



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CARACTERIZACIÓN DE LAS TIORREDOXINAS RECOMBINANTES
CITOSÓLICA Y MITOCONDRIAL DE *Taenia solium*.**

Tesis

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

M.V.Z GERARDO MALDONADO CUÑA

TUTOR: Dr. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO – FM/UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES – FMVZ/UNAM

Dr. JOSÉ GERARDO PERERA MARÍN FMVZ/UNAM

Ciudad de México

Enero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA.

A mi familiares amigos y compañeros de carrera y laboratorio por estar siempre en este importante paso.

.....

AGRADECIMIENTOS.

VIII

Al Dr. Agustín Plancarte Crespo por haber aceptado ser tutor del servicio social y de mi proyecto de tesis, así como de su dedicación y asesoría que fue fundamental.

A la Dra. Gabriela Nava Balderas por ser parte de mi preparación y parte fundamental para la elaboración de mi trabajo.

Al Dra Patricia del Arenal Mena por sus comentarios y críticas acerca de mi proyecto.

Al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales por sus clases, comentarios y sugerencias de mi trabajo.

Al Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte por comentarios y críticas realizadas al presente trabajo.

Al Dr. José Gerardo Perera Marín por sus comentarios y críticas realizadas a mi trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina UNAM, Depto. Microbiología y Parasitología, Laboratorio de inmunobioquímica de *Taenia solium*.

Este trabajo fue realizado gracias al donativo proporcionado por La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) bajo el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (IN202813).

IX

A mi padre y madre por enseñarme a nunca dejar de seguir los sueños por formarme como un hombre de bien. Gracias a ustedes tengo una carrera terminada.

A mis hermanos por su apoyo incondicional.

A la MVZ Mónica Juárez por darme la oportunidad de empezar a trabajar en el ámbito veterinario.

A la Maestra Hiliana Padilla por sus consejos y apoyo mostrado durante gran parte de mi vida.

A mis amigos Elías, Miguel, José María, Giuseppe, Daniel, Fernanda, Cinthia y todas esas personas que compartieron un momento de su tiempo para platicar e intercambiar ideas.

Al CONACYT por el apoyo otorgado en estos dos años de maestría

Agradecimientos financieros.

PAPIIT IN202816. *Expresión y caracterización de Tiorredoxina y glutarredoxina de *T. solium**

CONACYT. Por la beca otorgada en mis estudios de maestría

CONTENIDO

	Pag
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Biología de <i>Taenia solium</i>	3
1.2 Clasificación taxonómica de <i>Taenia solium</i>	3
1.3 Morfología y ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	4
1.4 Problemas de salud	6
1.5 Situación mundial de la teniasis/cisticercosis	7
1.6 Situación actual en México	8
2 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y peroxidación lipídica.	10
2.2 Sistemas detoxificantes de ERO enzimáticas y no enzimáticas	12
2.3 Sistema dependiente de glutatión	12
2.4 Sistema dependiente de Tiorredoxina	14
3. Sistemas detoxificantes enzimáticos presentes en cestodos y la importancia de Tiorredoxin Glutatión reductasa (TGR)	18
II JUSTIFICACIÓN	21
III. OBJETIVO	21
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	22
1.1 Parásitos	22
1.2 Extracción de ARN totales proveniente de cisticercos de <i>T. solium</i>	22

1.3. Diseño de oligos para la amplificación de los genes de TsTrx1 y TsTrx2	23
1.4 Síntesis de cDNA a partir de ARN totales	24
1.5 Purificación de los genes TsTrx1 y TsTrx2 y su ligación en el plásmido pJET 2.1	26
1.6 Construcción de los plásmidos pJET 2.1/TsTrx1 y pJET/TsTrx2 en bacterias competentes	26
1.7 Restricción de los insertos TsTrx1 y TsTrx2	28
1.8 Construcción de los plásmidos pET23a/TsTrx1 y pET23a/TsTrx2	29
1.9 Inducción de las proteínas r-TsTrx1 y r-TsTrx2 por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).	30
1.10 Cromatografía, purificación y concentración de la proteína r-TsTrx1 (Sefarosa-IMAC)	30
1.11 Inducción de la proteína r-TsTrx2 en bacterias K-12 Tuner y su extracción de r-TsTrxw de cuerpos de inclusión	31
2 Purificación de la enzima Tiorredoxina glutatión reductasa de <i>T. solium</i> (TsTGR)	32
3 Estimación proteica de las Trxs y la TGR de <i>T. solium</i>	33
4 Caracterización bioquímica de TsTrx1 y TsTrx2	34
4.1 Ensayo de precipitación de insulina	34
4.2 Estabilidad de las proteínas r-TsTrx1 y r-TsTrx2 a diferentes pH	34
5 Caracterización cinética de TsTGR, r-TsTrx1 y r-TsTrx2	35
5.1 Ensayo enzimático de Tiorredoxina reductasa (TrxR) utilizando como sustratos r-TsTrx1 y r-TsTrx2.	35
5.2 Actividad de reductasa de la TsTGR utilizando los sustratos r-TsTrx1 y r-TsTrx2 mas H ₂ O ₂	36
5.3 Valores para la determinación de las constantes cinéticas de reacción de TrxR	37
5.4 Valores para la determinación de las constantes cinéticas de reacción de TrxR utilizando H ₂ O ₂	37
	37

