitaria. En ensayos preliminares encontramos tres tioles de bajo peso molecular (Figura 12) que presentan un patrón de retención similar al reportado para las fitoquelatinas en *S. mansoni* [171]. Sin embargo, se observó que la abundancia relativa de dichos tioles en los cisticercos de *T. crassiceps* no se modifica cuando el cisticerco se expone a AF. Esto contrasta cuando se observa que la abundancia relativa de tioles de importancia redox (como son la cisteína y el glutatión) disminuyen de manera proporcional a la concentración de AF (Figura 12), sugiriendo que las fitoquelatinas hipotéticas halladas en el cisticerco no tienen participación en la homeostasis redox de *T. crassiceps*.

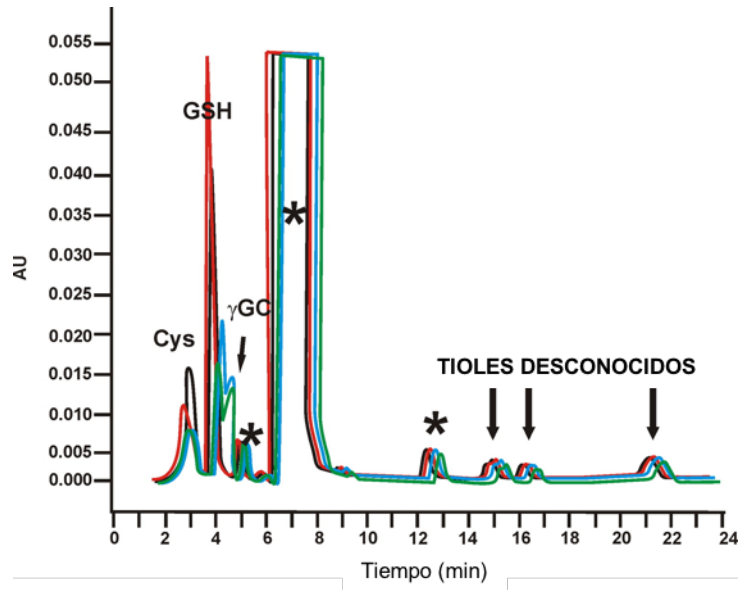


Figura 12. Perfil cromatográfico de los principales tioles de bajo peso molecular del cisticerco de *T. crassiceps*. Una muestra de 200 cisticercos fue incubada en presencia de DMSO (vehículo del AF) (negro), ó 2 (rojo), 4 (azul), ó 10 (verde) μM de AF. Después de 13 h se recuperaron los cisticercos y se procesaron para obtener un extracto desproteneizado, como se describe en Materiales y métodos. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna de fase reversa Simetry C-18 HPLC y la detección de los tioles de bajo peso molecular fueron detectados post-columna utilizando DTNB. Los asteriscos indican los picos asociados a contaminantes del DTT utilizado en el tratamiento de la muestra.

3) *Diversas proteínas homólogas a exportadores de glutatión (Cuadro 3)*. En la figura 8c demostramos que el glutatión sale de manera activa del cisticerco en condiciones fisiológicas por lo que realizamos una búsqueda de los principales transportadores estudiados en el proceso de traslocación del glutatión al exterior de la célula [173]. Los homólogos encontrados en el genoma de *T. solium* se enlistan en el cuadro 3. Esto demuestra que los platelmintos poseen el mecanismo necesario para llevar a cabo la excreción de GSSG y con ello intentar mantener la homeostasis redox al interior del organismo.

	Query	GeneDB ID
TsMRP	HsMRP1	TsM_000837700.1..pep TsM_001031400.1..pep TsM_000995800.1..pep
TsOATP	HsOATP-1 HsOATP-2	TsM_000395500.1..pep TsM_000564800.1..pep TsM_000170900.1..pep
TsABCG2	HsABCG2	TsM_000837700.1..pep

Cuadro 3. Proteínas exportadoras de glutatión en *T. solium*. Abreviaturas: MRP1, proteína de resistencia a multidroga tipo 1; OATP, transportadores de aniones orgánicos; ABCG2, transportadores de cassette de la subfamilia ABCG tipo 2.

6.2 LA INTERACCIÓN ENTRE LA TIORREDOXINA (Trx) Y LA TIORREDOXINA GLUTATIÓN REDUCTASA (TGR) ESTA CONSERVADA EN LOS PLATELMINTOS.

6.2.1 Secuenciación y caracterización de la Trx de *T. crassiceps*.

De la fracción citosólica de extractos de *T. crassiceps*, usando tres diferentes pasos cromatográficos, se pudo aislar una proteína purificada a homogeneidad (331 veces concentrada, 24% rendimiento de la purificación) que es reducida por la TGR en presencia de NADPH y con un peso de 11.5 kDa. (Figura 13).

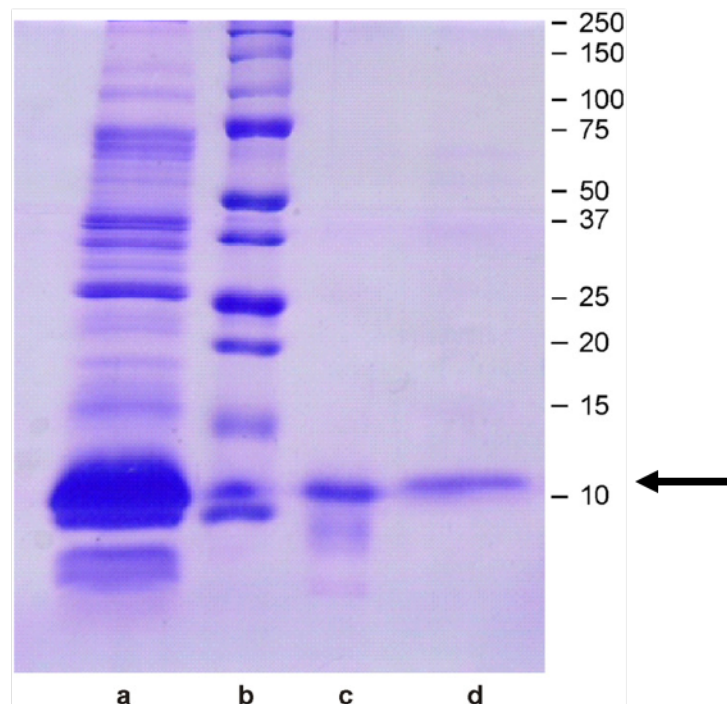


Figura 13. Análisis electroforético de los distintos pasos de purificación de la Trx del cisticerco de *T. crassiceps*. Se analizaron muestras correspondientes a cada uno de los pasos cromatográficos mediante electroforesis en un gel de acrilamida 16% en condiciones desnaturalizantes. Carriles: a) Extracto crudo (22 μ g de proteína), b) cromatografía DEAE (10 μ g de proteína), c) cromatografía Ultrogel (5 μ g de proteína) y d) cromatografía Fenil-sefarosa (8 μ g de proteína). El gel fue teñido y desteñido mediante métodos convencionales. La flecha indica la banda correspondiente a la tiorredoxina nativa.

Para corroborar la identidad de esta proteína se determinó su secuencia *de novo* mediante espectrometría de masas y secuenciación por el método de Edman. En el cuadro 4 se enlistan los fragmentos obtenidos.

Secuencia del péptido obtenido por LC/MS/MS	Match de los péptidos contra la secuencia de la Trx de <i>E. granulosus</i> (número de residuo)
MSAEVVVKQVDGDALEAAIK	1-20
QVDGDALEAAIKGDK	9-23
GDKLLVCDFFATWCGPCK	21-38
LDAMAK	44-49
NENVVFLK	51-58
DVDECQDVAEK	60-70
VFLKVDVDECQDVAEK	54-70
YRVTAMPTLVVFK	71-83
NGNEIGR	84-90
VVGANEASIRELIQANV	91-107

Cuadro 4. Secuencias de los extremos amino y carboxilo terminal y fragmentos LC/MS/MS obtenidos de la Trx del cisticerco de *T. crassiceps*. La cobertura de la secuencia fue del 94.3% considerando a las secuencias de sus homólogos en *E. granulosus* y *T. solium*.

La secuencia resultante de los fragmentos de la tiorredoxina de *T. crassiceps* (TcTrx) es de 101 residuos con una cobertura del 94.3% (considerando el número total de residuos 107 en *T. solium*), observado en las proteínas homólogas de otros platelmintos parásitos como *T. solium* y *E. granulosus* (TsTrx y EgTrx, respectivamente).

Al alinear las tiorredoxinas de diferentes platelmintos podemos observar que en todos los casos se conserva el motivo en el sitio activo característico de las tiorredoxinas WCGPC (Figura 14). Sin embargo, en el caso de las tiorredoxinas de los cestodos, es posible observar dos cisteínas adicionales (Cys²⁸ y Cys⁶⁵) las cuales no se encuentran en las Trx de los diferentes tremátodos (SjTrx, SmTrx y FhTrx). Finalmente, una Cys⁸⁶ adicional está presente exclusivamente en la proteína de *E. granulosus*.

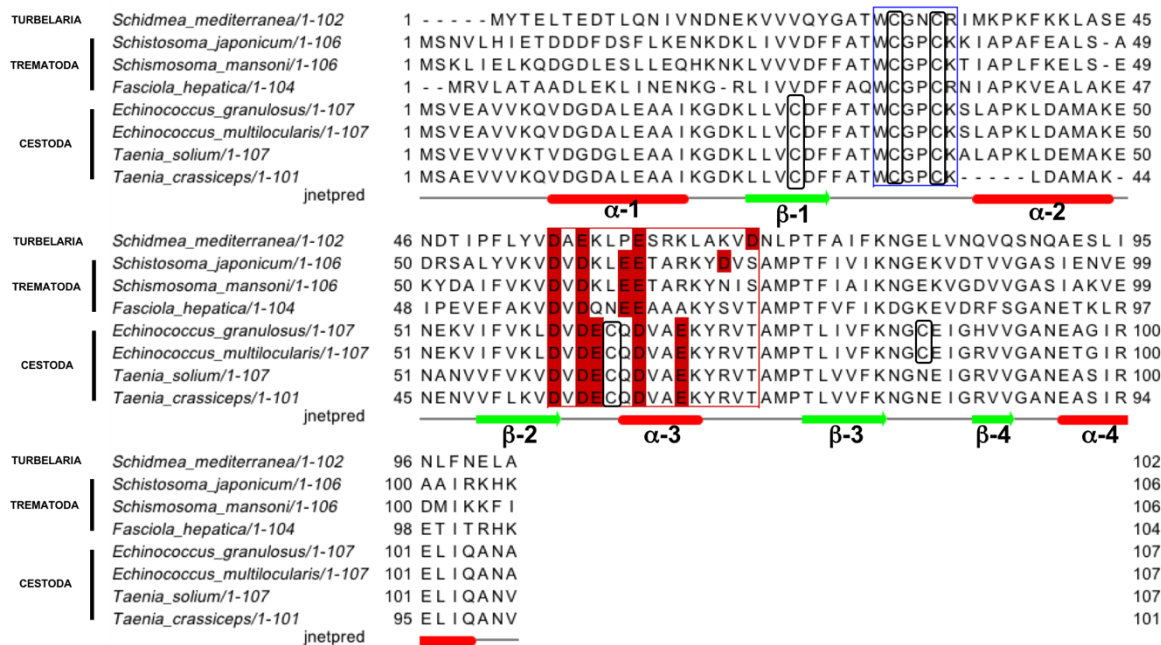


Figura 14. Alineamiento de las secuencias de tiorredoxinas de diferentes platelmintos. Las secuencias se obtuvieron del Proyecto GeneDB (<http://www.genedb.org>) con excepción de *F. hepatica*, la cual se obtuvo de la referencia [174] y *Schidmea mediterranea* (mk4.074720.00.01, SmedGD, <http://smedgd.neuro.utah.edu/>). Los códigos de acceso del GeneDB fueron: *E. granulosus* (EgrG_000602100.1), *E. multilocularis* (Emuj.000602100.1), *T. solium* (TsM_000941400), *S. mansoni* (Smp_008070) y *S. japonicum* (Sjp_0039090). Los residuos de cisteína están encerrados en un cuadro negro, el sitio activo está enmarcado en un recuadro azul y los residuos presentes en la hélice $\alpha-3$ (región de interacción con la reductasa) están encerrados en un cuadro de color rojo. Adelante se muestra la estructura secundaria deducida por JPred 4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). Los cuadros rojos rellenos representan hélices mientras que las flechas verdes representan hebras.

6.2.2 La TGR de *T. crassiceps* puede discriminar entre tiorredoxinas de origen eucarionte y procarionte.

Al evaluar la reducción de la TcTrx por su propia TGR se obtuvo una K_m de $3.1 \mu\text{M} \pm 0.98$, una k_{cat} de 10 s^{-1} y una eficiencia catalítica de $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estos datos son similares a los reportados para las TGR de *E. granulosus* [136] y *S. mansoni* [175] en presencia de su propia tiorredoxina. Al analizar estos datos y los observados previamente por Rendón y colaboradores [104], observamos que la TcTGR usa de manera diferencial a las tiorredoxinas bacterianas (*Spirulina sp.* y *E.*

coli) con respecto a las tiorredoxinas eucariontes (*P. falciparum*, humano y la propia) ya que esta enzima sólo puede reconocer de manera productiva a estas últimas Trx (Cuadro 5). Una posible explicación a este fenómeno sería la presencia de diferencias estructurales en la región de interacción reductasa-enzima, por lo que se evaluaron los residuos en la región de la hélice $\alpha 3$, la cual ha sido propuesta como la región importante en la interacción TrxR-Trx [176]. Como se puede observar en el cuadro 5, la región correspondiente a dicha hélice presenta una gran abundancia de residuos con carga negativa (glutámico y aspártico), en las tiorredoxinas que pueden ser reducidas por la TGR mientras que no se observó lo mismo en las tiorredoxinas procariontes. En el caso específico de las Trx de céstodos es posible encontrar que dicha región es altamente conservada y que presenta el motivo DECQDVAEKYR.

TRX origin	Sequence	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM s}^{-1} \times 10^6$)
<i>T. crassiceps</i>	DECQDVAEK -R	3.1	10	3.22
<i>H. sapiens</i>	DDCQDVASECE	5.3	11.8	2.2
<i>P. falciparum</i>	DEVSEVTEKEN	17	19.2	1.13
<i>S. subsalsa</i>	DENPNVASQYG	NR	NR	NR*
<i>E. coli</i>	DQNPGTAPKYG	NR	NR	NR

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de la TGR de *T. crassiceps* en presencia de tiorredoxinas de distinto origen. Se muestra adicionalmente los residuos correspondientes a la zona propuesta de interacción con la reductasa. Los aminoácidos con carga negativa están marcados en negritas.

6.2.3 *La región de interacción TcTrx-TGR presenta complementareidad estructural y de cargas.*

Debido a la falta de la estructura resuelta de las Trx de céstodos, se generó un modelo de la TcTrx a partir de la secuencia obtenida *de novo* (Figura 15).

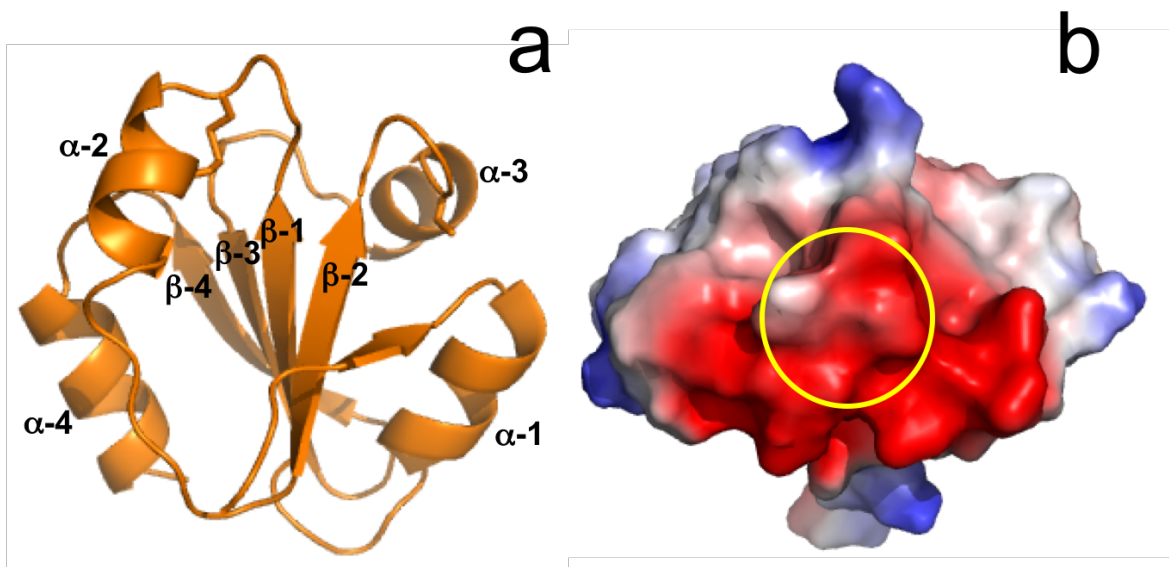


Figura 15. Modelo de la estructura tridimensional de la tiorredoxina del cisticerco de *T. crassiceps*. En a) se muestra la representación esquemática de las estructuras secundarias y en b) se muestra el potencial superficial de carga exhibiendo la hélice $\alpha 3$ hacia al espectador. Las regiones de color rojo denotan la presencia de una carga parcial negativa mientras que las regiones azules denotan una carga parcial positiva.

Para determinar si la presencia de residuos ácidos en la región de interacción tiene relevancia en el reconocimiento de la Trx por la TGR, se modelaron la TGR de *T. solium* así como la Trx de *T. crassiceps*, *T. solium* y *S. subsalsa* y se determinó su potencial superficial de carga de los modelos así como de los cristales de las Trx humana, de *P. falciparum* y *E. coli*. Como se muestra en la Figura 16, existe una diferencia significativa en el potencial electrostático de la región de interacción propuesta ya que la alta densidad de cargas negativas en la región próxima a la hélice 3α forma un parche negativo en el caso de las Trx eucariontes, al contrario de lo observado en las Trx procariontes en donde se observa la presencia de una pequeña región con carga positiva (Figura 16a). Esto es relevante debido a que se observó que en la región propuesta de interacción en la TGR hay una alta densidad de cargas positivas que forman un parche positivo (Figura 16b). Estos datos sugieren que la complementareidad de cargas puede jugar un papel importante en el reconocimiento de la Trx por parte de la TGR.