V. RESULTADOS	
1 Obtención de las proteínas r-TsTrx1 y r-TsTrx2	37
1.1 Análisis bioinformático de los genes TsTrx1 y TsTrx2.	37
1.2 Amplificación de los genes TsTrx1 y TsTrx2	38
1.3 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes TG1 y XL gold con los plásmidos pJET 2.1/ TsTrx1 y pJET 2.1/TsTrx2.	40
1.4 Transformación de bacterias competentes con el plásmido pET23a/TsTrx1 y pET23a/TsTrx2	43
1.5 Expresión de las proteínas r-TsTrx1 y r-TsTrx2	47
1.6 Purificación de lar- TsTrx1 (Sefarosa-IMAC)	48
1.7 Purificación de la r-TsTrx2 de cuerpos de inclusión con urea 4 M y cromatografía Sefarosa-IMAC	49
2 Caracterización bioquímica de r-TsTrx1 y r-TsTrx2	50
2.1 Resultados de los ensayos de precipitación de insulina	50
2.2 Estabilidad de r-TsTrx1 y r-TsTrx2 a diferentes pH	52
3 Purificación de Tiorredoxina Glutati6n Reductasa de <i>T. solium</i> (TsTGR).	53
3.1 Cromatografía de intercambio i6nico DEAE pH 6.5	53
3.2 Cromatografía de afinidad sefarosa 2'5' ADP.	54
3.3 Análisis electrofor6tico del proceso de purificaci6n de la TsTGR	55
3.4 Determinaci6n de las constantes catal6ticas de TsTGR y r-TsTrx1	56
3.5 Determinaci6n de las constantes catal6ticas de TsTGR y r-TsTrx2	58
VI DISCUSI6N	61
VIII REFERENCIAS	66

Lista de cuadros.

		Pag
1	Condiciones utilizadas para la amplificación de TsTrx1 y TsTrx2	25
2	Amortiguadores con diferentes rangos de pH	35
3	Constantes catalíticas de TsTGR utilizando r-TsTrx1 y r-TsTrx2 de <i>T. solium</i> .	61

Lista de figuras

		Pag
1	Micrografía del escólex <i>T. solium</i>	4
2	Diagrama de tres diferentes taenias que afectan al ser humano	5
3	Cisticercos de <i>Taenia solium</i> .	5
4	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	6
5	Tomografía positiva a neurocisticercosis	7
6	Mapa de la situación en 2016 de la cisticercosis	8
7	Sistema dependiente de GSH	14
8	Funciones de la Trx	17
9	Estructura terciaria de la tiorredoxina	17
10	Sistema dependiente de Trx	18
11	Estructura cuaternaria deTGR	18
12	ARN en gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio	39
13	Amplificación del gen TsTrx1	39
14	Amplificación del gen TsTrx2	40
15	Amplificación al gen TsTrx1 de bacterias TG1 y XL Gold	41

16	Amplificación del gen TsTrx2 de bacterias TG1 y XL Gold	41
17	Alineamiento de la secuencia obtenida del plásmido construido pJET 2.1/TsTrx1 vs TsM_000941400	42
18	Alineamiento de la secuencia obtenida del plásmido construido pJET 2.1/TsTrx2 vs TsM_000726200	42
19	Restricción del plásmido pJET 1.2 y liberación del gen TsTrx1	43
20	Restricción del plásmido pJET 1.2 y liberación del gen TsTrx2.	43
21	Restricción del plásmido pET23a con NdeI y XhoI	44
22	Selección de colonias positivas al gen TsTrx1	45
23	Selección de colonias positivas al gen TsTrx2	45
24	Alineamiento de los aminoácidos secuenciados de TsTrx1 vs los aminoácidos de TsM_000941400.	46
25	Alineamiento de los aminoácidos secuenciados de TsTrx2 vs los aminoácidos de TsM_0007262200	46
26	Curva de inducción de bacterias positivas al gen TsTrx2	47
27	Curva de inducción de bacterias positivas al gen TsTrx2	48
28	Purificación de r-TsTrx1	49
29	Purificación de r-TsTrx2	50
30	Precipitación de insulina utilizando r-TsTrx1	51
31	Precipitación de insulina utilizando r-TsTrx2	51
32	Estabilidad de la r-TsTrx1 en función del pH	52
33	Estabilidad de la r-TsTrx2 en función del pH	53
34	Cromatografía Sefarosa-DEAE –Sef.	54
35	Cromatografía de afinidad Sefarosa 2´5´ ADP	55
36	Análisis de la purificación de TsTGR	56
37	Caracterización cinética de TsTGR y r-TsTrx1 (TsTrx1).	57
38	Caracterización cinética de TsTGR y r-TsTrx1 (Insulina)	57
39	Caracterización cinética TsTGR y r-TsTrx1 (H_2O_2).	58
40	Caracterización cinética TsTGR y r-TsTrx2 (TsTrx2).	59
41	Caracterización cinética TsTGR y r-TsTrx2 (insulina).	59

Índice de abreviaturas.

1O_2	Oxígeno singulete
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
O_{2^-}	Anión superóxido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
C.E	Coefficiente de extinción
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoico ácido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ERO	Espécie Reactiva de Oxígeno.
g	Fuerza centrífuga relativa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
GSSH	Disulfuro de glutación
HO·	Hidroxilo
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
Kcat	Número de recambio
Kcat/Km	Eficiencia catalítica
Km	Constante de Michaelis Menten

LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Mr	Movilidad relativa
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NC	Neurocisticercosis
NOX	NADPH Oxidasa
OMS	Organización Mundial de la salud.
OSD	Órganos sexualmente desarrollados
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PL	Peroxidación Lipídica.
PMSF	Fenilmetilsulfonilo
RO ₂	Peroxilo
RO	Alcoxilo
r-TsTrx-1	Tiorredoxina recombinante 1 de Ts
r-TsTrx-2	Tiorredoxina recombinante 2 de Ts
SDS	Sulfatododecil de sódio
Se	Selenio
Sn	Sobrenadante
SNC	Sistema Nervioso Central
SODmn	Superoxido dismutasa manganeso
TAE	Tris Acético EDTA
TGR	Tiorredoxina Glutation Reductasa
Trx	Tiorredoxina
TrxPx	Tiorredoxina Peroxidasa
TrxR	Tiorredoxina reductasa

Ts

Taenia solium.

Vmax

Velocidad máxima de reacción

Resumen

Trabajos anteriores al nuestro han caracterizado dos isoformas de tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) citosólica y mitocondrial de *T. solium*, donde se utilizó una tiorredoxina (Trx) proveniente de *E. coli* para evaluar la actividad de tiorredoxina reductasa (TrxR). Para conocer más el sistema tiorredoxina en este parásito nos dimos a la tarea de expresar por biología molecular las Trx citosólicas y la Trx mitocondrial de *T. solium*, caracterizarlas bioquímicamente y obtener los parámetros cinéticos de TGR citosólica usando a la Trxs como sustratos para TrxR y tiorredoxina peroxidasa (TrxPx).

Las proteínas recombinantes r-*TsTrx1* y r-*TsTrx2* se expresaron en sistemas bacterianos. Ambas proteínas son capaces de precipitar insulina. Se evaluó la estabilidad de pH donde la r-*TsTrx1* tiene un rango de pH óptimo de 6.5 a 7.5 y r-*TsTrx2* posee un rango de pH óptimo de 4.5 a 8.0. La *TsTGR* se obtuvo por procesos bioquímicos y se caracterizó con los sustratos propios de *T. solium*. Para la actividad de TrxR, manteniendo fija la concentración de insulina y variando la concentración de r-*TsTrx1* se obtuvo una K_m de 0.027 mM, actividad específica de 20 U/mg, k_{cat} 23.2 s⁻¹ y una k_{cat}/K_m 1.1 X 10⁶ M⁻¹ s⁻¹. Cuando se varió la concentración de r-*TsTrx2* se obtuvieron valores de, K_m 0.050 mM actividad específica de 8.21 U/mg, k_{cat} de 9.32 s⁻¹ y una k_{cat}/K_m de 1.8 X10⁵ M⁻¹ s⁻¹.