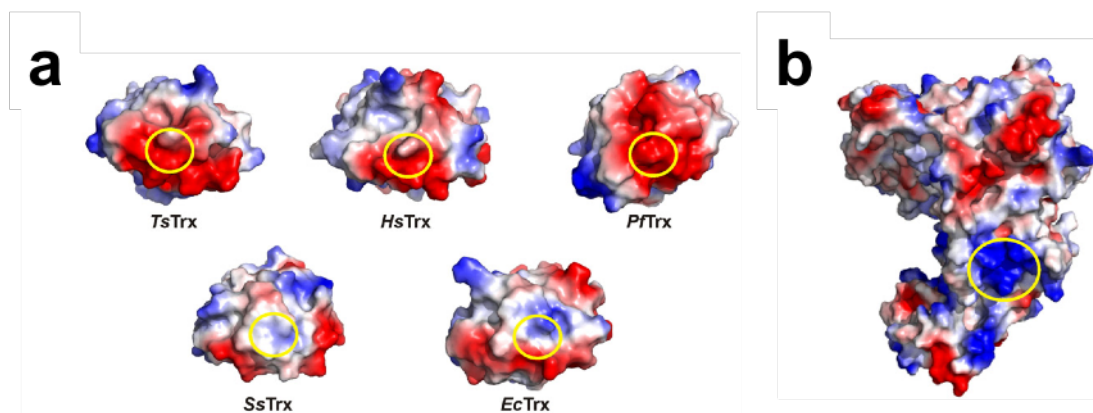


Figura 16. Potencial electrostático de superficie de la Trx y la TGR. Se muestra el potencial electrostático de la superficie accesible al solvente de a) las tiorredoxinas de *T. solium* (TsTrx), *Homo sapiens* (HsTrx), *P. falciparum* (PfTrx), *S. subsalsa* (SsTrx), and *E. coli* (EcTrx) y b) la TGR de *T. solium*. En todos los casos, la magnitud de la carga eléctrica es representada por la intensidad del color. El color rojo esta asignado a las cargas negativas mientras que el color azul esta asignado a las cargas positivas. Se encierra en un círculo la región de interacción con la otra proteína.

Recientemente, Becker y colaboradores han resuelto cristalográficamente la interacción entre las Trx humana y de *P. falciparum* con sus correspondientes reductasas [162 y 177, respectivamente]. Debido a que no existe ningún reporte que haga referencia a la interacción entre la Trx y la TGR sobrepusimos los modelos generados para *T. solium* (sustrato y reductasa) en el cristal de interacción Trx-TrxR de humano, cuidando de alinear las regiones homólogas (Figura 17a). Al realizar esto, se corroboró que la región de interacción entre las Trx eucariontes con sus respectivas reductasas está conservada, por lo que pudimos concluir que la hélice $\alpha 3$ es importante para interacción entre la Trx y la TGR, en el caso de los platelmintos parásitos.

Al observar a detalle dicha interacción, pudimos constatar que la hélice $\alpha 3$ se acomoda en un hueco preexistente en la TGR y que esto favorece el acomodo productivo de la Trx ya que acerca su sitio activo al dominio carboxilo terminal de la subunidad adyacente de la TGR, donde se encuentra el residuo de selenocisteína que se encarga de reducir el disulfuro presente en la tiorredoxina (Figura 17b). Por otro lado, en el caso de la Trx de *E. coli* se observa la presencia de una prolina en

cis que rompe el giro de la hélice α_3 por lo que el acomodo en el sitio de unión en la reductasa no es el adecuado (Figura 17c).

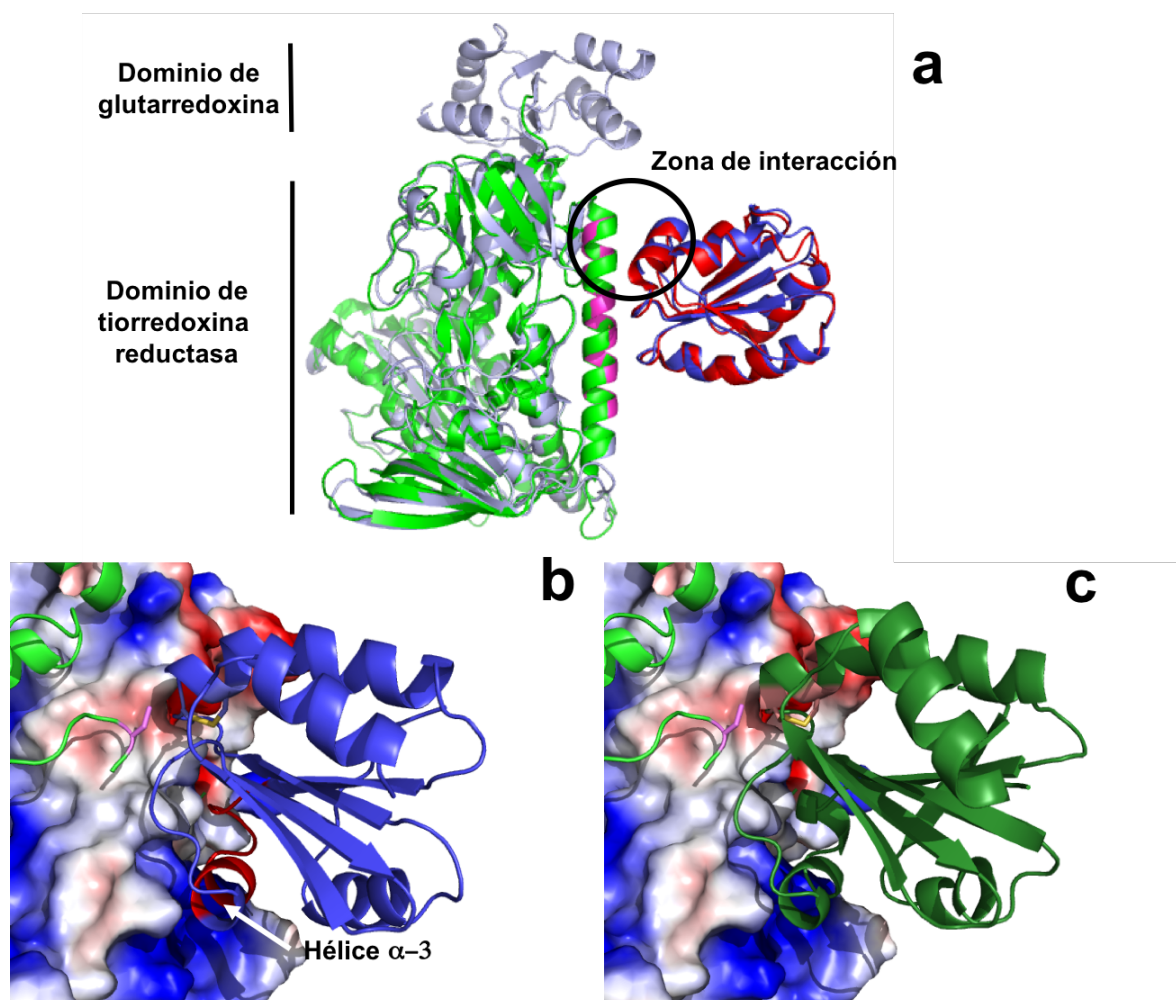


Figura 17. Modelo de interacción Trx-TGR. a) Representación de listones donde se muestra la interacción entre la TsTGR (gris) y la TsTrx (azul). Las estructuras tridimensionales de la TGR y Trx están superpuestas en el cristal de interacción de la TrxR (verde) y Trx (rojo) humanas [162]. Se encierra en un círculo la región de interacción para las proteínas humanas. b) Detalle del complejo TsTGR-TsTrx en donde se muestra la complementariedad de cargas en el sitio de unión de la hélice α_3 de la tiorredoxina. c) Detalle de la interacción TsTGR-EcTrx. El puente disulfuro del sitio activo de las tiorredoxinas se muestra en amarillo mientras que el residuo de selenocisteína se muestra en magenta. Los modelos fueron generados usando el programa PyMOL.

7. DISCUSIÓN

7.1 Avances en el conocimiento de la importancia del metabolismo del glutatión en los platelmintos parásitos.

Existen diversos reportes en la literatura que demuestran la capacidad de los cisticercos para captar moléculas del medio [178]. Sin embargo, aunque se ha podido constatar que los platelmintos parásitos poseen la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de glutatión [179], no se ha evaluado la importancia que tiene este tripéptido en la viabilidad de dichos organismos.

Con base en los resultados antes expuestos y considerando los aportes hechos tras los análisis genómicos, en la figura 18 hemos tratado de integrar las reacciones en las que se ha evaluado experimentalmente (así como en las que actuaría potencialmente) el glutatión en los platelmintos, ya sea en condiciones normales o bajo estrés oxidante.

No podemos dejar de señalar la importancia de la TGR en el mantenimiento del estado redox de los platelmintos. En este sentido, hemos aportado evidencias que la inhibición *in vivo* de esta enzima desencadena diferentes mecanismos para mantener la relación [GSH]/[GSSG] dentro de condiciones que permitan la supervivencia del parásito. Sin embargo, debemos señalar la presencia de otros mecanismos que actúan en conjunto a la TGR en condiciones de estrés oxidante.

En primer lugar, tenemos a las enzimas glutatión peroxidas (GPx) [61,62] y las peroxirredoxinas (Prx) [120,180,181], las cuales actúan como depuradores directos de las ERO (en específico, del peróxido de hidrógeno). Por otro lado, tenemos a las distintas isoformas de la enzima glutatión S-transferasa (GST) [182-184], la cual está involucrada en la eliminación de compuestos xenobióticos. En estos casos, los sistemas protectores de los platelmintos parásitos dependen directamente de la actividad de glutatión reductasa de la TGR, debido a la necesidad

de usar al glutatión como donador de electrones (en el caso de las peroxidasas) o como agente detoxificante y solubilizador (en el caso de la GST).

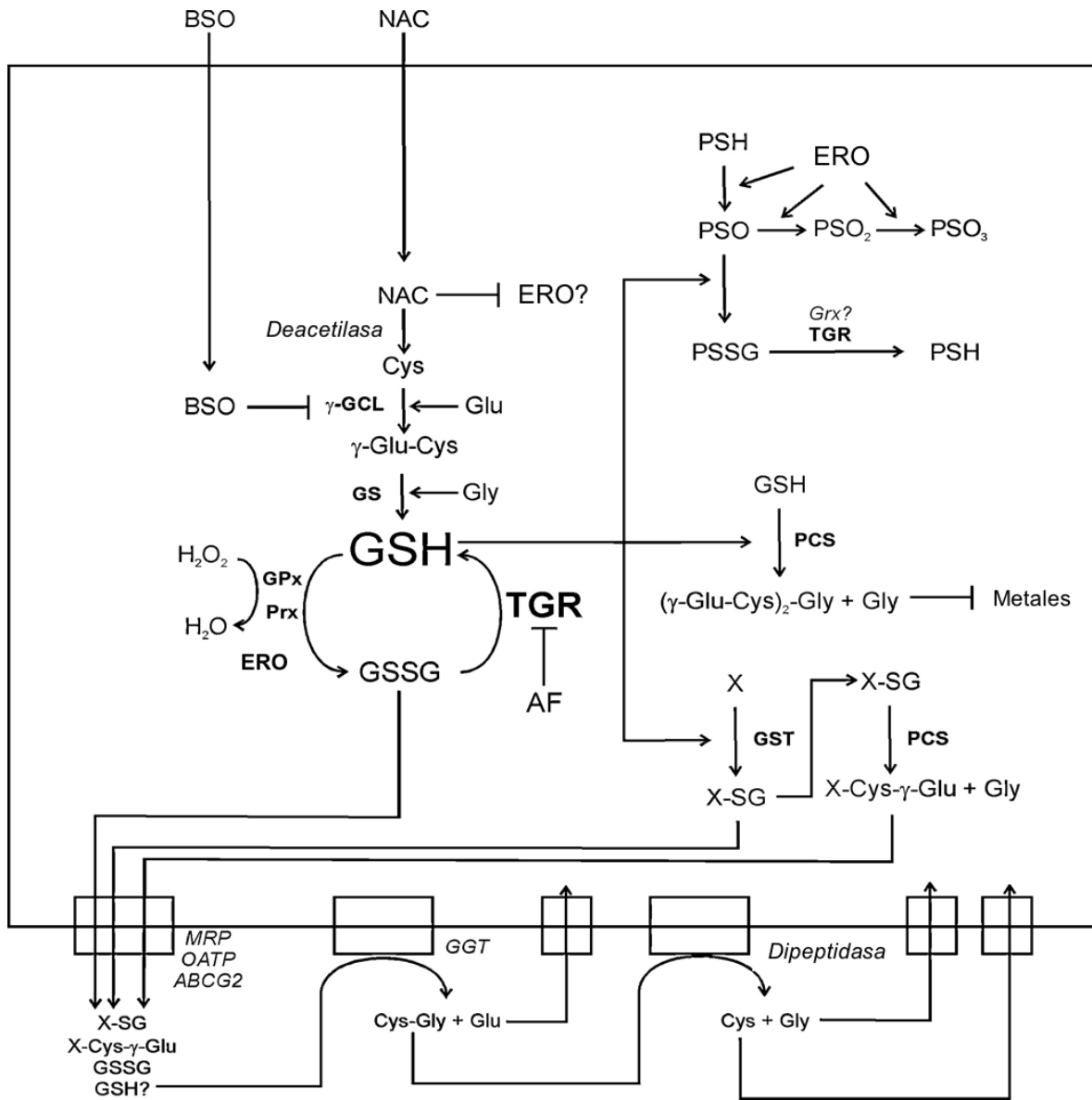


Figura 18. Esquema propuesto del metabolismo de glutatión en platelmintos parásitos. Se muestran las reacciones potenciales en las cuales el glutatión puede estar involucrado. Las enzimas o moléculas de las cuales existe evidencia experimental se muestran en negritas mientras que las enzimas predichas mediante evidencia genómica se muestran en cursivas. Ver el texto para más detalles. Abreviaturas: ABCG2, transportador de cassette (ABC) tipo 2 de la subfamilia ABCG; AF, auranofín; BSO, butionina sulfoximina; γ GCL, gama-glutamylcisteína ligasa; γ GT, gama-glutamyl transpeptidasa (actividad de GSH-liasa); GPx, glutatión peroxidasa; Grx, glutarredoxina; GS,

glutación sintasa; GSH, glutación en su forma reducida, GSSG, glutación en su forma disulfuro (oxidada); GST, glutación S-transferasa; GSX, glutación acomplejado a xenobióticos; OATP, proteína transportadora de aniones orgánicos solubles; MRP, proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas; NAC, N-acetil cisteína; PSSG, glutación acomplejado a proteínas; PC, fitoquelatina; PCS, fitoquelatina sintasa; PSH, tiol protéico; PSO, cisteína proteíca oxidada en su forma ácido sulfénico; PSO₂, cisteína proteíca oxidada en su forma ácido sulfínico; PSO₃, cisteína proteíca oxidada en su forma ácido sulfónico; Prx, Peroxirredoxina; ERO, especies reactivas de oxígeno; TGR, tioredoxina-glutación reductasa; X, xenobiótico.

Otro mecanismo que hemos demostrado que opera en los platelmintos parásitos en condiciones de estrés oxidante es la traslocación de la forma oxidada del glutación (GSSG) al medio (Figuras 8c y 11b). Este mecanismo de protección también ha sido observado en otras especies [185-187].

En el caso de los tioles de origen protéico que son susceptibles a oxidación irreversible se protegen mediante su acomplejamiento reversible con glutación mediante un disulfuro mixto glutación-proteína [188]. En el caso del cisticerco de *T. crassiceps* se observó un nivel basal de glutationilación en condiciones fisiológicas (Figura. 8b). Dicho nivel de glutationilación aumenta en condiones de estrés oxidante (por ejemplo el ocasionado por el AF). Aunque se desconoce el agente que regula el proceso de glutationilación/deglutinationilación, se ha propuesto que la proteína encargada de regenerar los tioles que fueron glutationilados es la glutaredoxina [189]. En este sentido, existe evidencia experimental que el dominio de glutaredoxina de la TGR de *E. granulosus* tiene la capacidad para llevar a cabo esta función en condiciones *in vitro* [111]. A la fecha, no se ha aislado un homólogo de glutaredoxina en platelmintos, a pesar de que la evidencia genómica sugiere la presencia de varias isoformas [109].

7.2 Avances en el análisis de la estructura de la tiorredoxina de platelmintos parásitos y su interacción con la TGR.

Al día de hoy no se ha resuelto la estructura cristalográfica de ninguna tiorredoxina de céstodos, mientras que en los tremátodos se disponen de los cristales de la Trx de *F. hepatica* [190] y de *S. mansoni* [191]. Sin embargo, al purificar y caracterizar a homogeneidad una Trx citosólica en el cisticerco de *T. crassiceps*, se observó que presenta propiedades fisicoquímicas y cinéticas similares a las observadas en otros parásitos [190,192]. La reciente liberación de los genomas de platelmintos parásitos [109] ha sugerido la presencia de varios genes codificantes para distintas isoformas de tiorredoxina. Si consideramos que el grupo del Arenal encontró la actividad de tiorredoxina en el citosol asociada a una única proteína, podemos encontrarnos ante a varios escenarios: i) El resto de los genes codificantes para tiorredoxinas no se traducen; ii) los genes para las Trx se traducen, pero en cantidades despreciables por lo que en el caso del cisticerco de *T. crassiceps*, la Trx citosólica purificada por del Arenal y colaboradores es la mejor representada (Figura 13); iii) los genes adicionales codifican para proteínas descritas como “tipo tiorredoxina” que no tienen participación directa con los mecanismos redox; iv) las otras isoformas de tiorredoxinas se asocian a membranas o se internalizan en los organelos por lo que no tienen relevancia o participación en el citosol. Sin embargo, se requieren de más estudios para explicar tal discrepancia entre los datos genómicos y experimentales.

Al realizar la comparación entre las secuencias de las Trx citosólicas de los céstodos, encontramos la presencia de dos residuos conservados, Cys²⁸ y Cys⁶⁵, adicionales a los residuos de cisteínas encontrados en el sitio activo redox Cys³⁵ y Cys³⁸; a diferencia de las Trx de los tremátodos, que sólo poseen dos cisteínas en su sitio activo (Figura 14). Basado en el modelaje de la estructura tridimensional de la TcTrx (Figura 15) encontramos que las cisteínas adicionales se encuentran muy lejos (10.597 Å), lo que excluye la posibilidad de formar un puente disulfuro intramolecular adicional, similar al reportado en la Trx humana donde la distancia entre dos residuos Cys⁶² y Cys⁶⁹ permite la formación de un disulfuro que impide el

reconocimiento del sitio activo de dicha Trx por parte de su correspondiente TrxR [193]. La TcTrx puede sufrir dimerización, lo que trae por consecuente la pérdida de su actividad, aún en ausencia de una Cys⁷³ (Figura 14). Este fenómeno ha sido descrito también en la Trx humana y, aunque en un principio se asoció a la formación de un puente disulfuro intermolecular a nivel de los residuos Cys⁷³ de dos monómeros de hTrx, se ha comprobado que la sustitución de estas cisteínas por serina no evita la formación de estos agregados [194].