Las tiorredoxinas recombinantes de *T. solium* demostraron ser más afines en la reacción de TrxR al utilizar sus sustratos naturales que utilizando sustratos de especies diferentes. La actividad de TrxR resulto baja utilizando H₂O₂.

Abstract

Previous works to ours have characterized two isoforms of thioredoxin glutathione reductase (TGR) cytosolic and mitochondrial *T. solium*, where a thioredoxin (Trx) from *E. coli* was used to evaluate the activity of thioredoxin reductase (TrxR). To know more about the thioredoxin system in this parasite, we decided to express the cytosolic Trx and the mitochondrial Trx of *T. solium* by molecular biology, characterize them biochemically and obtain the kinetic parameters of cytosolic TGR using the Trxs as substrates for TrxR and thioredoxin peroxidase (TrxPx).

The recombinant proteins r-TsTrx1 and r-TsTrx2 were expressed in bacterial systems. Both proteins are capable of precipitating insulin. The stability of pH was evaluated where the r-TsTrx1 has an optimum pH range of 6.5 to 7.5 and r-TsTrx2 has an optimum pH range of 4.5 to 8.0. The TsTGR was obtained by biochemical processes and was characterized with the substrates of *T. solium*. For the activity of TrxR, maintaining the concentration of insulin and varying the concentration of r-TsTrx1, a K_m of 0.027 mM was obtained, a specific activity of 20 U / mg, kcat 23.2 s⁻¹ and a kcat / K_m 1.1 X 10⁶ M⁻¹ s⁻¹. When the concentration of r-TsTrx2 was varied, values of K_m , 0.050 mM specific activity of 8.21 U / mg, kcat of 9.32 s⁻¹ and kcat / K_m of 1.8 X10⁵ M⁻¹ s⁻¹ were obtained.

The recombinant thioredoxins of *T. solium* proved to be more related in the TrxR reaction when using their natural substrates than using substrates from different species. The activity of TrxR was low using H₂O₂.

I. Introducción.

1.1 Biología de *Taenia solium*.

Taenia solium puede estar presente en la naturaleza en tres diferentes estadios. Estos estadios son el cestodo adulto presente en el intestino delgado del humano, la fase de larva o cisticerco el cual se localiza en los tejidos del cerdo y/o humano y la fase de huevo que se encuentra en el ambiente.

Taenia solium es un cestodo que parasita al hombre y al cerdo, las primeras descripciones de este parásito provienen del año 460 A.C por Hipócrates (Rodríguez RR, 1962). El primer caso de neurocisticercosis publicado ocurrió en el año 1558 por Rumler y Gessner (Nieto D, 1982), quien en 1683 documentó que el cisticerco era la etapa juvenil de *T. solium*. En México el parásito fue introducido por los españoles a través de los cerdos traídos a la antigua Mesoamérica (Rodríguez RR, 1962).

1.2 Clasificación taxonómica de *Taenia solium* (Linneo).

<u>Reino:</u>	<u>Animalia</u>
<u>Filo:</u>	<u>Platyhelminthes</u>
<u>Clase:</u>	<u>Cestoda</u>
<u>Orden:</u>	<u>Cyclophyllidea</u>
<u>Familia:</u>	<u>Taeniidae</u>
<u>Género:</u>	<u><i>Taenia</i></u>
<u>Especie:</u>	<u><i>T. solium</i></u>

1.3 Morfología y Ciclo de vida de *Taenia solium*.

La forma adulta, que mide de 1.5 a 5 metros, está constituida de un escólex o cabeza (Figura 1), cuello y estróbilo (Botero D et al 2012). Este último conformado por proglótidos, los cuales se clasifican en inmaduros, maduros y grávidos. Los inmaduros sin órganos sexuales desarrollados (OSD), los maduros con OSD y los grávidos repletos de huevos. El escólex y las ramas uterinas son diferentes entre los cestodos (Figura 2).

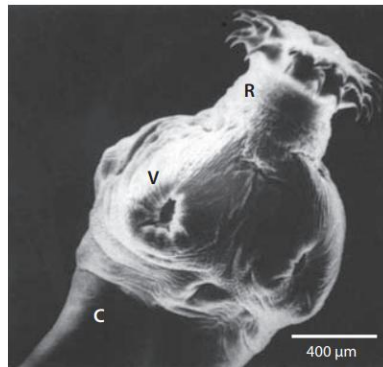


Figura 1. Micrografía del escólex *T. solium*. Se aprecia una micrografía del escólex de *Taenia solium*, donde se muestra su estructura la cual está compuesto por un róstelo (r) con una corona doble de ganchos, cuatro ventosas (v) y un cuello que da origen a los proglótidos tomado Aluja A. (1987)

Los huevos son esféricos y miden de 30 a 45 micrómetros. Tienen varias capas, la externa (vitelo o cápsula) compuesta por un sincicio, la embrifórica, formada por tabiques proteicos y la membrana oncosferal, todas ellas protegiendo al embrión hexacanto (Aluja A et al 1987).

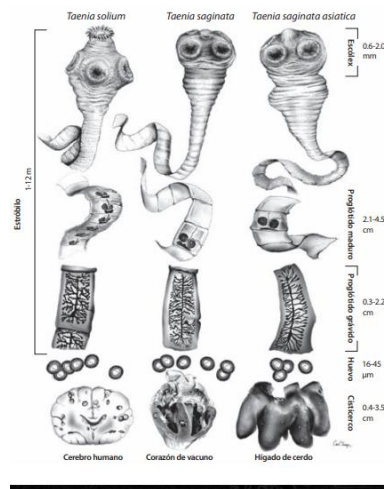


Figura 2. Diagrama de tres diferentes taenias que afectan al ser humano. Se puede observar las diferencias morfológicas de entre estos tres parásitos tomado de Aluja A. et al 1987.

La forma de metacestodo o cisticerco (5 a 10 mm de longitud), presenta un escólex unido al canal espiral rodeado de líquido vesicular, todos ellos limitados por una cubierta externa (Figura 3), (Aluja A et al 1987).

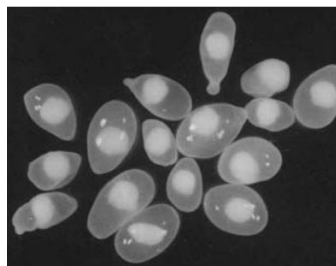


Figura 3. Cisticercos de *T. solium*. Se aprecian varios cisticercos los cuales están compuestos por una cubierta externa que contiene líquido vesicular y escólex invaginado tomado de (Aluja A, 1987).

El ser humano es el huésped definitivo al presentar en su intestino la forma adulta de este cestodo. Los proglótidos grávidos son expulsados junto con las heces al ambiente. Los cerdos al consumir estas excretas desarrollan los cisticercos en sus

tejidos. El ser humano ingiere la carne infectada, cruda o semi cruda, desarrollará la teniasis (Figura 4). Si el ser humano consume éstos huevos, desarrollará la cisticercosis (Botero D et al 2012).

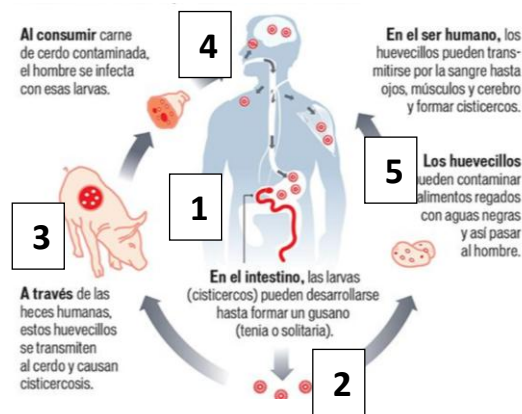


Figura 4. Ciclo de vida de *T. solium*. 1.- El parásito adulto se encuentra en el intestino delgado del ser humano, 2.- los huevos son liberados a través de las heces al ambiente, 3.- Estos huevos son consumidos por los cerdos y en ellos se desarrolla el cisticerco (Fase juvenil), 4.- cuando el ser humano consume la carne contaminada con cisticercos, desarrolla la tenia en el intestino delgado. 5.- si el ser humano consume alimentos contaminados por huevos, este desarrollará la cisticercosis.

1.4 Problemas en la salud.

Taenia solium es un parásito que causa la teniasis y la cisticercosis, particularmente, la neurocisticercosis (NC) (Figura 5), que es la presencia de cisticercos en el sistema nervioso central (SNC), es la principal afectación en el ser humano. Esto es debido a los procesos inflamatorios en este órgano que destruyen no solamente al parásito sino también a los tejidos del huésped. De esta forma, se ocasiona una amplia sintomatología neurológica que en ocasiones es causa de defunciones (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>). Contrastantemente, existen individuos inmunológicamente competentes que presentan cisticercos en su SNC sin tener síntomas clínicos, conocidos como los casos asintomáticos.