Cuando evaluamos la capacidad de la TcTGR para reducir a Trx de distinto origen, el análisis de las K_m nos revela que la reductasa presenta mayor afinidad por su Trx propia (TcTrxT), seguida por las hTrx y PfTrx (Cuadro 5) y no fue capaz de reconocer a las tiorredoxinas de origen bacteriano (EcTrx y SsTrx). Debido a que el fenómeno de especificidad diferencial también ha sido observado previamente en los sistemas Trx-TrxR de *Drosophila melanogaster* [195] y *Saccharomyces cerevisiae* [196], los resultados sugieren que la interacción entre la tiorredoxina y su correspondiente reductasa esta mediada por elementos estructurales y/o electrostáticos.

Para comprobar este supuesto, evaluamos la Trx resuelta de *E. coli* [197], así como los cristales de interacción Trx-TrxR de *S. cerevisiae* [196], humano [162] y de *P. falciparum* [177] y observamos que la interacción entre las TrxR de bajo peso molecular (*E. coli* y *S. cerevisiae*) involucra la participación de varios residuos dispersos en la estructura tridimensional de su respectiva Trx mientras que la interacción de las TrxR de alto peso molecular (*P. falciparum* y humana), se da entre una región específica entre la tiorredoxina y la reductasa. Cuando evaluamos esta región de interacción de nuestros modelos, corroboramos que el reconocimiento entre ambas proteínas puede estar favorecido por complementaridad de cargas (Figura 16). En este sentido, tenemos que estas regiones, con una alta densidad de cargas negativas (en la Trx eucarionte) o positivas (en la TrxR de alto peso molecular), se observan tanto en los modelos generados como en los PDB de estructuras ya resueltas [162,177, 196 y 198].

Al sobreponer los modelos generados para la TsTrx y TsTGR en el cristal de

interacción hTrx-hTrxR (PDB 3QFA) pudimos comprobar que la interacción no sólo puede estar mediada por complementaridad de cargas, sino también por la existencia de un sitio preexistente en la reductasa en la cual se acomoda la Trx de manera productiva (Figura 17). Esto es importante porque nos habla que los mecanismos de reconocimiento de las reductasas por su respectivas Trx están conservados a través de la evolución y que éstos se optimizan para el reconocimiento de la tiorredoxina propia, con la posibilidad de reconocer otras Trx cercanas evolutivamente, al menos en el caso de las tiorredoxinas reductasas de alto peso molecular.

Al analizar a detalle el cristal de interacción podemos notar la hélice $\alpha 3$ de la hTrx se acopla en un surco preexistente en la hTrxR (favorecido por la complementaridad de cargas antes mencionada) lo que favorece la catálisis de la Trx al exponer su sitio activo a la selenocisteína del sitio activo carboxilo terminal de la subunidad opuesta de la TrxR. Esta conformación es también observada en el modelo TsTrx-TsTRG (Figura 17b), por lo que nos habla de la relación que existe entre la complementaridad de cargas (que favorecen dicha interacción), y la afinidad que tiene las reductasas por las diferentes Trx debe estar matizada por la interacción entre residuos de ambas proteínas, lo que explicaría porque frecuentemente se observa una mayor afinidad (reflejada en sus respectivas K_m) por la tiorredoxina propia que por las tiorredoxinas de otros organismos. De igual modo, la baja afinidad de la TcTGR por la EcTrx se puede explicar a la falta de complementaridad de cargas en este complejo (Figura 16) así como la presencia de una cis-prolina que acorta la hélice $\alpha 3$ cambiándola de sentido y reduciendo las probabilidades de un acomodo productivo EcTrx-TcTGR (Figura 17c).

Es posible que la TGR reduzca a la Trx bacteriana debido a que el extremo carboxilo de la enzima es altamente móvil y puede aleatoriamente encontrarse con el sitio activo de la Trx [107,199]. Sin embargo, la eficiencia catalítica en estos casos es considerablemente baja comparada con la observada con las Trx eucariontes en donde se favorece un conformación adecuada.

7.3 La diferencia entre la arquitectura redox entre parásitos y hospederos es de interés farmacológico.

Los platelmintos parásitos (como *S. mansoni*, *E. granulosus* y *T. solium*) causan enfermedades que han sido clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “enfermedades a las que no se les ha prestado la atención adecuada” [200] debido a su alta prevalencia mundial y a que ocasionan padecimientos de importancia médica y veterinaria [201] que pueden persistir de manera asintomática en sus hospederos vertebrados por décadas [202, 203], causando un abanico de patologías debilitantes y que con el tiempo pueden comprometer la vida del hospedero [204]. Recientemente se han comenzado a reportar el desarrollo de resistencia o tolerancia de los platelmintos parásitos ante los fármacos de primera elección, por lo que numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar nuevos medicamentos contra la TGR [125-132]. El objetivo de este trabajo fue profundizar en el papel de la TGR en la homeostasis redox de los platelmintos y revalidar a esta enzima como un atractivo blanco farmacológico.

En este sentido, es importante notar que existen diferencias significativas en la arquitectura de los sistemas redox de los platelmintos parásitos con respecto a sus hospederos vertebrados. La más notable es la ausencia de las enzimas NADPH dependientes, encargadas exclusivamente de la reducción del glutatión y de la tiorredoxina: glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa, respectivamente [50, 84]. En el caso de los parásitos se tiene la presencia de una única enzima multifuncional tiorredoxina-glutatión reductasa, encargada de reducir no solo a ambos sustratos sino también a hidroperóxidos, peróxidos orgánicos y otras moléculas de bajo peso molecular. [205]. Adicionalmente, la TGR tiene la capacidad potencial de catalizar los procesos de glutationilación-deglutinationilación a través de su dominio N-terminal con homología a glutarredoxina [111].

De manera indirecta, la TGR controla: i) los procesos de detoxificación de ERO (a través de la GPx y Prx), xenobióticos (a través de la GST) y de metales pesados (a través de la PCS) al proveer glutatión en su forma reducida; ii) procesos de señalización a través de la glutationilación y de la tiorredoxina, que participa en muchas vías de señalización [96, 97]; iii) la formación de desoxiribonucleótidos, ya que tanto la Trx como la Grx son las encargadas de proveer los equivalentes reductores a la enzima ribonucleótido reductasa para la síntesis de ribonucleótidos [48] y iv) los procesos de muerte celular programada (apoptosis), ya que se ha demostrado en mamíferos y otras especies que la inhibición de las isoformas de la tiorredoxina reductasa (como lo es la TGR) puede activar procesos como la apertura del canal de transición de la mitocondria [206], la liberación del citocromo c [207] y la activación del complejo pro-apoptótico [208], entre otras.

Al contextualizar la relevancia de la TGR para la supervivencia del organismo y considerando que estos parásitos presentan la enzima superóxido dismutasa (SOD) pero no la enzima catalasa (CAT) [109] y que generan grandes cantidades de H₂O₂ en sus mitocondrias [8] podemos sugerir que el sistema único tiorredoxina-glutatión reductasa es un blanco atractivo para el diseño de fármacos para atacar las parasitosis ocasionadas por estos organismos a la par de servir como un interesante modelo de estudio de la participación de los sistemas antioxidantes enzimáticos en el establecimiento y mantenimiento de las parasitosis.

8. CONCLUSIONES

La inhibición *in vivo* de la TGR en el cisticerco de *T. crassiceps* ocasiona estrés oxidante, el cual desencadena mecanismos de protección como la glutationilación, la síntesis *de novo* de glutatión y la exportación de glutatión oxidado al medio.

La butionina sulfoximina (BSO) es un coadyuvante que potencia el efecto letal de compuestos inhibidores de la TGR (como el auranofin) al limitar la síntesis *de novo* del glutatión.

Los tioles de bajo peso molecular (como la N-acetil cisteína y la cisteína) pueden reducir directamente al glutatión oxidado cuando se encuentran en exceso.

Las condiciones redox en el cisticerco son diferentes a su hospedero al presentar un pH citosólico más alcalino, lo que modula el potencial redox del glutatión al interior del cisticerco.

La TGR puede reducir de manera diferencial a tiorredoxinas de distinto origen. Indicamos que esta diferencia está relacionada con la zona de interacción entre ambas proteínas y que dicha región esta conservada en eucariontes.

La interacción entre la Trx y la TGR probablemente está mediada por complementaridad de cargas y complementaridad estructural.

Las evidencias genómicas demuestran que la ausencia de catalasa, así como la presencia de enzimas redox como superóxido dismutasa, glutatión-peroxidasa, peroxirredoxinas, glutatión S-transferasas, entre otras, es un rasgo común en los platelmintos parásitos.

Los sistemas redox dependientes de glutatión y tiorredoxina (así como otros procesos biológicos) dependen exclusivamente de la TGR, por lo que esta enzima

es clave en el mantenimiento del estado redox de los platelmintos y por tanto, es un excelente blanco farmacológico.

LITERATURA CITADA

1. Pechenick, J.A. 2000. *Biology of the invertebrates*. Cuarta edición. Mc-Graw Hill, New York, US, pp.143-167.
2. Brusca, R. y G. Brusca. 2003. *Invertebrates*. Segunda edición. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts, Estados Unidos; pp. 285-318.
3. Smyth, J.D., y D.P. McManus. 1989. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press. Cambridge, UK pp. 5-21.
4. Rugeiro, E., e I. Noemi. 1999. *Teniasis*. en *Parasitología Médica*. Atlas, A. (ed.). Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago, Chile pp 194-200.
5. Pawloski, Z.S. 2002. *Taenia solium: Basic biology and transmission*. en *Taenia solium cysticercosis: from basic to clinical science*. Singh, G. y S. Prabhakar (eds.). CABI Publishing. New York, US, pp. 9-10.
6. Willms, K. y R. Zubarán. 2009. *Taenia crassiceps: in vivo and in vivo models*. *Parasitology*, **137**: 335-346.
7. Palomares, F.; G. Palencia; R. Pérez; D. González-Esquível; N. Castillo y H. Jung. 2004. *In vitro effects of albendazole sulfoxide and praziquantel against Taenia solium and Taenia crassiceps cysts*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48(6)**: 2302.
8. del Arenal, I.P.; M.E. Rubio; J. Ramírez; J.L. Rendón y J.E. Escamilla. 2005. *Cyanide-resistant respiration in Taenia crassiceps metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂*. *Parasitology International* **54**: 185-193.
9. Chou, C-Y. y R.S. Freeman. 1976. *Intraperitoneal passage of Taenia crassiceps in rats*. *The Journal of Parasitology*, **62(5)**: 837-839.
10. Saeed, I.; C. Maddox-Hyttel; J. Monrad y C.M.O. Kapel. 2006. *Helminthes of red foxes (Vulpes vulpes) in Denmark*. *Veterinary Parasitology*, **139**: 168-179.
11. Kassal, T. 1999. *Veterinary Helminthology*. Butterworth Heinmann. Londres, U.K., pp.27-42.
12. Hoberg, E.P.; A. Jones; R.L. Rauscj; K.S. Eom y S.L. Gardner. 2000. *A phylogenetic hypothesis for species of the genus Taenia (Eucestoda: Taeniidae)*. *Journal of Parasitology*, **86(1)**:89-98.
13. Willms, K.; L. Robert; J.A. Jiménez; M. Everhart y R.E. Kuhn. 2004. *Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in Taenia crassiceps strobilae WFU strain*

- (*Cestoda, Cyclophyllidea, Taenidae*) from golden hamsters. *Parasitology Research*, **93**: 262-267.
14. Craig, P. y A. Ito. 2007. *Intestinal cestodes*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **20(5)**: 524-532.
 15. <http://www.coneval.gob.mx> Pobreza en México. Resultados de pobreza en México 2014 a nivel nacional y por entidades federativas. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (Coneval). [consultado el 29 de Diciembre de 2015]. Disponible.
 16. Fleury, A.; E. Sciutto y C. Larralde. 2012. *Neurocysticercosis in still prevalent in Mexico*. *Salud Pública en México*, **54(6)**: 632-636.
 17. Del Brutto, O.H. 2005. *Neurocysticercosis: up-dating in diagnosis and treatment*. *Neurología*, **20(8)**: 412-418.
 18. Sciutto, E.; A. Chavarria; G. Fragoso; A. Fleury y C. Larralde. 2007. *The immune response in Taenia solium cysticercosis: protection and injury*. *Parasite Immunology*, **29**: 621-636.
 19. Correa, D y E. Medina. 1999. *Host-parasite immune relationship in Taenia solium taeniasis and cysticercosis*. En: Garcia H.H. y S.M. Martínez (Editores). *Taenia solium taeniasis/cysticercosis*. Segunda Edición. Editorial Lima: Editorial Universo 15-24.
 20. Dixon, H.B.F. y Lipscomb F.M. 1961. *Cysticercosis: an analysis and follow-up of 450 cases*. Her Majesty's Stationary Office. Med Res Council Spec Rep No 299.
 21. Del Brutto, O.H. y J. Sotelo. 1988. *Neurocysticercosis: an update*. *Review in Infectious Diseases*, **10**: 1075-91.
 22. Carpio, A; A, Escobar y W.A. Hauser. 1998. *Cysticercosis and epilepsy: a critical review*. *Epilepsia*, **39**:1025-1040.
 23. Quet, F.; M. Guerchet; S.D. Pion; E.B. Ngoungou; A. Nicoletti y P.M. Preux. 2010. *Meta-analysis of the association between cysticercosis and epilepsy in Africa*. *Epilepsia*, **51(5)**:830-837.
 24. <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/epilepsia.html> Instituto Nacional de Neurología y Neurociencia "Manuel Velasco Suárez". Secretaría de Salud, México. Consultado el 31 de Diciembre de 2015. Disponible.

25. Zurabian, R.; L. Aguilar; J.A. Jiménez; L. Robert y K. Willms. 2008. *Evagination and infectivity of Taenia crassiceps cysticerci in experimental animals*. Parasitology **94**:1 1-6.
26. Larralde, C.; R.M. Montoya; E. Sciutto; M.L. Diaz; T. Govezensky y E. Coltorti. 1989. *Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus, and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **40**: 282–290.
27. Willms, K. y R. Zurabian. 2010. *Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models*. Parasitology, **137**: 335–346.
28. Hoberg, E.P. 2002. *Taenia tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance*. Microbes and infection. **4**: 859-866.
29. Cardona, A.E. y J.M. Teale. 2002. *Animal models of Taenia solium cysticercosis: role in understanding host-parasite interactions*. en *Taenia solium cysticercosis: from basic to clinical science*. Singh, G. y S. Prabhakar (editores.). CABI Publishing. New York, US pp. 35-45.
30. Moné, Y.; A.C. Ribou; C. Cosseau; D. Duval; A. Théron; G. Mitta y B. Gourbal. 2011. *An example of molecular co-evolution: reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata interactions*. International Journal of Parasitology, **41(7)**: 721-730
31. Circu, M.L. y T.Y. Aw. 2010. *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. Free Radical Biology & Medicine, **48**: 749-762
32. Brandes, N.; S. Schmitt y U. Jakob. 2009. *Thiol-based redox swiches in eukaryotic proteins*. Antioxidants & Redox Signalling, **11(5)**: 997-1013
33. Lushchak, V.I. 2011. *Adaptative response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals*. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and pharmacology: CBP, **153(2)**: 175-190.
34. Valko, M.; D. Leibfritz; J. Moncol; M.T.D. Cronin; M. Mazur y J. Telser. 2007. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. **39**: 44-84.
35. Hansen, J.M.; Y.M. Go y D.P. Jones. 2006. *Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. **46**: 215-234

36. Meyer, A.J. 2008. *The integration of glutathione homeostasis and redox signalling*. Journal of Plant Physiology, **165(13)**: 1390-1403
37. D'Autréaux, B. y M. B. Toledano. 2007. *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nature Review Molecular Cell Biology, **8**: 813-824
38. Drögue, W. 2002. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiological Reviews **82**: 47-95
39. Blokhina, O.; E. Virolainen y K.V. Fagerstedt. 2003. *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. Annals of Botany **91**: 179-194.
40. Das, K.C., y C.W. White. 2002. *Redox systems of the cell: possible links and implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American **99(15)**: 9617-9618.
41. Zhang, H.; Y.M. Go y D.P. Jones. 2007. *Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **465**: 119-126.
42. Trotter, E.W., y C.M. Grant. 2003. *Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems*. European Molecular Biology Organization **4(2)**: 184-188.
43. Deponte, M. 2013. *Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes*. Biochimica et Biophysica Acta, **1830**: 3217-3266.
44. Griffith, O.W. 1999. *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. Free Radicals Biology & Medicine, **27(9/10)**: 922-935.
45. Anderson, M.E. 1998. *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation*. Chemico-Biological Interactions **111(112)**: 1-14.
46. Shen, D.; T.P. Dalton; D.W. Nebert y H.G.Shertzer. 2005. *Glutathione redox state regulate mitochondrial reactive oxygen production*. The Journal of Biological Chemistry, **27(8)**: 25305-25312.
47. Hanigan, M.H. 2014. *Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance*. Advances in Cancer Research, **122**: 103-141.
48. Gon, S.; M.J. Faulkner y J. Beckwith. 2006. *In vivo requirement of glutaredoxins and thioredoxins in the reduction of the ribonucleotide reductases of Escherichia coli*. Antioxidants & Redox Signaling, **8(5-6)**: 735-742.
49. Torres-Rivera, A. y A. Landa. 2008. *Glutathione transferases from parasites: a biochemical view*. Acta Tropica, **105**: 99-112.