Figura 5. Tomografía positiva a neurocisticercosis. Fotografía de una tomografía donde se aprecia dos cisticercos en el cerebro del paciente tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/atfam81/neurocisticercosis.html>.

1.5 Situación mundial de la teniasis/cisticercosis.

La OMS menciona que esta parasitosis afecta principalmente a comunidades rurales de países en desarrollo como África, Asia y América Latina (Figura 6). En 2015 el grupo epidemiológico de la OMS señaló que *T. solium* es una de las principales enfermedades de transmisión alimentaria. También menciona que la principal causa de epilepsia en países en desarrollo es ocasionado por este parásito(http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=article&id=1232:mexico-avanza-hacia-un-plan-de-intervencion-integrada-para-la-prevencion-ycontrol-de-la-teniasis-y-neurocisticercosis&Itemid=499).

En 2010 la OMS añadió a *T. solium* en la lista de las principales enfermedades tropicales desatendidas, además estableció dos planes de acción: educación para la salud y diagnóstico preciso; con dos objetivos: elaborar una estrategia validada para combatir y erradicar la teniasis/cisticercosis por *T.solium* y lograrlo en algunos países con fecha límite a 2020.

Endemicity of *Taenia solium*, 2015

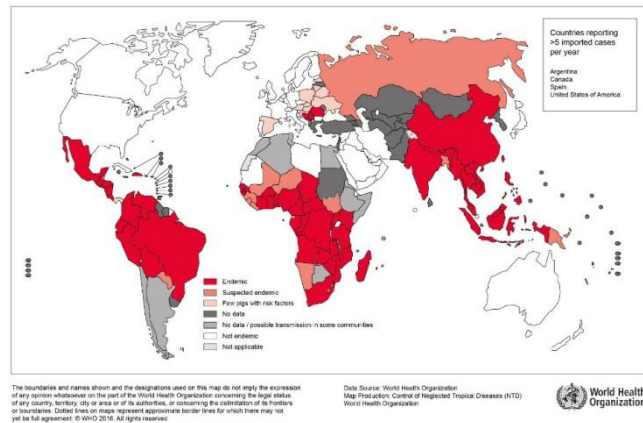


Figura 6. Mapa de la situación en 2016 de la cisticercosis mundial. En rojo los países donde la enfermedad es endémica, en naranja los países donde existe la sospecha que la enfermedad es endémica, en rosa los países con cerdos con bajo riesgo de infección y los colores del gris al blanco, son países libres de la enfermedad o no hay datos.

1.6 Situación actual en México.

En 2016 se realizó en la en la Ciudad de México por parte de –subdirección de Zoonosis del Control Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de la Secretaria de salud. El foro prevención y control de la teniasis/cisticercosis en México (http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/CENAPRECE_CisticercosisMERCK.pdf). Muestra una serie de datos acerca del comportamiento del binomio teniasis/cisticercosis de 2000 a 2015. En el año 2000 existieron 1195 casos de teniásicos y para el 2015 disminuyeron a 153. En los estados de Chiapas, Tabasco Veracruz, Morelia, Jalisco y Nuevo León existieron más del 51.6% de los casos registrados de teniasis en todo el país.

En México en el año 2000 en dicho trabajo menciona que, existieron 660 casos registrados de cisticercosis, particularmente NC y en el 2015 se registraron 239 casos. Los estados que acumularon el 60.2 % del total de los casos nacionales

fueron Chihuahua, Jalisco, Michoacan, Estado de México, Ciudad de México, Querétaro y Sinaloa.

Estos casos reportados son de pacientes con sintomatología que llegaron a hospitales especializados. Sin embargo, es difícil conocer el número verdadero de individuos que alojan cisticercos en sus tejidos, debido a los casos asintomáticos (Fleury et al 2015) de tal forma que probablemente, los casos con sintomatología para la NC sean la punta del iceberg y por debajo de ésta se encuentren los casos asintomáticos.