50. Rendón, J.L. y O. Juárez. 2008. *Glutathione reductase: structural, catalytic and functional aspects*. en *Advances in protein physical chemistry*. García-Hernández, E. y A. Fernández-Velasco. (eds.). Transworld Research Network. Kerala, India, pp. 317-349.
51. Berndt, C.; C.H. Lilling y A. Holmgren. 2008. *Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**: 641-650
52. Hill, B.G.; K.V. Ramana; J. Cai; A. Bhatnagar y S.K. Srivastava. 2010. Chapter nine: measurement and identification of S-glutathiolated proteins. *Methods in enzymology*, 473: 179-197.
53. Karinila, E.V.; N.N. Chernov y M.D. Novichkova. 2014. *Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes*. *Biochemistry (Moscow)*, **79(13)**: 1562-1583.
54. Nkabyo, Y.S.; T.R. Ziegler; L.H. Gu; W.H. Watson y D.P. Jones. 2002. *Glutathione and thioredoxin during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells*. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**: G1352-G1359.
55. Brown, D.M.; J.A. Upcroft; M.R. Edwards y P. Upcroft. 1998. *Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote Giardia duodenalis*. *International Journal of Parasitology* **28**: 149-164.
56. Newton, G.L. y R.C. Fahey. 2002. *Mycothiols biochemistry*. *Archives of Microbiology* **178**: 388-394.
57. Perera, V.R.; G.L. Newton y K. Pogliano. 2015. *Bacillithiol: a key protective thiol in Staphylococcus aureus*. *Expert review of Anti-Infective Therapy*, **13(9)**: 1089-1107.
58. Müller, S.; E. Liebau; R.D. Walter y R.L. Krauth-Siegel. 2003. *Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites*. *TRENDS in Parasitology* **19(7)**: 320-328.
59. Krauth-Siegel, R. y O. Inhoff. 2003. *Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule*. *Parasitology Research* **90**: S77-S85
60. Papp, L.V.; J. Lu, A. Holmgren y K.K. Khanna. 2007. *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. *Antioxidants & Redox Signaling* **9(7)**: 776-793.
61. Gromer, S.; J.K. Eubel; L. Lee, y J. Jacob. 2005. *Human selenoproteins at a glance*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**: 2414-2437.
62. Brigelius-Flohé, R. y M. Maiorino. 2013. *Glutathione peroxidases*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830(5)**: 3289-3303.

63. Missirlis, F.; J.K. Ulschmid; M. Hirosawa-Takamori; S. Grönke; U. Schäfer; K. Becker; J.P. Phillips y H. Jäckle. 2002. *Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single Drosophila gene are both essential for viability*. The Journal of Biological Chemistry **277(13)**: 11521-11526.
64. Hanschmann, E.M.; J.R. Godoy; C. Berndt; C. Hudemann y C.H. Lillig. 2013. *Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins- molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling*. Antioxidants & Redox Signaling, **19(13)**: 1539-1605.
65. Meyer, Y.; B.B. Buchanan; F. Vignols y J.P. Reichheld. 2009. *Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology*. The Annual Review of Genetics, **49**: 335-367.
66. Lu, J. y A. Holmgren. 2014. *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radical Biology & Medicine, **66**: 75-87.
67. Collet, J.F. y J. Messens. 2010. *Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins*. Antioxidants & Redox Signaling, **13(8)**: 1205-1216.
68. Madelon, M.M.; H. Nakamura; S. Gringhuis; T. Okamoto; S. Yoshida; F. Kullman; S. Lechner; E.A.M. Van der Voort; A. Leow; J. Versendaal; U. Muller-Ladner; J. Yodoi; P.P. Tak; F.C. Breedveld y C.L. Verweij. 1999. *Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis and Rheumatism **42(11)**: 2430-2439.
69. Hill, K.E.; G.W. McCollum; M.E. Boeglin y R.F. Burk. 1997. *Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency*. Biochemical and Biophysical Research Communications **234**: 293-295.
70. Brown, D.M.; J.A. Upcroft; M.R. Edwards y P. Upcroft. 1998. *Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote Giardia duodenalis*. International Journal of Parasitology **28**: 149-164.
71. Zhong, L. y A. Holmgren. 2000. *Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations*. The Journal of Biological Biochemistry **275(24)**: 18121-18128.
72. Krnajski, Z.; T.W. Gilberger; R.D. Walter y S. Müller. 2001. *The malarian parasite Plasmodium falciparum possesses a functional thioredoxin system*. Molecular & Biochemical Parasitology **112**: 219-228.

73. Garrido, E.O., y C.M. Grant. 2002. *Role of thioredoxin in the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress induced by hydroperoxides*. Molecular Microbiology **43(4)**: 993-1003.
74. Gelhaye, E.; N. Rouhier; N. Navrot y J.P. Jacquot. 2005. *The plant thioredoxin system*. Cellular and Molecular Life Sciences **62**: 24-35.
75. Wang, P.F.; J. Marcinkeviciene; C.H. Williams Jr., y J.S. Blanchard. 1998. *Thioredoxin reductasa-thioredoxin fusion enzyme from Mycobacterium leprae: comparison with the separately expressed thioredoxin reductase*. Biochemistry. **37(46)**: 16378-16389.
76. Mustacich, D. y G. Powis. 2000. *Thioredoxin reductase*. The Biochemical Journal **346**: 1-8.
77. Arnér, E.S.J. y A. Holmgren. 2000. *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. European Journal of Biochemistry **267**: 6102-6109.
78. Boschi-Muller, S. y G. Branlant. 2014. *Methionine sulfoxide reductase: chemistry, substrate binding, recycling process and oxidase activity*. Bioorganic Chemistry, **57**: 222-230.
79. Kern, R.; A. Malki; A. Holmgren y G. Richarme. 2003. *Chaperone properties of Escherichia coli thioredoxin and thioredoxin reductase*. The Biochemical Journal **371**: 965-972.
80. Windle, H.J.; A. Fox; D.N. Eidhin y D. Kelleher. 2000. *The thioredoxin system in Helicobacter pylori*. The Journal of Biological Chemistry **275(7)**: 5081-5089.
81. Watson, W.H.; X. Yang; Y.E. Choi; D.P. Jones y J.P. Kehrer. 2004. *Thioredoxin and its role in toxicology*. Toxicological sciences **78**: 3-14.
82. Rahman, I.; S.K. Biswas y A. Kode. 2006. *Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases*. European Journal of Pharmacology **533**: 222-239.
83. Nordberg, J. y E.S. Arnér. 2001. *Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin reductase*. Free Radical Biology & Medicine **31(11)**: 1287-1312.
84. Gromer, S.; L.D. Arscott; C.H. Williams Jr.; R.H. Schirmer y K. Becker. 1998. *Human placental thioredoxin reductase: isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds*. The Journal of Biological Chemistry **273(32)**: 20096-20101.

85. Hill, K.E.; G.W. McCollum; M.E. Boeglin y R.F. Burk. 1997. *Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency*. Biochemical and Biophysical Research Communications **234**: 293-295.
86. Zhang, Z.; R. Bao; Y. Zhang; J. Yu; C.Z. Zhou y Y. Chen. 2009. *Crystal structure of Saccharomyces cerevisiae cytoplasmic thioredoxin reductase Trr1 reveals the structural basis for species-specific recognition of thioredoxin*. Biochimica et Biophysica Acta, **1794(1)**: 124-128.
87. Rackham, O.; A.M. Shearwood; R. Thyer; E. McNamara; S.M. Davies; B.A. Callus, A. Miranda-Vizuete; S.J. Berners-Price; Q, Cheng; E.S. Arnér y A. Filipovska. 2011. *Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: implications for development of specific inhibitors*. Free Radical Biology & Medicine, **50(6)**: 689-699.
88. Corona, M. y G.E. Robinson. 2006. *Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny*. Insect Molecular Biology, **15(5)**: 687-701.
89. Lacey, B.M. y R.J. Hondal. 2006. *Characterization of mitochondrial thioredoxin reductase from C. elegans*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **346(3)**: 629-636.
90. Allmang, C. y A. Krol. 2006. *Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story*. Biochimie **88**: 1561-1571.
91. Snider, G.W.; E. Ruggles; N. Khan y R.J. Hondal. 2013. *Selenocysteine confers resistance to inactivation by oxidation in thioredoxin reductase: comparison of selenium and sulfur enzymes*. Biochemistry, **52**: 5472-5481.
92. Johansson, L.; G. Gafvelin y E.S.J. Arnér. 2005. *Selenocysteine in proteins – properties and biotechnological use*. Biochimica et Biophysica Acta **1726**: 1-13.
93. Su, D.; S.V. Novoselov; Q.A. Sun; M.E. Moustafa; Y. Zhou; R. Oko; D.L. Hatfield y V.N. Gladyshev. 2005. *Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation*. The Journal of Biological Chemistry, **280(28)**: 26491-26498.
94. Salinas, G.; M.E. Selkir; C. Chalar; R.M. Mizels y C. Fernández. 2004. *Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths*. TRENDS in Parasitology **20(7)**: 340-346.
95. Jezek, P. y L. Hlavatá. 2005. *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**: 2478-2503.

96. Yoshihara, E.; S. Masaki; Y. Matsuo; H. Tian y J. Yodoi. 2014. *Thioredoxin/Txnip: redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases*. *Frontiers in Immunology*, **4**: 514.
97. Mailloux, R.J. y W.G. Willmore. 2014. *S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2**: 68.
98. Sun, Q.A.; L. Kirnarsky; S. Sherman y V.N. Gladyshev. 2001. *Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* **98(7)**: 3673-3678.
99. Mariotti, M.; P.G. Ridge; Y. Zhang; A.V. Lobanov; T.H. Pringle; R. Guigo; D. L. Hatfield y V.N. Gladyshev. *Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes*. *PLoS One*, **7(3)**: e33066.
100. Schoenmakers, E.; *et.al.* 2010. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(12): 4220-4235.
101. McCallum, M. J. y Barrett, J. 1995. *The purification and properties of glutathione reductase from the cestode Moniezia expansa*. *International Journal of Biochemical and Cellular Biology*, **27(4)**:393-401.
102. Alger, H.M., y D.L. Williams. 2002. *The disulfide redox system of Schistosoma mansoni and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **121**: 129-139.
103. Agorio, A.; C. Chalar; S. Cardozo y G. Salinas. 2003. *Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278(15)**:12920-12928.
104. Rendón, J.L.; I.P. del Arenal; A. Guevara-Flores; A. Uribe; A. Plancarte y G. Mendoza-Hernández. 2004. *Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from Taenia crassiceps metacestode (cysticerci)*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **133**: 61-69

105. Guevara- Flores, A.; J.P. Pardo y J.L. Rendón. 2011. Hysteresis in thioredoxin-glutathione reductase (TGR) from the adult stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasitology International*, **60(2)**: 156-160
106. Han, Y.; M. Zhang; Y. Hong; Z. Zhu; D. Li; X Li; Z. Fu y J. Lin. 2012. *Characterization of thioredoxin glutathione reductase in Schistosoma japonicum*. *Parasitology International*, 61(3): 475-480.
107. Plancarte, A. y G. Nava. 2015. *Purification and kinetic analysis of cytosolic and mitochondrial thioredoxin glutathione reductase extracted from Taenia solium cysticerci*. *Experimental Parasitology*, **149**: 65-73.
108. Changklungmoa, N.; P. Kueakhai; K. Sangpairoj; P. Chaichanasak; W. Jaikua; S. Riengrojpitak; P. Sobhon y K. Chaithirayanon. 2015. *Molecular cloning and characterization of Fasciola gigantica thioredoxin-glutathione reductase*. *Parasitology Research*, **114(6)**: 2119-2127.
109. Tsai, I.J.; *et, al.* 2013. *The genomes of four tapeworms species reveal adaptations to parasitism*. *Nature*, **496(7443)**: 57-63,
110. Angelucci, F.; A.E. Miele; G. Boumis; D. Dimastrogiovanni; M. Brunori y A. Belleli. 2008. *Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: the structure of Schistosoma mansoni thioredoxin glutathione reductase*. *Proteins*, **72(3)**: 936-945.
111. Bonilla, M.; A. Denicola; S.M. Marino; V.N. Gladyshev y G. Salinas. 2011. *Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths parasites: alternative pathways for glutathione reduction and deglutathionylation*. *The Journal of Biological Chemistry*, **286(7)**: 4959-4967.
112. Docampo, R. 1995. *Antioxidant Mechanisms. En Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Academic Press Limited. London, UK pp 147-160.
113. Berndt, C.; C.H. Lilling y A. Holmgren. 2007. *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system*. *American Journal of Physiology.Heart and Circulatory Physiology*, **292**: H-1227-H-1236.
114. Abbas, A.K.; A.H. Lichtman y J.S. Pober. 2002. *Inmunología celular y molecular*. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid, España, pp 564
115. Henkle-Dürshen, K. y A. Kampkötter. 2001. *Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **114**: 129-142.

116. Winterbourn, C.C. 2008. *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. Nature Chemical Biology, **4(5)**: 278-286.
117. Sarsour, E.H.; S. Venkataraman; A.L. Kalen; L.W. Oberley y P.C. Goswami. 2008. *Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth*. Aging Cell, **7(3)**: 405-417
118. Wang, X.; X. Liu; L.Xue; K. Zhang; M. Kou; S. Hu; B. Zhou; D. Ann; S. Zhang y Y. Yen. 2011. *Ribonucleotide Reductase Subunit p53R2 Regulates Mitochondria Homeostasis and Function in KB and PC-3 Cancer Cells*, Biochemical & Biophysical Research Communications. **410(1)**: 102-107
119. Smith N.C. y C. Bryant. 1989. *The effect of antioxidants on the rejection of Nippostrongylus brasiliensis*. Parasite Immunology, **12(2)**: 161-167
120. Dimastrogiovanni, D.; M. Anselmi; A.E. Miele; G. Boumin; L. Petersson; F. Angelucci; A.D. Nola; M. Brunori y A. Belleli. 2010. *Combining crystallography and molecular dynamics: the case of Schistosoma mansoni phospholipid glutathione peroxidase*. Proteins, **78(2)**: 259-270.
121. Kryukov G.V.; S. Castellano; S.V. Novoselov; A.V. Lobanov; O. Zehtab; R. Guigó y V.N. Gladyshev. 2003. *Characterization of mammalian selenoproteomes*. Science, **300**: 1439-1443
122. Rhee, S.G.; H.A. Woo; I.S. Kil y S.H. Bae. 2012. *Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides*. The Journal of Biological Chemistry, **287(7)**:4403-4410.
123. Saayed, A.A. y D.L. Williams. 2004. *Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins of Schistosoma mansoni*. The Journal of Biological Chemistry, **279(25)**: 26159-166.
124. Rigouin, C.; E. Nylin; A.A. Cogswell; D. Schaumlöffel; D. Dobritzsch y D.L. Williams. 2013. *Towards an understanding of the function of phytochelatin synthase of Schistosoma mansoni*. PLoS Neglected Tropical Diseases, **7(1)**: e2037.
125. Kuntz, A.N.; E. Davioud-Charvet; A.A. Sayed; L.L. Califf; J. Dessolin; E.S.J. Arnér y D.L. Williams. 2007. *Thioredoxin glutathione reductase from Schistosoma mansoni: an essential parasite enzyme and a key drug target*. PLoS Medicine, **4(6)**: e206.
126. Simeonov, A.; A. Jadhav; A.A. Sayed; Y. Wang; M.E. Nelson; C.J. Thomas; J. Inglese; D.L. Williams y C.P. Austin. 2008. *Quantitative high-throughput screen*

- identifies inhibitors of the Schistosoma mansoni redox cascade. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2(1): e127.*
127. Rai, G.; A.A. Sayed; W. A. Lea; H.F. Luecke; H. Chakrapani; S. Prast-Nielsen; A. Jadhav; W. Leister; M. Shen; J. Inglese; C.P. Austin; L. Keefer; E.S. Arnér; A. Simeonov; D.J. Maloney; D.L. Williams y C.J. Thomas. 2009. *Structure mechanism insights and the role of nitric oxide donation guide the development of oxidiazole-2-oxides as therapeutic agents against schistosomiasis. J. Med. Chem. 52(20): 6474-6483.*
128. Ross, F.; P. Hernández; W. Porcal; G.V. López; H. Cerecetto; M. González; T. Basika; C. Carmona; M. Fló; G. Maggioli; M. Bonilla; V.N. Gladyshev; M. Boiani y G. Salinas. 2012. *Identification of thioredoxin glutathione reductase inhibitors that kill cestode and trematode parasites. PLoS One, 7(4):e35033*
129. Saiz, C.; V. Castillo; P. Fontán; M. Bonilla; G. Salinas; A. Rodríguez-Haralambides y S.G. Mahler. 2014. *Discovering Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase inhibitors through site-specific dynamic combinatorial chemistry. Molecular Diversity, 18(1): 1-12.*
130. Guglielmo, S.; D. Cortese; F. Vottero; B. Rolando; V.P. Kommer; D.L. Williams; R. Fruttero y A. Gasco. 2014. *New praziquantel derivatives containing NO-donor furoxans and related furazans as active agents against Schistosoma mansoni. European Journal of Medicinal Chemistry, 84: 135-145.*
131. Johann, L.; D. Belorgey; H.H. Huang; L. Day; M. Chessé; K. Becker; D.L. Williams y E. Davioud-Charvet. 2015. *Synthesis and evaluation of 1,4-naphthoquinone ether derivatives as SmTGR inhibitors and new anti-schistosomal drugs. The FEBS Journal, 282(16): 3199-3217.*
132. Li, T.; P.D. Ziniel; P.Q. He; V.P. Kommer; G.J. Crowther; M. He; Q. Liu; W.C. Van Voorhis; D.L. Williams y M.W. Wang. 2015. *High-throughput screening against thioredoxin glutathione reductase identifies novel inhibitors with potential therapeutic value for schistosomiasis. Infectious Diseases of Poverty, 4: 40.*
133. Finkelstein, A.E.; D.T. Walz; V. Batista; M. Mizraji; F. Roisman y A. Misher. 1976. *Auranofin: new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. Annals of Rheumatic Diseases, 35: 251-257.*
134. Roder, Christine y M. J. Thompson. 2015. *Auranofin: repurposing and old drug for a golden new age. Drugs in R&D, 15(1):13-20.*

135. Jackson-Rosario, S.E. y W.T. Self. 2010. Targeting selenium metabolism and selenoproteins: Novel avenues for drug discovery. *Metallomics*, **2(2)**: 112-116.
136. Bonilla, M.; A. Denicola; S.V. Novoselov; A.A. Turanov; A. Protasio; D. Izmendi; V.N. Gladyshev y G. Salinas. 2008. *Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione*. *The Journal of Biological Chemistry*, **283(26)**: 17898-17907.
137. Martínez-González, J.J.; A. Guevara-Flores; G. Álvarez; J.L. Rendón-Gómez y I.P. del Arenal. 2010. *In vitro killing action of auranofin on Taenia crassiceps (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR)*. *Parasitology Research*, **107(1)**: 227-231.
138. Abdin, A. A.; D.S. Ashour, y Z.S. Shoheib. 2013. *Artesunate effect on schistosome thioredoxin glutathione reductase and cytochrome c peroxidase as new molecular targets in Schistosoma mansoni-infected mice*. *Biomed. Environ. Sci.* **26(12)**:953-961.
139. Otero, L.; M. Bonilla; A.V. Protasio; C. Fernández; V.N. GLadyshev y G. Salinas. 2010. *Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths*. *BMC Genomics*, **11**: 237.
140. Rigobello, M.P. y A. Bindoli. 2010. *Mitochondrial thioredoxin reductase: purification, inhibitor studies and role in cell signaling*. *Methods in Enzimology*, **474**: 109-122.
141. Bhabak, K. P.; B. J. Bhuyan y G. Mugesh. 2011. *Bioinorganic and medicinal chemistry: aspects of gold (I)-protein complexes*. *Dalton Transactions*, **40(10)**: 2099-2111.
142. del Arenal, I. P.; M. E. Rubio; J. Ramírez; J. L. Rendón; E. Escamilla. 2005. *Cyanide-resistant respiration in Taenia crassiceps metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂*. *Parasitology International* **54(3)**:185-193.
143. Avilés, C.; M.E. Torres-Márquez; D. Mendoza-Cózatl y R. Moreno-Sánchez. 2005. *Time-course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*, **184(2)**: 83-92.
144. Griffith, O. W. 1980. *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine*. *Analytical Biochemistry*, **106(1)**: 207-212.