Una explicación a los casos asintomáticos es el desarrollo de mecanismos de evasión inmune relacionados con evitar la peroxidación lipídica y/o regular, por medio de óxido-reducción (Rodriguez et al 2018-16 Nilsson Let al 2000), diversas moléculas pro-inflamatorias que en consecuencia llevaría a la ausencia de los procesos inflamatorios (Halliwell B. 1999). En *T. solium* se encuentran presentes diferentes factores de transcripción como NF- κ B (NF kappa B) TsM_000899200 y AP-1 (protein activator 1) TsM_000248800 las cuales están involucradas en procesos de regulación de varios genes. Estos factores son activados mediante reacciones redox donde la Trx cumple la función de reducir estos factores de transcripción y se translocados al núcleo para cumplir su función. Se conocen tiorredoxinas que son secretadas hacia el espacio extracelular (Chiumento et al., 2009). Estas proteínas son capaces de modular el sistema inmune a su favor, como se describe en el trabajo de Castillo X., 2018. Donde describe como la Trx-1 de *T. solium* al estar en contacto con macrófagos de raton Balb/c provoca la producción de IL10 la cual tiene gran poder antiinflamatorio.

2 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y peroxidación lipídica.

Las EROs son especies químicas formadas por la reducción incompleta del oxígeno (Konigsberg M. et al 2008., Ross F. et al 2012), ejemplo de ellas tenemos a los radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), peroxilo (RO_2^{\cdot}) y alcoxilo (RO) (Young-Mi G et al 2017). Además especies no radicales derivadas del oxígeno pero altamente oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (1O_2) (Sies H. 1993) (Hansberg W. 2002), todas ellas tóxicas, que en concentraciones elevadas causan el estrés oxidativo.

La producción de estas EROs es llevada a cabo de manera natural en el metabolismo celular y la mitocondria es uno de los principales generadores de EROs, (Chen Q et al 2013).

Las EROs también se producen como un mecanismo de eliminación de agentes extraños o patógenos por el sistema inmune. (Hansberg W. 2002) Este es un papel benéfico para la supervivencia de diferentes organismos a las diferentes infecciones que pudieran adquirir en su vida (Konigsberg M. et al 2008).

Las células encargadas de producir EROs, en altas concentraciones, son los neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos a través de un complejo enzimático llamado NADPH oxidasa (NOX) y constituye una de las defensas oxidativas más poderosas del sistema inmune contra bacterias hongos y parásitos (Abbas A. et al 2011).

A este fenómeno donde las células fagocíticas generan EROs se nombra estallido respiratorio o explosión respiratoria, ya que en este proceso inmune las células consumen un mayor número de moléculas de oxígeno. Cuando las diferentes proteínas que conforman a NOX se ensamblan puede llevar a cabo su actividad catalítica, la cual se describe a continuación (Abbas A. et al 2011, Ayala A, et al 2014).

Las EROs pueden provocar daño oxidativo a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, este efecto dañino es el resultado del estrés oxidante (Jeong C et al. 2016) este fenómeno ocurre cuando existe una sobreproducción de EROs y un deficiente sistema detoxificante de EROs, el mecanismo de daño más estudiado de oxidación es la peroxidación lipídica (PL) (Hansberg W. 2002).

La PL produce varios compuestos tóxicos como aldehídos, malonildialdehído y el 4-hidroxinonenal que alteran la fluidez y permeabilidad las membranas celulares y modifica la actividad de las proteínas presentes en este sitio, además modifica la actividad de proteínas de membrana. Los ácidos grasos más susceptibles a la peroxidación son los ácidos grasos insaturados como lo son linoléico, linolénico y araquidónico, esto se debe a que sus dobles enlaces debilitan la unión del átomo de hidrógeno con el carbono adyacente. La lipoperoxidación puede ser provocada por dos sistemas, el enzimático y no enzimático. La vía enzimática es iniciada por enzimas como fosfolipasas y otras lipasas. La vía no enzimática es provocada por los EROs y se puede dividir en tres fases, iniciación, propagación y terminación (Ayala A, et al 2014).

La iniciación ocurre cuando el residuo de un ácido graso insaturado es atacado por un ERO, este radical es capaz de retirarle por completo un átomo de hidrógeno, al retirar este átomo el residuo que queda se convierte en radical $R\cdot$ o $L\cdot$, el carbono que perdió el hidrógeno sufre un rearrreglo molecular que da origen a un dieno conjugado el cual no reacciona con el oxígeno singulete pero si con el oxígeno molecular O_2 el cual forma un radical peroxilo $ROO\cdot$ o $LOO\cdot$, esta molécula tiene la capacidad de extraer un hidrógeno de un ácido graso adjunto y termina formando un lipoperóxido $ROOH\cdot$ o $LOOH\cdot$.