145. Priora, R.; L. Coppo; S. Salzano; P. Di Simplicio y P. Ghezzi. 2010. *Measurement of mixed disulfides including glutathionylated proteins*. *Methods in Enzymology*, **473**:149-159.
146. Akerboom, T. P. y H. Sies. 1981. *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples*. *Methods in Enzymology*, **77**: 373-382.
147. Shen, D.; T.P. Dalton; D.W. Nerbert y H.G. Shertzer. *Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production*. *The Journal of Biological Chemistry*, **280(27)**: 25305-25312.
148. Holmgren, A. 1979. *Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide*. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**: 9627–9632.
149. Arnér, E.S.J; L. Zhong y A. Holmgren. 1999. *Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase*. *Methods in Enzymology*, **300**: 226–239.
150. Logan-Klumper, F.J.; *et al.* 2012. *GeneDB—an annotation database for pathogens*. *Nucleic Acids Research*, **40**: D98–D108.
151. Larkin, M.A.; G. Blackshields; N.P. Brown; R. Chenna; P.A. Mcgettigan; H. Mcwilliam; *et al.* 2007. *Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, **23**: 2947–2948.
152. Waterhouse, A.M.; J.B. Pocter; D.M.A. Martin; M. Clamp y G.J. Barton. 2009. *Jalview Version 2 a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. *Bioinformatics*, **25**: 1189–1191.
153. Arnold, K.; I. Bordoli; J. Kopp y T. Schwede. 2006. *The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. *Bioinformatics*, **22**: 195–201.
154. Schwede, T.; J. Kopp; N. Guex y M.C. Peitsch. 2003. *SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server*. *Nucleic Acid Research*, **31**: 3381–3385.
155. Bordoli, I.; F. Kiefer, K. Arnold; P. Benkert; J. Battey y T. Schwede. 2009. *Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace*. *Nature Protocols*, **4(1)**: 1–13.
156. Benkert, P.; S.C. Tosatto y D. Schomburg. 2008. *QMEAN: a comprehensive scoring function for model quality assessment*. *Proteins*, **71**: 261–277.

157. Melo, F. y E. Feytmans. 1998. *Predicting reliable regions in protein alignments from sequences profiles*. Journal of Molecular Biology, **330**: 705–718.
158. Van Gunsteren, W.F, et al.1996. *Biomolecular Simulations: the GROMOS96 Manual and User Guide*. Zürich: VdF Hochschulverlag ETHZ.
159. Baker, N.A.; D. Sept; S. Joseph; M.J. Holst y J.A. McCammon. 2001. *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proceedings of National Academy of Science of the U S A, **98**: 10037–10041.
160. Dolinsky, T.J.; P. Czodrowski; H. Li; J.E. Nielsen; J.H. Jensen; G. Klebe; et al. 2007. *PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations*. Nucleic Acids Research, **35**: W522–525.
161. Dolinsky, T.J.; J.E. Nielsen; J.A. McCammon y N.A. Baker. 2004. *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations*. Nucleic Acids Research, **32**: W665–667.
162. Fritz-Wolf, K.; S. Kehr; M. Stumpf; S. Rahlfs y K. Becker. 2011. Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex. Nature Communications, **2**: 383.
163. Atkuri, K.R.; J.J. Mantovani; L.A. Herzenberg y L.A. Herzenberg. 2007. *N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency*. Current Opinion in Pharmacology, **7**: 355-359.
164. Samuni, Y.; S. Goldstein; O.M. Dean y M. Berk. 2013. *The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine*. Biochimica et Biophysica Acta, **1830**: 4117-4129.
165. Gegg, M.E.; J.B. Clark y S.J.R. Heales. 2002. *Determination of glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) activity by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection*. Analytical Biochemistry, **304**: 26-32.
166. Wardman, P. and von Sonntag, C. 1995. *Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells*. Methods in Enzymology, **251**: 31–45.
167. Lewerenz, J. y P. Maher. 2011. *Control of redox state and redox signaling by neural antioxidant systems*. Antioxidant & Redox Signaling, **14(8)**: 1449-1465.
168. Circu, M. L. y T.Y. Aw. 2011. *Redox biology of the intestine*. Free Radical Research, **45(11-12)**: 1245-1266.

169. Clemens, S. 2006. *Evolution and function of phytochelatin synthases*. Journal of Plant Physiology, **163(3)**: 319-332.
170. Liebeke, M.; I. Garcia-Perez; C.J. Anderson; A.J. Lawlor; M.H. Benneth; C.A. Morris; P. Kille; C. Svendsen; D.J. Spurgeon y J.G. Bundy. 2013. *Earthworms produce phytochelatin in response to arsenic*. PLoS One. **8(11)**: e81271.
171. Rigouin, C.; E. Nylin; A.A. Cogswell; D. Schaumlöffel; D. Dobritsch y D.L. Williams. 2013. *Towards an understanding of the function of the phytochelatin synthase of Schistosoma mansoni*. PLoS Neglected Tropical Diseases, **7(1)**: e2037.
172. Ray, D. y D.L. Williams. 2011. *Characterization of the phytochelatin synthase of Schistosoma mansoni*. PLoS Neglected Tropical Diseases, **5(5)**:e1168.
173. Bachhawat, A.K.; A. Thakur; J. Kaur y M. Zulkifli. 2013. *Glutathione transporters*. Biochimica et Biophysica Acta, **1830(5)**: 3154-3164.
174. Baker, N.A.; D. Sept; S. Joseph; M.J. Holst y J.A. McCammon. 2001. *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proceedings of National Academy of Science of USA, **98**: 10037–10041.
175. Williams, D.L. 2007. *Thioredoxin glutathione reductase from Schistosoma mansoni: an essential parasite enzyme and a key drug target*. PLoS Medicine, **4(6)**:1071–1085.
176. Sandalova, T.; L. Zhong; Y. Lindqvist; A. Holmgren y G. Schneider. 2001. *Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme*. Proceedings of National Academy of Science, **98**: 9533–9538.
177. Fritz-Wolf, K.; E. Jortzik; M. Stumpf; J. Preuss; R. Lozef; S. Rahlfas, *et al.* 2013. *Crystal structure of the Plasmodium falciparum thioredoxin reductase-thioredoxin complex*. Journal of Molecular Biology, **425**: 3446–3460.
178. Ambrosio, J.; A. Landa; T. Merchant y J.P. Lacleite. 1994. *Protein uptake by cysticerci of Taenia crassiceps*. Archives of Medical Research. **25**: 325-330; 1994.
179. Guevara- Flores, A. 2004. *Caracterización parcial del sistema de glutatión y de tiorredoxina en el cisticerco de Taenia crassiceps*. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM.

180. Roche, C.; J.L. Liu; T. LePresle; A. Capron y R.J. Pierce. 1996. *Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology, **75(2)**: 187-195.
181. Cai, G.B.; Y.A. Bae; S. H. Kim; W. M. Sohn; Y.S. Lee; M.S. Jiang; T.M. Kim y Y. Kong. 2008. Vitellocyte-specific expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in *Clonorchis sinensis*. International Journal of Parasitology, **38(14)**: 1613-1623.
182. Harispe, L.; G. García; P. Arbildi; L. Pascovich; C. Chalar; A. Zaha; C. Fernandez y V. Fernandez. 2010. *Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode Echinococcus granulosus*. Acta Tropica, **114(1)**: 31-36.
183. Nguyen, H.A.; Y.A. Bae; E.G. Lee; S.H. Kim; S.P. Diaz-Camacho; Y. Nawa; I. Kang y Y. Kong. 2010. *A novel sigma-like glutathione transferase of Taenia solium metacestode*. International Journal of Parasitology, **40(9)**: 1097-1106.
184. LaCourse, E.J.; S. Perally; R.M. Morphew; J.V. Moxon; M. Prescott; D.J. Dowling; S.M. O'Neill; A. Kipar; U. Hetzel; E. Hoey; R. Zafra y L. Buffoni; J. Pérez Arévalo y P.M. Brophy. 2012. *The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke Fasciola hepatica*. PLoS Neglected Tropical Diseases, **6(5)**: e1666.
185. Sies, H.; Akerboom, T. P. 1984. *Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues*. Methods in Enzymology, **105**:445-451.
186. Franco, R. y J.A. Cidlowski. 2012. *Glutathione efflux and cell death*. Antioxidants & Redox Signaling, **17(12)**: 1694-1713.
187. Morgan, B.; D. Ezerina; T.N. Amoako; J. Riemer; M. Seedorf y T.P. Dick. 2013. *Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis*. Nature Chemical Biology, **9(2)**: 119-125.
188. Gallogly, M. M. y J.J. Mieyal, J. J. 2007. *Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress*. Current Opinion in Pharmacology, **7(4)**: 381-391.
189. Shelton, M. D.; P. B. Chock y J.J. Mieyal. 2005. *Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation*. Antioxidants & Redox Signaling, **7(3-4)**: 348-366.
190. Line, K.; M.N. Isupov; E. García-Rodríguez; G. Maggioli; F. Parra y J.A. Littlechild. 2008. *The Fasciola hepatica thioredoxin: high resolution structure reveals two oxidation states*. Molecular and Biochemical Parasitology, **161(1)**: 44-48.

191. Boumis, G.; F. Angelucci; A. Belleli; M. Brunori; D. Dimastrogiovanni y A.E. Miele. 2011. *Structural and functional characterization of Schistosoma mansoni thioredoxin*. Protein Science: a publication of the Protein Society, **20(6)**: 1069-1076.
192. Chalar, C; C. Martínez; A. Agorio; G. Salinas; J. Soto y R. Ehrlich. 1999. *Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from Echinococcus granulosus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **262**: 302–307.
193. Watson, W.H.; J. Pohl; W.R. Montfort; O. Stuchlik; M.S. Reed; G. Powis; *et al.* 2003. *Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif*. Journal of Biological Chemistry, **278**: 33408–33415.
194. Weichsel, A.; G.R. Gasdaska; G. Powis y W.R. Montfort. 1996. *Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer*. Structure, **4**: 735–751.
195. Kanzok, S.M.; A. Fechner; H. Bauer; J.K. Ulschmid, H. Müller; J. Botella-Muñoz, *et al.* 2001. *Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in Drosophila melanogaster*. Science, **291**: 643–646.
196. Oliveira, M.A.; K.F. Discola, S.V. Alves; F.J. Medrano; B.G. Guimaraes y L.E.S. Netto. 2010. *Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system*. Biochemistry, **49**: 3317-3326.
197. Katti, S.K.; D.M. LeMaster y H. Exlund. 1990. *Crystal structure of thioredoxin from Escherichia coli at 1.68 Å resolution*. Journal of Molecular Biology, **212**: 167–184.
198. Wahl, M.C.; A. Irmler; B. Hecker; R.S. Schirmer y K. Becker. 2005. *Comparative structural analysis of oxidized and reduced thioredoxin from Drosophila melanogaster*. Journal of Molecular Biology, **345**: 1119–1130.
199. Guevara-Flores, A.; I.P. del Arenal; G. Mendoza-Hernández; J.P. Pardo; O. Flores-Herrera y J.L. Rendón. 2010. *Mitochondrial thioredoxin-glutathione reductase from larval Taenia crassiceps (Cysticerci)*. Journal of Parasitology Research, **2010**: 719856.

200. World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/); 2012.
201. Garcia, H. H.; P.L. Moro y P.M. Schantz. 2007. *Zoonotic helminth infections of human: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis*. Current Opinion in Infectious Diseases, **20**: 489-494.
202. Flisser, A.; D. Correa y C.A. W. Evans. 2002. *Taenia solium* Cysticercosis : new and revisited immunological aspects. In: Singh, G.; S. Prabhakar; eds. *Taenia solium cysticercosis: from basic to clinical science*. New York, US: CABI Publishing; 15-24.
203. Eckert, J. y P. Deplazes. 2004. *Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern*. Clinical Microbiology Reviews, **17(1)**: 107-135.
204. Nash, T. E.; L.A. Bartelt; P.S. Korpe; B. Lopes y E.R. Houpt. 2014. *Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **90(2)**: 318-321.
205. Williams, D. L.; M. Bonilla; V.N. Gladyshev y Salinas, G. 2013. *Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites*. Antioxidants & Redox Signaling, **19(7)**:735-745.
206. Rigobello, M.P.; G. Scutari; R. Boscolo y A. Bindoli. 2002. *Induction of mitochondrial permeability transition by Auranofin, a gold(I)-phosphine derivate*. British Journal of Pharmacology, **136**: 1162-1168.
207. Rigobello, M.P.; G. Scutari; A. Folda y A. Bindoli. 2004. *Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochromo c*. Biochemical Pharmacology, **67**: 689-696.
208. Rigobello, M.J.; L. Messori; G. Marcon; M.A. Cinellu; M. Bragadin; A. Folda; G. Scutari y A. Bindoli. 2004. *Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions*. Journal of Inorganic Biochemistry, **98**: 1634-1641.

ANEXO. ARTÍCULO REQUISITO



Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci



J.J. Martínez-González, A. Guevara-Flores, J.L. Rendón, I.P. del Arenal*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-159, 04510 Mexico, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2014
Received in revised form 28 March 2015
Accepted 6 May 2015
Available online 27 May 2015

Keywords:

Platyhelminths
Taenia crassiceps
Glutathione
Thioredoxin-glutathione reductase
Auranofin
N-acetyl cysteine
Buthionine sulfoximine

ABSTRACT

Previously, we have studied the effect of the gold-compound auranofin (AF) on both thioredoxin-glutathione reductase (TGR) activity and viability of *Taenia crassiceps* cysticerci. It was demonstrated that micromolar concentrations of AF were high enough to fully inhibit TGR and kill the parasites. In this work, the dynamics of changes in the glutathione pool of *T. crassiceps* cysticerci following the addition of AF, was analyzed. A dose-dependent decrease in the internal glutathione concentration, concomitant with an increase in ROS production was observed. These changes were simultaneous with the formation of glutathione-protein complexes and the export of glutathione disulfide (GSSG) to the culture medium. Incubation of cysticerci in the presence of both AF and N-acetyl cysteine (NAC) prevents all the above changes, maintaining cysticerci viability. By contrast, the presence of both AF and buthionine sulfoximine (BSO) resulted in a potentiation of the effects of the gold compound, jeopardizing cysticerci viability. These results suggest the lethal effect of AF on *T. crassiceps* cysticerci, observed at micromolar concentrations, can be explained as a consequence of major changes in the glutathione status, which results in a significant increase in the oxidative stress of the parasites.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The tripeptide glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) is the major low-molecular-mass thiol compound in most cells [1] and participates in such diverse biological processes: detoxification of both reactive oxygen species (ROS) and reactive electrophilic compounds [2,3], maintenance of the cellular redox status [4], redox-dependent signaling [5], cell proliferation and differentiation [6,7] and apoptosis [8].

Cell glutathione may be present in three forms: reduced (GSH), oxidized (GSSG) and in a complexed form, mainly with proteins (PSSG) [9]. Under physiological conditions, GSH is significantly favored over GSSG due to the activity of the NADPH-dependent flavoenzyme glutathione reductase (GR, E.C. 1.6.4.2. NAD[P]H:GSSG oxidoreductase) [10]. However, some pathological conditions [11],

as well as ROS-dependent signaling-processes [12] have been found to result in a decreased [GSH]/[GSSG] ratio due to oxidative stress, which increase the formation of glutathione-protein mixed disulfides [13] and the GSSG excretion [14,15]. Nevertheless, few works have studied the dynamics of glutathione under physiological or oxidative-stress conditions [16–19].

Unlike vertebrates, where glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR, E.C. 1.8.1.9. NAD [P] H : thioredoxin oxidoreductase) are present as different proteins [10,20], in the parasitic flatworms, the redox homeostasis is dependent on a single enzyme: thioredoxin-glutathione reductase (TGR, E.C.1.8.1.B1. NAD[P]H:GSSG-thioredoxin oxidoreductase), which provides electrons for the reduction of both GSSG and oxidized thioredoxin [21]. Like glutathione, thioredoxin plays a key role in the regeneration of proteins that have undergone oxidative stress and ROS detoxification [22,23].

In 2001, the multifunctional properties of TGR were characterized in *Mus musculus* [24]. The first report of this atypical disulfide reductase in flatworms, was in the cestode *Moniezia expansa* in 1995 [25], although it was erroneously considered as a GR. To date, TGR has been reported in the trematodes *Schistosoma mansoni* [26], *Fasciola hepatica* [27] and *S. japonicum* [28], as well as in the cestodes *Echinococcus granulosus* [29] and *Taenia crassiceps* [30]. Subsequent studies showed that in flatworms cytosolic and

Abbreviations: AF, auranofin; BSO, buthionine sulfoximine; GR, glutathione reductase; GSH, reduced-form glutathione; GSSG, glutathione disulfide; NAC, N-acetyl cysteine; PSSG, protein-complexed glutathione; ROS, reactive oxygen species; TGR, thioredoxin-glutathione reductase; Trx, thioredoxin; TrxR, thioredoxin reductase.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56232169; fax: +52 55 56162419.
E-mail address: darenal@bq.unam.mx (I.P. del Arenal).

mitochondrial isoforms are encoded by a single gen [31] although with different kinetic properties [32].

In spite of the significant number of reports on TGR in parasitic flatworms, no information concerning the glutathione or the thioredoxin pools in these organisms is available. Due to the different nature of the detoxification systems between flatworms and their vertebrate hosts, TGR has been proposed as a drug target [33]. We have previously demonstrated both *in vitro* [30] and *in vivo* the inhibition of TGR by auranofin (AF), as well as its effect on the viability of *T. crassiceps* cysticerci [34]. AF is an antirheumatic gold-derivatized salt [35], which specifically inhibits selenoproteins, such as mammalian TrxR and TGR [36].

The correct equilibrium in the glutathione pool between its oxidized and reduced states is critical for cell survival. In this work, the importance of glutathione in redox homeostasis and its global distribution in *T. crassiceps* cysticerci in response to the oxidative stress caused by AF was evaluated. Our results show that in this parasite, AF cause significant changes in the [GSH]/[GSSG] ratio, S-glutathionylation and the GSSG excretion rate, suggesting a key role of glutathione in the redox homeostasis of these organisms.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Auranofin (AF) was obtained from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). Dimethylsulfoxide (DMSO) was obtained from MERCK (Hohenbrunn, Germany) while the RPMI-1640 medium was obtained from Life Technologies–Gibco (Grand Island, NY, USA). All others chemicals were purchased from SIGMA–ALDRICH Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Water purified by reverse osmosis was used in the solutions preparation.

2.2. Growth of *T. crassiceps* cysticerci

Female Balb/c mice were inoculated with about 20 cysticerci of the *T. crassiceps* HYG strain by injection into the peritoneal cavity, as previously described [37]. Two to four months later, cysticerci were recovered from the peritoneal cavity under sterile conditions. Before use, larvae were washed thoroughly with 10 mM phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.4. In order to obtain a homogeneous population, cysticerci of about 3.0 mm diameter were selected by filtration through a sieve.

2.3. Cysticerci maintenance and treatments

The conditions for the cysticerci maintenance in culture medium have been previously described [34]. Briefly, 300 cysticerci (approximately 3 mL) were carried to 20 ml with RPMI-1640 medium (pH 7.0) supplemented with 1% penicillin-streptomycin and incubated during three hours under aerobic conditions in a rotatory shaker at 37 °C in the presence of either 10 mM N-acetyl cysteine (NAC) dissolved in 100 mM HEPES (pH 7) or 100 μM buthionine sulfoximine (BSO) dissolved in PBS. Then, AF (dissolved in 100% DMSO) was added at the corresponding final concentration (0, 2, 4 or 10 μM) and the culture was maintained for an additional 13 h period under the same incubation conditions. Control samples were maintained in the presence of medium plus DMSO at the concentration used in the AF samples. After the treatment, cysticerci were recovered, washed with PBS and separated in aliquots. The maintenance media were also recovered and stored at –70 °C to measure glutathione content.

2.4. Cysticerci viability

Cysticerci viability was evaluated by both vital staining (0.02% trypan blue) and temperature-induced motility, as previously reported [34].

2.5. Determination of gamma-glutamyl-cysteine synthetase activity in crude extract

Immediately after drug exposure, 100 cysticerci were harvested, washed with PBS, and then homogenized with a Teflon pestle in the presence of 86 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and centrifuged at 14,600 × g for 15 min to discard mitochondria and then at 269,000 × g for 45 min. to discard the microsomal fraction. To eliminate low molecular weight metabolites, the high-speed supernatant was dialyzed overnight against 10 volumes of 100 mM Tris/HCl buffer 1 mM EDTA (pH 8.0) at 4 °C. For the determination of gamma-glutamyl-cysteine synthetase activity, an aliquot of 100 μL was incubated at 37 °C with saturating concentrations of 0.8 mM glutamate, 0.8 mM cysteine, 5 mM ATP and 20 mM MgCl₂. After 30 min, the reaction was stopped by addition of 6% perchloric acid (PCA). After centrifugation an aliquot of 100 μL was taken off and analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) using an analytic column C-18 Spherisorb S5 ODS2 (PSS 831,913), according to Aviles et al. [38]. Commercial gamma-glutamyl cysteine was used as standard.

2.6. Identification of TGR-activity in crude extract

A 100 cysticerci sample homogenized as mentioned above and centrifuged at 38,800 × g for 30 min. The supernatant was recovered and dialyzed overnight against 10 volumes of 50 mM Tris plus 1 mM EDTA 1 mM pH 7.8 at 4 °C.

TGR activity was measured using a 100 mM Tris/HCl buffer, 2 mM EDTA (pH 7.8) buffer and 120 μM NADPH. The reaction was started by the addition of 200 μL of dialyzed extract and the endogenous thioredoxin-dependent NADPH consumption was followed at 340 nm.

2.7. Determination of cytosolic pH in *T. crassiceps* cysticerci

Cysticerci (~500) were punctured with a needle to extract and discard the vesicular liquid. Next, cysticerci were carefully washed three times with bidistilled H₂O (pH 7) and squeezed by centrifugation at 68,000 × g for 45 min. Finally, the pH in the supernatant (cytosolic fraction) was determined using a pH-meter 320 (CORNING). The measurements were made by triplicate in ten different cysticerci samples.

2.8. Obtention of deproteinized extracts

An aliquot containing 200 cysticerci was harvested immediately after the corresponding treatment, washed with PBS, and then homogenized with a Teflon pestle in the presence of an equal volume of 2 M ice-cold perchloric acid (PCA) containing 4 mM EDTA. The resultant suspension was centrifuged at 68,000 × g for 1 h to remove the precipitated protein. The supernatant was neutralized with 2.0 M KOH containing 0.3 M N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), and fractioned in aliquots for determination of both internal glutathione equivalents (GSH + 2 × [GSSG]) and oxidized glutathione (GSSG). An aliquot of the acid supernatant was immediately derivatized with 180 mM of 2-vinylpyridine (2-VP) for GSSG determination. 2-VP does not interfere with glutathione determinations [39]. The sample lacking 2-VP was used for determination of internal glutathione equivalents.

2.9. Reduction of protein-complexed glutathione

To determine the amount of protein-bound glutathione (PSSG) the protein pellet obtained as described above was recovered and washed twice with 2.0 M PCA and 4.0 mM EDTA and centrifuged for 30 min at 25,000 × g at room temperature. The pellets were resuspended in 1.0 ml of 100 mM potassium phosphate buffer 1 mM EDTA (pH 7.4), and the pH raised up to 8.2–8.4 with 1 N NaOH; then, dithiothreitol (DTT) at a final concentration of 8 mM was added and the samples were incubated for 20 minutes at room temperature. The reduced sample was again deproteinized and neutralized as described above to quantify the free glutathione in the supernatant. Excess DTT does not interfere with glutathione determinations [40].

2.10. Glutathione determination

The total non-complexed glutathione equivalents was determined spectrophotometrically using the Akerboom and Sies method [41] as follows: a 50 µl aliquot of neutralized extract was mixed with NADPH (128 µM) and DTNB (582 µM) in 100 mM potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA (pH 7.0) in a final volume of 1 mL. The absorbance at 412 nm of the mixture was registered 10 min at 25 °C and then 50 mU of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase (ScGR) was added to start the reaction. The formation of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) was followed spectrophotometrically at 412 nm. The glutathione content of the aliquot assayed was determined interpolating the initial slope in a standard curve generated with known amounts of oxidized glutathione. The same procedure was used for the determination of GSSG content, using a 2-VP derivatized sample.

2.11. Calculation to obtain the total distribution of glutathione in cysticerci

The concentration of internal non-complexed glutathione (internal glutathione equivalents) was obtained as the summatory of both the reduced (one equivalent for molecule) and the oxidized form (two-equivalents for molecule) of glutathione according to equation 1:

$$[\text{Internal glutathione equivalents}] = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}] \quad (1)$$

GSH represents the difference between Internal Glutathione equivalents and GSSG:

$$[\text{GSH}] = [\text{Internal glutathione equivalents}] - 2 \times [\text{GSSG}] \quad (2)$$

The total internal glutathione concentration was calculated by adding protein-bound glutathione (PSSG) (one-equivalent for molecule) to Internal glutathione equivalents:

$$[\text{Total internal glutathione}] = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}] + [\text{PSSG}] \quad (3)$$

Total glutathione equivalents were obtained according to the Internal glutathione and expelled GSSG (two-equivalents for molecule):

$$\begin{aligned} [\text{Total glutathione equivalents}] \\ = [\text{Total internal glutathione}] + 2 \times [\text{GSSG}_{\text{expelled}}] \end{aligned} \quad (4)$$

2.12. Calculation of redox potential for glutathione

The E value was calculated as previously reported by Shen et al. [42]:

$$E_h = E_h^0 + \left(\frac{RT}{nF} \right) \times (\text{pH}_{\text{actual}} - \text{pH}_{\text{standard}}) - \left(\frac{RT}{nF} \right) \times \text{Ln} \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right) \quad (5)$$

where n is the number of electrons transferred, R is the universal gas constant (8.31 J K⁻¹ mol⁻¹), T is the temperature in Kelvin, and F is the Faraday constant (9.65 × 10⁴ J vol⁻¹ mol⁻¹). At 37 °C, E is shown in (6):

$$E_h = -240\text{mV} + \left(\frac{-61.5\text{mV}}{2e^-} \right) \times (\text{pH}_{\text{actual}} - 7) - \left\{ \left(\frac{61.5\text{mV}}{2e^-} \right) \times \log \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right) \right\} \quad (6)$$

A physiological cytosolic pH value of 8.2 in *T. crassiceps* cysticerci ($n = 10$) was used in these calculations.

2.13. ROS production in whole *T. crassiceps* cysticerci

To evaluate the AF-induced ROS-generation, 10 cysticerci treated as mentioned above (see *Cysticerci maintenance and treatments*) were harvested immediately after drug exposure and washed with PBS. Then the samples were incubated during 30 min, under darkness conditions at 37 °C in the presence of 10 µM 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate diluted in PBS (H₂DCFDA). Then, the cysticerci were recovered, washed twice with cold-PBS and finally placed in a 96-wells plate to measure the fluorescence (absorption 485 nm /emission 530 nm) produced by the oxidation of H₂DCFDA in the presence of ROS. Controls to evaluate autofluorescence of each compound (AF, NAC, BSO), dissolvents (DMSO, PBS) and cysticerci, were performed and the corresponding fluorescence measurement was subtracted. Each experiment was fivefold realized.

2.14. Data presentation and statistical analysis

All data shown represents mean ± SD (standard deviation of the mean) of 4 independent experiments, each one performed in duplicate. Data were evaluated for statistical significance using OriginPro (version 8) and one-way ANOVA and Tukey post hoc test ($p < 0.05$ was considered significant).

3. Results and discussion

3.1. NAC inhibits and BSO enhances the AF-mediated lethal effect on cysticerci and TGR inhibition

As has been reported in the literature, cysticerci can to catch different molecules from the environment [43]. To verify the ability of cysticerci to synthesize glutathione, we measured the activity of the first enzyme involved in glutathione synthesis, γ-glutamylcysteine ligase. The measured activity in the cytosolic fraction was of 0.987 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein. This value is similar to that reported in cytosolic fraction of liver rat (1.38 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein) [44], suggesting and indicating the endogenous origin of the tripeptide.

To explore the importance of glutathione in cysticerci viability, *T. crassiceps* metacystodes were treated during 3 h with either 10 mM NAC (a glutathione synthesis promoter and thiol antioxidant) or 100 µM of BSO, (an inhibitor of glutamate-cysteine ligase, the rate-limiting enzyme in glutathione biosynthesis). Then, AF at a final concentration of 2, 4 or 10 mM was added. Preincubation of cysticerci with NAC completely suppressed the lethal effect of AF, while BSO treatment enhances it (Fig. 1a). These results suggest: (i) an important role of glutathione in cysticerci viability, (ii) glutathione has a half-life greater than 13 h (Fig. S1) contrary to mammals [44]. Control experiments revealed that NAC or BSO by itself did not affect cysticerci viability.

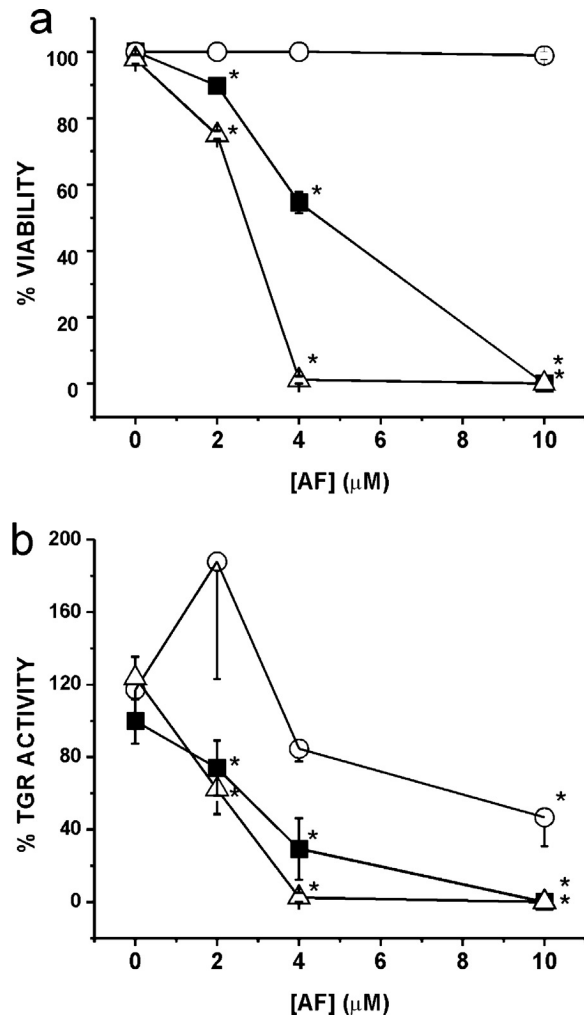


Fig. 1. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on *T. crassiceps* survival and TGR activity. *T. crassiceps* cysticerci were pre-incubated for 3 h with either 10 mM NAC (open circle), 100 μM BSO (open triangle), or AF-vehicle (100% DMSO) (filled square) as a control. Then, AF at the indicated final concentration was added at media and incubation was extended for an additional 13 h period before determination of cysticerci viability (a) and residual TGR activity (b) determined in crude extracts. Each point represent mean ± standard deviation ($n = 4$). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

The lethal effect of AF and other nucleophilic compounds has been related to its ability to inhibit the selenium-dependent thioredoxin reductase [36]. Previously, we reported that 10 μM AF fully inhibits TGR in cysticerci [34], an effect also observed in *T. solium* cysticerci (Fig. S2). To analyze the effect of NAC and BSO on the AF-mediated TGR inhibition, cysticerci from the experiments described above were recovered and homogenized to assay TGR activity in the crude extracts. Treatments with NAC or BSO alone had no effect on TGR activity, while the presence of AF results in inhibition of the TGR activity, as expected (Fig. 1b). By contrast, when NAC and AF were used in combination, a partial inhibition on TGR was observed, differing from the decrease in TGR activity obtained in the of BSO-AF treatment, as compared with AF alone. Further experiments indicated that the relative protective effect of NAC (or other low-molecular weight thiols such as Cys or GSH) was not due to formation of an AF-thiol complex during the incubation or treatment (Fig. S3a).

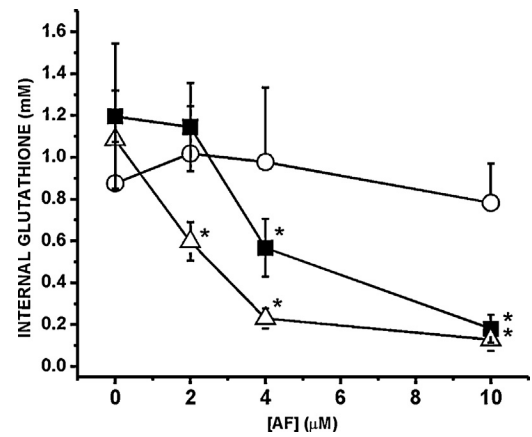


Fig. 2. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on internal glutathione content in *T. crassiceps* cysticerci. Incubation conditions and treatments were as described in the legend to Fig. 1. At the end of the incubation period cysticerci were recovered and assayed for internal glutathione concentration ($[GSH] + 2[GSSG]$) as described under Section 2. Symbols represent incubation with AF in the presence of either 10 mM NAC (open circle), 100 μM BSO (open triangle), or AF-vehicle (100% DMSO) (filled square). Each point represent mean ± standard deviation ($n = 4$). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

3.2. BSO diminishes while NAC maintains the internal glutathione levels in cysticerci

To determine if the NAC-mediated protection could be due to its ability to promote glutathione synthesis through an increase in the intracellular concentration of cysteine (as glutathione precursor) or as a result of its intrinsic ROS-scavenger activity, we measured the internal glutathione equivalents ($GSH + 2 \times (GSSG)$) (Fig. 2) and ROS production (Fig. 3) in AF-exposed cysticerci preincubated with either NAC or BSO. Under physiological conditions, one *T. crassiceps* cysticercus has 7 ± 1 nmoles of glutathione equivalents corresponding to a concentration of 1.2 ± 0.3 mM ($n = 4$) (Fig. 2). AF by itself diminished the internal glutathione content in a dose-dependent way and this effect was significantly enhanced in the BSO-AF treatment. In the presence of NAC, AF did not significantly change the internal glutathione levels. NAC or BSO alone had no significant effect on internal glutathione content. These results

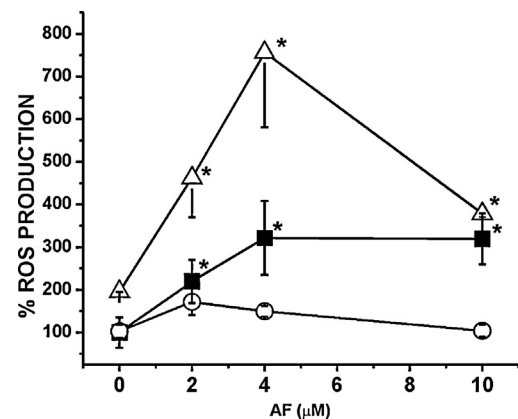


Fig. 3. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on ROS production in *T. crassiceps* cysticerci. Incubation conditions and treatments were as described in the legend to Fig. 1. At the end of the incubation period cysticerci were recovered and incubated with 10 μM H_2DCF -DA in order to determine ROS production in treated cysticerci. Symbols represent incubation with AF in the presence of either 10 mM NAC (open circle), 100 μM BSO (open triangle), or AF-vehicle (100% DMSO) (filled square). Each point represent mean ± standard deviation ($n = 4$). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

suggest that the NAC protective effect could be due to a potential ROS-scavenger activity during TGR-inhibition.

Thus, the ROS production in the treated cysticerci was evaluated (Fig. 3). In the presence of AF, a four-fold increase in ROS was observed, while in the BSO-AF treatment, the ROS production was increased up to eight times as compared with the basal production. BSO by itself, doubles the ROS present in cysticerci. In the case of the NAC-AF treatment, the ROS levels quantity remained constant. Although NAC is considered as a poor-ROS scavenger [45], the results obtained suggest the possibility that NAC act as a ROS scavenger. However, a more detailed study of the effect of NAC showed that this compound can reduce directly GSSG, transferring its reducing equivalents and thus act as a GR mimic (Fig. S3b).

3.3. AF promotes an increase of the glutathione-oxidized forms

An expected consequence of TGR inhibition by AF is the accumulation of the oxidized forms of both Trx and GSH causing an oxidative stress and therefore, the decrease in ROS scavenger. To confirm this prediction, the main oxidized forms of glutathione were quantified (i.e., internal glutathione disulfide (GSSG) and protein-bound glutathione (PSSG)). This disulfide was also measured in the incubation media, to explore the possibility that it could be expelled from the cysticerci. Under basal conditions, the distribution of the glutathione oxidized species was as follows: 0.009 ± 0.001 mM GSSG, 0.044 ± 0.005 mM PSSG in the cysticerci and 0.045 ± 0.016 mM GSSG ($n=4$) in the culture medium.

With $2.0 \mu\text{M}$ AF, an increase in the content of both internal GSSG and PSSG was found (Fig. 4a and b, respectively), while at higher concentrations of AF both forms returned to its basal levels. A similar result was observed in the BSO-AF treated cysticerci. In contrast, in the presence of NAC-AF the various oxidized species of glutathione were maintained within basal conditions. On the other hand, at higher AF concentrations, it became clear that there was no increase in the internal GSSG content as result of TGR inhibition by AF. Further, no accumulation of glutathione complexed to protein was observed. Thus, the significant decrease in the internal glutathione content is not explained by its conversion into oxidized forms. The possibility that a significant fraction of the glutathione pool could be exported was explored.

Fig. 4c shows the concentration of GSSG in the incubation media as a function of AF concentration under the three conditions tested. In the absence of AF, a basal level of 0.045 ± 0.016 mM ($n=4$) for GSSG was measured; in the presence of either AF or BSO-AF, a significant increase in the concentration of GSSG was observed. By contrast, no change in the NAC-AF treated cysticerci was detected.

These results suggest that the oxidizing condition generated by the AF-mediated inhibition of TGR promotes the formation and efflux of GSSG.

3.4. AF diminishes the [GSH]/[GSSG] ratio while increase the redox potential of glutathione

The parameters most frequently used to evaluate the cellular redox environment are the [GSH]/[GSSG] ratio [46] and/or the redox potential of glutathione [47]. Under physiological conditions, the [GSH]/[GSSG] ratio reported for the cytosolic compartment is about 100 [10], while the steady state redox potential of glutathione is within the range -260 to -200 mV at pH 7 ($n=4$) [7,47]. To determinate the redox potential at physiological conditions, we measured the redox potential at physiological conditions, we measured the cytosolic pH in cysticerci and obtained a value of 8.2 ± 0.1 ($n=10$).

In basal conditions, a ratio [GSH]/[GSSG] of 131 in cysticerci was obtained (Fig. 5a), corresponding to -338 ± 7 mV of redox potential at pH 8.2 and 37°C (Fig. 5b) and -292 ± 9 mV under the standard conditions (pH 7 at 25°C). Although this ratio varied between the

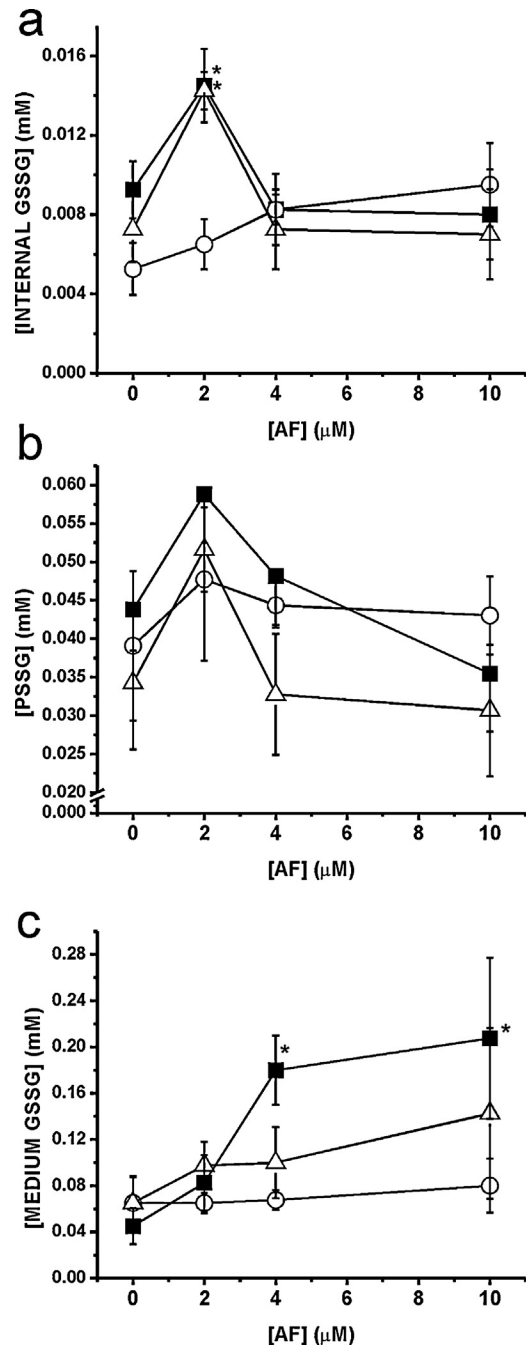


Fig. 4. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on the distribution of glutathione species in *T. crassiceps* cysticerci. Incubation conditions and treatments were as described in the legend to Fig. 1. At the end of the incubation period cysticerci were recovered and treated for determination of either glutathione disulfide (a) or glutathione-protein mixed disulfides (b). Additionally, glutathione disulfide was determined in the culture media in which cysticerci were incubated (c). Symbols represent incubation with AF in the presence of either 10 mM NAC (open circle), 100 μM BSO (open triangle), or AF-vehicle (100% DMSO) (filled square). Each point represent mean \pm standard deviation ($n=4$). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

NAC- and the BSO-exposed cysticerci, the difference with the control treatment was not significant. However, in the presence of AF, the [GSH]/[GSSG] resulting in a less negative redox potential, indicating a more oxidative environment in cysticerci. The 100% of mortality produced by BSO plus $4.0 \mu\text{M}$ AF treatment (Fig. 1a), correlates the full inhibition of TGR activity (Fig. 1b) with a sig-

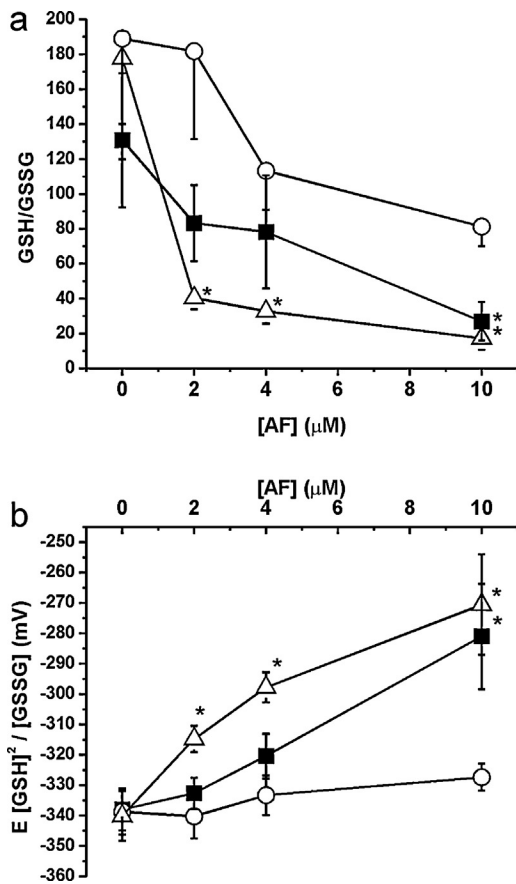


Fig. 5. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on the [GSH]/[GSSG] ratio (a) and glutathione redox potential (b) in *T. crassiceps* cysticerci. Glutathione redox potential at pH 8.2 was calculated from both GSH and GSSG concentrations as described in Materials and Methods. Symbols represent incubation with AF in the presence of either 10 mM NAC (open circle), 100 μM BSO (open triangle), or AF-vehicle (100% DMSO) (filled square). Each point represent mean ± standard deviation (n=4). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

nificant decrease in internal concentration of glutathione (Fig. 2) and a marked increase in the presence of ROS (Fig. 3). Under these conditions, the [GSH]/[GSSG] ratio drop to 33 resulting in an E_h value of -297 ± 5 mV (Fig. 5). By contrast, in the NAC plus 10 μM AF treatment we found [GSH]/[GSSG] ratio of 81, and an E_h value -327 ± 5 mV (Fig. 5) with internal concentration of glutathione (Fig. 2) and ROS production (Fig. 3) in the same range as controls. These data correlates with 100% cysticerci viability (Fig. 1a) and 50% of residual TGR activity (Fig. 1b).

From a comparison of the results on cysticerci viability (Fig. 1a) and the [GSH]/[GSSG] ratio (Fig. 5a) in the presence of both NAC and AF, it is concluded that a minimal ratio value of 81 is required for cysticerci viability as shown in Figs. 1 and 5a. If the [GSH]/[GSSG] ratio is brought below such value due to oxidative conditions (e.g., caused by a pro-oxidant compound as AF [48,49]), various protective mechanisms begin to operate, such as: (i) protection of overoxidation of protein thiols through glutathionylation (Fig. 4b) and (ii) efflux of GSSG to the external medium (Fig. 4a and c). As a result, the internal glutathione pool is significantly depleted (Fig. 2).

3.5. AF diminishes internal glutathione equivalents and caused redistribution in internal glutathione species

Our results indicate that glutathione is quite abundant (Fig. 2) and is distributed in different ways in the absence of a functional TGR due to AF inhibition (Fig. 4). Because the exact number of cys-

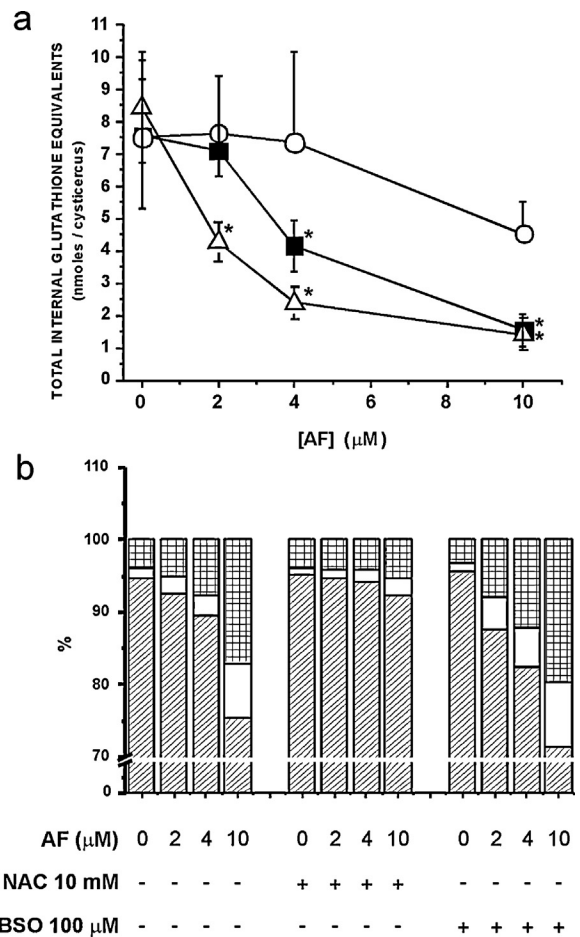


Fig. 6. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on the distribution of internal glutathione species in *T. crassiceps* cysticerci. (a) Total internal glutathione content expressed per cysticercus; (b) Relative abundance (in percent) of the different species of glutathione: GSH (striped); GSSG (white); glutathione-protein mixed disulfides (squared). Symbols represent incubation with AF in the presence of either 10 mM NAC (open circle), 100 μM BSO (open triangle), or AF-vehicle (100% DMSO) (filled square). Each point represent mean ± standard deviation (n=4). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

ticerci in each sample is known, the total amount of glutathione (in nanomoles), as well as the internal distribution in each of its forms (GSH, GSSG and PSSG) can be calculated for each treatment in a single cysticercus (Fig. 6a and b). Under physiological conditions, about 95% of the glutathione pool is in the reduced form with just 5% corresponding to oxidized forms (if we consider the total internal GSH, GSSG and PSSG as 100%) (Fig. 6b). An essentially identical distribution was observed when either NAC or BSO were added in the absence of AF. However, in the AF-treatment cysticerci, a dose-dependent increment in the disulfide form at the expense of GSH was observed. Incubation of cysticerci with AF plus BSO resulted in a slight potentiation of the AF effect, while preincubation with NAC prevent any significant change in the distribution of the glutathione pool, regardless of AF concentration.

3.6. AF increases expulsion rate of oxidized glutathione and increases in glutathione synthesis

If we take into account both the total internal glutathione as well as the expelled glutathione-disulfide (GSSG) to the maintenance medium, the total glutathione pool in the cysticercus can be estimated (Fig. 7). We observed that from 2 μM AF promoted

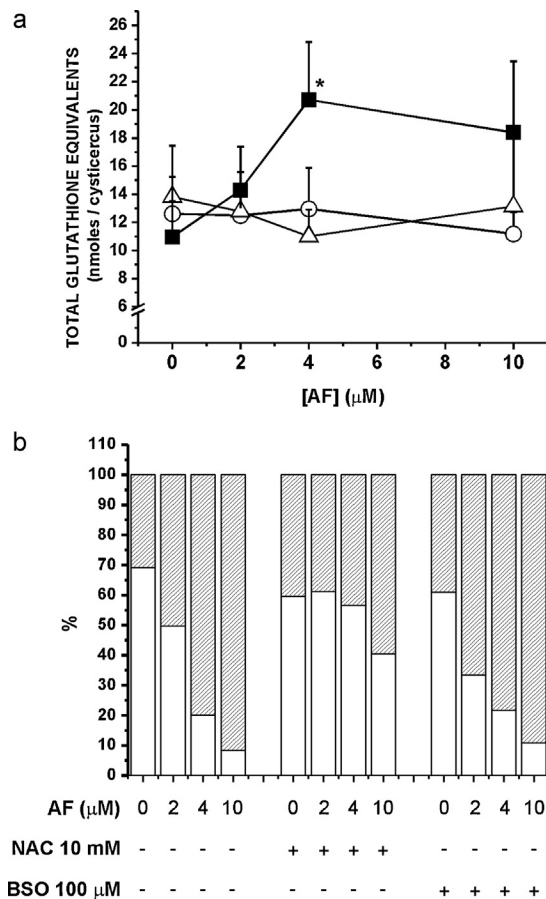


Fig. 7. Effect of AF, AF-NAC or AF-BSO mixtures on the distribution of total glutathione between *T. crassiceps* cysticerci and the culture media. (a) Total glutathione (represented as equivalents of GSH) determined in both cysticerci and culture media are expressed per cysticercus. (b) Distribution of GSH (in percent) between cysticerci (internal) and culture medium (expelled). White bars represents internal GSH, while striped bars stands for expelled GSH. Each point represent mean \pm standard deviation ($n = 4$). A significant statistical difference between treatments (*) was assumed when $p < 0.05$ related to the corresponding control.

glutathione synthesis (Fig. 7a) while that neither NAC- or BSO-treatments do it. This may be because the NAC maintains the redox state in the cysticercus and is not required to synthesize glutathione. Furthermore, in treatments with BSO, this is not possible because the BSO inhibits its synthesis. When analyzing the internal and external distribution of glutathione in the cysticercus (Fig. 7b), it was observed that both AF and BSO-AF treatment promote the efflux of glutathione, while NAC preserves the basal distribution of glutathione, even in the presence of AF. Therefore, it can be concluded that NAC reduces the AF-induced oxidative stress generated due to its capacity for directly reduce to GSSG, maintaining oxidized forms of glutathione (Fig. 4) and redox state (Fig. 5) in basal levels, and consequently there the internal (Fig. 6) or global distribution is no change in (Fig. 7) of glutathione in cysticerci.

3.7. Glutathione metabolism in plathyhelminths

A major goal of this work is to provide a wide view of the glutathione metabolism in *T. crassiceps* cysticerci and other parasitic plathyhelminths, includes all the potential mechanisms of the parasites to contend with alterations in redox homeostasis. In this sense, a search in the flatworm genome databases recently released [50], which includes the related *T. solium* and *E. granulosus*, revealed the potential presence of several key enzymes involved in glutathione

metabolism. These are: (i) a homologous of γ -glutamyl transpeptidase, the enzyme responsible for the exogenous degradation of glutathione (Table S1), suggesting that these parasites have the ability to catch and metabolize exogenous glutathione [51]; (ii) the enzyme phytochelatin synthase (Table S2), which is involved in the generation of the glutathione-derived biopolymers named phytochelatins [52]. Although the importance of this enzyme is unknown [53], it has been proposed that could be involved in metal detoxification that can generate ROS [54], as well as in elimination of compounds generated with glutathione S-transferase [55]. In this sense, in preliminary HPLC experiments, we have found the presence of three low molecular weight thiol-containing peptides (Fig. S4), similar to that reported in *S. mansoni* [55] which were assigned to phytochelatins. Interestingly, the relative abundance of such compounds in *T. crassiceps* cysticerci was not modified by AF, suggesting that these thiols not involved in redox homeostasis; (iii) protein homologous to efflux transporters of glutathione [56] (Table S3).

Based on all the above information, as well as on the experimental results in the present work, in Fig. 8 the potential reactions in which glutathione could be involved in cysticerci under both normal or oxidative conditions are outlined. In the first place, it is worth to note that cysticerci are potentially able to synthesize glutathione, as was demonstrated by the detection of γ -glutamyl cysteine ligase activity.

On the other hand, to maintain the normal [GSH]/[GSSG] ratio and the redox homeostasis, cysticerci under oxidative stress are dependent on several mechanisms. The first defensive line of these parasites is represented by glutathione peroxidase (GPx) [57–59] and peroxiredoxins (Prx) [60–64], which acts as ROS scavengers, as well as glutathione S-transferase (GST) [65–67], involved in the elimination of xenobiotic compounds. Both of these protective systems are dependent of the glutathione-reductase activity of the multifunctional TGR. A second potential mechanism to contend with oxidative conditions is the translocation of disulfide form of glutathione (GSSG) to cytoplasm compartments as in vacuoles [68] or its excretion of the outside of the cell [14,15]. In the present work, we have demonstrated that significant amounts of GSSG are extruded from the cysticerci in the presence of AF (Figs. Fig. 44c and Fig. 66).

As regards the protection of macromolecules proteins thiols from irreversible oxidation, cells have evolved an interesting mechanism through the formation of glutathione-protein mixed disulfides [69]. In *T. crassiceps* cysticerci a basal level of protein glutathionylation in the absence of any oxidative stress was found (Fig. 4b). When the latter is increased (e.g., in the presence of AF), the amount of glutathione complexed to protein is raised. Glutaredoxin has been proposed as the enzyme involved in glutathionylation/deglutathionylation reactions [70]. In this sense, in *E. granulosus* the glutaredoxin activity of TGR has been characterized and its participation in such reactions demonstrated [71]. It is interesting to note that in the genomes databases of parasitic flatworms the presence of several glutaredoxin genes have been detected [50].

When glutathione metabolism in flatworms is compared with the corresponding metabolism in mammals, several differences are found. Thus, while in mammals a specific NADPH-dependent enzyme is responsible for GSSG reduction [10,20], in flatworms a single multifunctional disulfide reductase (i.e. TGR) involved in the reduction of both GSSG and thioredoxin, is present [21]. Further, in flatworms this same enzyme has the ability for catalyze deglutathionylation of glutathione-protein complexes due to the incorporation of a glutaredoxin-like domain at its N-terminal end [71]. On the other hand, the presence in flatworms of phytochelatin-like compounds is sharp contrast with the situation in mammals, where no of such compound has been reported.

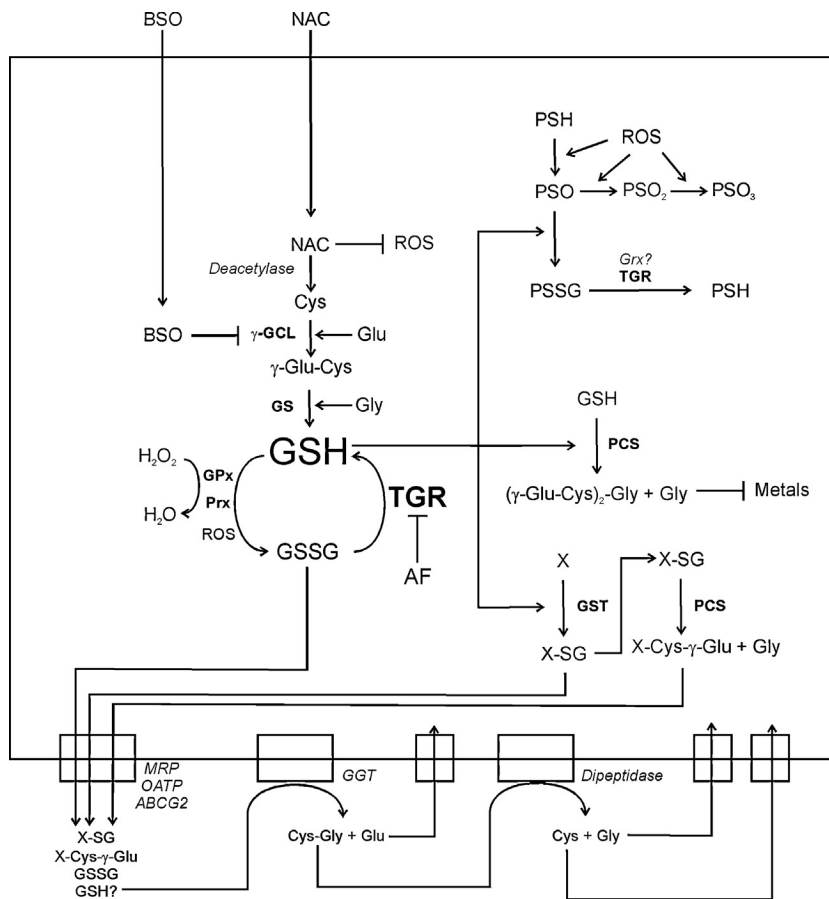


Fig. 8. Outline of glutathione metabolism proposed for parasitic flatworms. The potential reactions in which glutathione could be involved in parasitic flatworms are represented. The enzymes or molecules for which experimental evidence supports its expression are shown in bold, while the enzymes with genomic evidence are shown in italics. See text for details. Abbreviations: ABCG2, ABCG subfamily cassette (ABC) transporters type 2; AF, auranofin; BSO, buthionine sulfoximine; γ GCL, gamma-glutamylcysteine ligase; γ GT, gamma-glutamyl transpeptidase; GPx, glutathione peroxidase; Grx, glutaredoxin; GS, glutathione synthase; GSH, reduced-form glutathione, GSSG, disulfide glutathione; GST, glutathione S-transferase; GSX, xenobiotic-complexed glutathione; OATP, solute carrier organic anion transporter; MRP, multidrug-resistance associated proteins; NAC, N-acetyl cysteine; PSSG, protein-complexed glutathione; PC, phytochelatin; PCS, phytochelatin synthase; PSH, proteic thiol Prx, Peroxiredoxin; ROS, reactive oxygen species; TGR, thioredoxin-glutathione reductase; X, xenobiotic.

Finally, the presence of superoxide dismutase (SOD) but not catalase (CAT) [50] and generating large amounts of H_2O_2 by the mitochondria of these parasites [37] attaches great importance to glutathione-dependent system in the detoxification of oxidative stress.

Overall, glutathione-dependent redox homeostasis centralized in TGR emerges as a promising pharmacological target.

4. Conclusion

Parasitic flatworms (such *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia solium*) can cause diseases, classified by WHO as neglected diseases [72]. These are highly prevalent worldwide and present serious medical problems in humans and animals [73] by their ability to persist asymptotically in a vertebrate host for decades [74,75], causing a spectrum of debilitating pathologies and even death [76]. Due to resistance or tolerance developed by parasitic flatworms at first choice drugs, numerous investigations have been conducted to develop new-drugs against TGR [77–82].

In summary, we revalidated the glutathione metabolism and TGR as a good pharmacological target, because its inhibition leads to a global redistribution of glutathione species in *T. crassiceps* cysticerci. Therefore, we demonstrated that the glutathione metabolism is critical for the survival and maintenance redox homeostasis in parasitic flatworms.

Acknowledgements

The authors thank M. Sc. Zabdi González Chávez, Biól. Gabriela Rodríguez Rodríguez and Biól. Gisela Martínez García for their technical assistance. This work was supported by the research grants IN207308-2 and IN219414-25 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work is part of a doctoral thesis submitted to the program Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB), UNAM. MGJJ was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through a doctoral scholarship. The study was approved by the Ethics and Research Committees of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (FMED/CI 098-2013).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.05.001>

References

- [1] Krauth-Siegel RL, Leroux AE. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal* 2012;17(4):583–607.
- [2] Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711–60.

- [3] Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134(3):489–92.
- [4] López-Mirabal HR, Winther JR. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(4):629–40.
- [5] Halvey PJ, Watson WH, Hansen JM, Go MY, Samali A, Jones DP. Compartmental oxidation of thiol-disulphide redox couples during epidermal growth factor signalling. *Biochem J* 2005;386(Pt 2):215–9.
- [6] Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ, Jones DP. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med* 1999;27(11–12):1208–18.
- [7] Nkabyo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH, Jones DP. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283(6):G1352–9.
- [8] Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 2009;16(10):1303–14.
- [9] Mieyál JJ, Chock PB. Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on s-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 2012;16(6):471–5.
- [10] Rendón JL, Juárez O. Glutathione reductase: structural, catalytic and functional aspects. In: García-Hernández E, Fernández-Velasco A, editors. *Advances in Protein Physical Chemistry*, 318–349. Kerala, India: Transworld Research Network; 2008. p. 2008.
- [11] Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J Sports Sci Med* 2002;1(1):1–14.
- [12] Hansen JM, Watson WH, Jones DP. Compartmental of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1. *Toxicol Sci* 2004;82(1):308–17.
- [13] Mieyál JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, Shelton MD. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(11):1941–8.
- [14] Sies H, Akerboom TP. Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods Enzymol* 1984;105:445–51.
- [15] Franco R, Cidlowski JA. Glutathione efflux and cell death. *Antioxid Redox Signal* 2012;17(12):1694–713.
- [16] Griffith OW, Meister A. Glutathione interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(11):5606–10.
- [17] Reed MC, Thomas RL, Pavisic J, James SJ, Ulrich CM, Nijhout HF. A mathematical model of glutathione metabolism. *Theor Biol Med Model* 2008;5(8).
- [18] Hansen RE, Roth D, Winther JR. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(2):422–7.
- [19] Li B, Umaphathy A, Tran LU, Donaldson PJ, Lim JC. Molecular identification and cellular localisation of GSH synthesis uptake, efflux and degradation pathways in the rat ciliary body. *Histochem Cell Biol* 2013;139(4):559–71.
- [20] Gromer S, Arscott LD, Williams Jr CH, Schirmer RH, Becker K. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem* 1998;273(32):20096–101.
- [21] Williams DL, Bonilla M, Gladyshev VN, Salinas G. Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites. *Antioxid Redox Signal* 2013;19(7):735–45.
- [22] Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(4):641–50.
- [23] Garrido EO, Grant CM. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol* 2002;43(4):993–1003.
- [24] Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S, Gladyshev VN. Seleprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(7):3673–8.
- [25] McCallum MJ, Barrett J. The purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27(4):393–401.
- [26] Alger HM, Williams DL. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Mol Biochem Parasitol* 2002;121(1):129–39.
- [27] Guevara-Flores A, Pardo JP, Rendón JL. Hysteresis in thioredoxin-glutathione reductase (TGR) from the adult stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasitol Int* 2011;60(2):156–60.
- [28] Han Y, Zhang M, Hong Y, Zhu Z, Li D, Li X, Fu Z, Lin J. Characterization of thioredoxin glutathione reductase in *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 2012;61(3):475–80.
- [29] Agorio A, Chalar C, Cardozo S, Salinas G. Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin Glutathione reductase. *J Biol Chem* 2003;278(15):12920–8.
- [30] Rendón JL, del Arenal IP, Guevara-Flores A, Uribe A, Plancarte A, Mendoza-Hernández G. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol Biochem Parasitol* 2004;133(1):61–9.
- [31] Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, Izmendi D, Gladyshev VN, Salinas G. Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem* 2008;283(26):17898–907.
- [32] Guevara-Flores A, del Arenal IP, Mendoza-Hernández G, Pardo JP, Flores-Herrera O, Rendón JL. Mitochondrial thioredoxin-glutathione reductase from larval *Taenia crassiceps* (Cysticerci). *J Parasitol Res* 2010;pii:719856.
- [33] Prast-Nielsen S, Huang HH, Williams DL. Thioredoxin glutathione reductase: its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810(12):1262–71.
- [34] Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Alvarez G, Rendón-Gómez JL, del Arenal IP. In vitro killing action of auranofin on *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). *Parasitol Res* 2010;107(1):227–31.
- [35] Finkelstein AE, Walz DT, Batista V, Mizraji M, Roisman F, Misher A. Auranofin new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1976;35(3):251–7.
- [36] Saccocia F, Angelucci F, Boumis G, Brunori M, Miele AE, Williams DL, Belleli A. On the mechanism and rate of gold incorporation into thiol-dependent flavoreductases. *J Inorg Biochem* 2012;108:105–11.
- [37] del Arenal IP, Rubio ME, Ramírez J, Rendón JL, Escamilla JE. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. *Parasitol Int* 2005;54(3):185–93.
- [38] Aviles C, Loza-Tavera H, Terry N, Moreno-Sánchez R. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol* 2003;180:1–10.
- [39] Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 1980;106(1):207–12.
- [40] Priora R, Coppo L, Salzano S, Di Simplicio P, Ghezzi P. rement of mixed disulfides including glutathionylated proteins. *Methods Enzymol* 2010;473:149–59.
- [41] Akerboom TP, Sies H. of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981;77:373–82.
- [42] Shen D, Dalton TP, Nerbert DW, Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem* 2005;280(27):25305–12.
- [43] Ambrosio J, Landa A, Merchant T, Lalette JP. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch Med Res* 1994;25:325–30.
- [44] Griffith O, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:4668–72.
- [45] Jones CM, Lawrence A, Wardman P, Burkitt MJ. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1337–9.
- [46] Lewerenz J, Maher P. Control of redox state and redox signaling by neural antioxidant systems. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(8):1449–65.
- [47] Circu ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 2011;45(11–12):1245–66.
- [48] Marzano C, Gandin V, Folda A, Scutari G, Bindoli A, Rigobello MP. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2007;42(6):872–81.
- [49] Anestal K, Prast-Nielsen S, Cenas N, Arnér ES. Cell death by SecTRAPs: thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells. *PLoS One* 2008;3(4):e1846.
- [50] Tsai IJ, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013;496(7443):57–63.
- [51] Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res* 2014;122:103–41.
- [52] Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 2006;163(3):319–32.
- [53] Ray D, Williams DL. Characterization of the phytochelatin synthase of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(5):e1168.
- [54] Liebeke M, Garcia-Perez I, Anderson CJ, Lawlor AJ, Benneth MH, Morris CA, Kille P, Svendsen C, Spurgeon DJ, Bundy JG. Earthworms produce phytochelatin in response to arsenic. *PLoS One* 2013;8(11):e81271.
- [55] Rigouin C, Nylin E, Cogswell AA, Schaumlöffel D, Dobritzsch D, Williams DL. Towards an understanding of the function of the phytochelatin synthase of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(1):e2037.
- [56] Bachhawat AK, Thakur A, Kaur J, Zulkifli M. Glutathione transporters. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3154–64.
- [57] Roche C, Liu JL, LePresle T, Capron A, Pierce RJ. Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;75(2):187–95.
- [58] Cai GB, Bae YA, Kim SH, Sohn WM, Jiang YS, Kim TM, Kong Y. Vitellocyte-specific expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in *Clonorchis sinensis*. *Int J Parasitol* 2008;38(14):1613–23.
- [59] Dimastrogiovanni D, Anselmi M, Miele AE, Boumis G, Petersson L, Angelucci F, Nola AD, Brunori M, Belleli A. Combining crystallography and molecular dynamics: the case of *Schistosoma mansoni* phospholipid glutathione peroxidase. *Proteins* 2010;78(2):259–70.
- [60] Sayed AA, Williams DL. Biochemical characterization of 2-Cys peroxidoredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 2004;279(25):26159–66.
- [61] Margutti P, Ortona E, Delunardo F, Tagliani A, Profumo E, Riganó R, Buttari B, Teggi A, Siracusano A. Thioredoxin peroxidase from *Echinococcus granulosus*: a candidate to extend the antigenic panel for the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(3):279–85.

- [62] Vaca-Paniagua F, Parra-Unda R, Landa A. Characterization of one typical 2-Cys peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 2009;105(3):781–7.
- [63] Hong Y, Han Y, Fu Z, Han H, Qiu C, Zhang M, Yang J, Shi Y, Li X, Lin J. Characterization and expression of the *Schistosoma japonicum* thioredoxin peroxidase-2 gene. *J Parasitol* 2013;99(1):68–76.
- [64] Sangpairoj K, Changklungmoa N, Vanichviriyakit R, Sobhon P, Chaithirayanon K. Analysis of the expression and antioxidant activity of 2-Cys peroxiredoxin protein in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 2014;140:24–32.
- [65] Harispe L, García G, Arbildi P, Pascovich L, Chalar C, Zaha A, Fernandez C, Fernandez V. Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop* 2010;114(1):31–6.
- [66] Nguyen HA, Bae YA, Lee EG, Kim SH, Diaz-Camacho SP, Nawa Y, Kang I, Kong Y. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode. *Int J Parasitol* 2010;40(9):1097–106.
- [67] LaCourse EJ, Perally S, Morphey RM, Moxon JV, Prescott M, Dowling DJ, O'Neill SM, Kipar A, Hetzel U, Hoey E, Zafra R, Buffoni L, Pérez Arévalo J, Brophy PM. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(5):e1666.
- [68] Morgan B, Ezerina D, Amoako TN, Riemer J, Seedorf M, Dick TP. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol* 2013;9(2):119–25.
- [69] Gallogly MM, Mieyal JJ. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7(4):381–91.
- [70] Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(3–4):348–66.
- [71] Bonilla M, Denicola A, Marino SM, Gladyshev VN, Salinas G. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminthes parasites: alternative pathways for glutathione reduction and deglutathionylation. *J Biol Chem* 2011;286(7):4959–67.
- [72] World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/) 2012.
- [73] Garcia HH, Moro PL, Schantz PM. Zoonotic helminth infections of human: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20(5):489–94.
- [74] Flisser A, Correa D, Evans CAW. *Taenia solium* Cysticercosis: new and revisited immunological aspects. In: Singh G, Prabhakar S, editors. *Taenia solium cysticercosis: From Basic to Clinical Science*. New York, US: CABI Publishing Prabhakar; 2002. p. 15–24.
- [75] Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):107–35.
- [76] Nash TE, Bartelt LA, Korpe PS, Lopes B, Houpt ER. Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation. *Am J Trop Med Hyg* 2014;90(2):318–21.
- [77] Rai G, Sayed AA, Lea WA, Luecke HF, Chakrapani H, Prast-Nielsen S, Jadhav A, Leister W, Shen M, Inglesse J, Austin CP, Keefer L, Arnér ES, Simeonov A, Maloney DJ, Williams DL, Thomas CJ. Structure mechanism insights and the role of nitric oxide donation guide the development of oxidiazole-2-oxides as therapeutic agents against schistosomiasis. *J Med Chem* 2009;52(20):6474–83.
- [78] Ross F, Hernández P, Porcal W, López GV, Cerecetto H, González M, Basika T, Carmona C, Fló M, Maggioli G, Bonilla M, Gladyshev VN, Boiani M, Salinas G. Identification of thioredoxin glutathione reductase inhibitors that kill cestode and trematode parasites. *PLoS One* 2012;7(4):e35033.
- [79] Eweas AF, Allam G, Abuelsaad AS, ALGhamdi AH, Maghrabi IA. Design, synthesis, anti-schistosomal activity and molecular docking of novel 8-hydroxyquinoline-5-sufonyl 1,4-diazepine derivatives. *Bioorg Chem* 2013;46:17–25.
- [80] Cao Y, Zhao B, Han Y, Zhang J, Li X, Qiu C, Wu X, Hong Y, Ai D, Lin J, Fu Z. Gene gun bombardment with DNA-coated golden particles enhanced the protective effect of a DNA vaccine based on thioredoxin glutathione reductase of *Schistosoma japonicum*. *Biomed Res Int* 2013;2013:952416.
- [81] Abdin AA, Ashour DS, Shoheib ZS. Artesunate effect on schistosome thioredoxin glutathione reductase and cytochrome c peroxidase as new molecular targets in *Schistosoma mansoni*. *Biomed Environ Sci* 2013;26(12):953–61.
- [82] Saiz C, Castillo V, Fontán P, Bonilla M, Salinas G, Rodríguez -Haralambides A, Mahler SG. Discovering *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase inhibitors through site-specific dynamic combinatorial chemistry. *Mol Divers* 2014;18(1):1–12.