La propagación ocurre cuando al ácido graso que se le extrajo el hidrógeno, hará lo mismo que el ácido graso anterior formando una reacción en cadena, por este mecanismo se propaga la reacción por la membrana celular.

La fase de terminación ocurre cuando el radical lipídico reacciona con otro radical formando un dímero lo cual altera las funciones de fluidez y permeabilidad. Otro mecanismo de terminación es la ciclación, en este proceso las moléculas de oxígeno quedan englobadas dentro de la cadena polinsaturada, estas estructuras son poco estables y terminan rompiéndose en un tipo de β -escisión creando compuestos como aldehídos, malonildialdehído y el 4-hidroxinonenal los cuales tienen efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos (Figuroa-García M et al 2015) (Konigsberg M. et al 2008).

2.2 Sistemas detoxificantes de ERO enzimáticas y no enzimáticas.

Los diferentes organismos poseen mecanismos para contrarrestar la producción de EROs, estos se clasifican en no enzimáticos y enzimáticos. Los mecanismos no enzimáticos están compuestos por vitaminas como la C y E, ácido lipoico, la ubiquinona y un tripéptido llamado glutatión el cual es el principal compuesto reductor presente en las células y la concentración intracelular de la forma reducida es de entre 1-10 mM (Sies H 1999).

Los sistemas enzimáticos detoxificante se clasifican en dos grupos, a) el sistema dependiente de glutatión conformado por glutatión reductasa (GR), glutatión (GSH), glutarredoxina (Grx) y glutatión peroxidasa (GPx) y b) el sistema dependiente de tiorredoxina compuesto por tiorredoxina reductasa (TrxR), tiorredoxina (Trx), tiorredoxina peroxidasa (TrxP) (Konigsberg M. et al 2008).

2.3 Sistema dependiente de glutatión.

Está compuesto por los siguientes componentes que se muestran también en la figura 7:

Glutación (GSH): es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, contiene un enlace peptídico poco común y entre el glutamato y la cisteína, esto ayuda a que no sea degradado por peptidasas, como se mencionó anteriormente es el principal reductor presente dentro de la célula y además interactúa con diferentes enzimas (Sies H. 1999). El GSH está presente en la mayoría de los organismos aunque se ha visto que no todos son capaces de sintetizarlo por lo que ocupan otros ditiolos como las cisteínas libres entre otros (Aguilar-Diaz H et al 2016). El GSH, desde el punto de vista redox, se puede encontrar en su forma reducido (GSH) y en su forma oxidado como disulfuro de glutación (GSSG) (Zúñiga F, et al 2016) este último es reducido por la glutación reductasa (GR) o tiorredoxin glutación reductasa (TGR) (Salinas G. 2010).

Glutación reductasa (GR E.C 1.6.4.2): Es una enzima NADPH-oxidoreductasa, pertenece a la familia de las flavoproteínas disulfuro reductasas (Konigsberg M. et al 2008) (Martinez J. et al 2015). Esta enzima utiliza los equivalentes reductores provenientes del NADPH, los cuales transfiere al GSSG para transformarlo en dos moléculas de GSH (Hanschmann EM et al 2013).

La forma activa de esta enzima está compuesta por dos subunidades con un peso aproximado de 50 kD por subunidad, es una enzima presente en la mayoría de organismos excepto en cestodos parasitarios (Salinas G. 2010).

Glutación peroxidasa (GPx E.C 1.11.1.9): es una GSH: H_2O_2 oxidoreductasa, esta proteína contiene selenio (Se) siendo la primera selenoproteína encontrada en mamíferos y existen ocho isoformas (Konigsberg M. et al 2008).

Su Gpx activa es homotetrámera y su peso molecular varía de 70-100 kD por subunidad. Existen isoformas citosólicas, mitocondriales y nucleares, su principal función es reducir diferentes peróxidos a alcoholes utilizando dos moléculas de GSH (Martinez J. et al 2015).

Glutarredoxina (Grx): son proteínas con función oxidoreductasa ditiol disulfuro con peso aproximado de 12 kD, existen dos variantes, una ditiolica con un sitio activo compuesto por Cys, Pro, Tyr, Cys y monotiólicas Cys, Pro, Phe, Ser. Sus principales funciones son reducir directamente al GSSG o algunas proteínas a través del NADPH, además son capaces de reducir proteínas generando disulfuros simples con GSH en un proceso llamado glutationilación. Esta proteína es capaz de participar como regulador del estado redox en diversos organismos (Manta B. 2013).

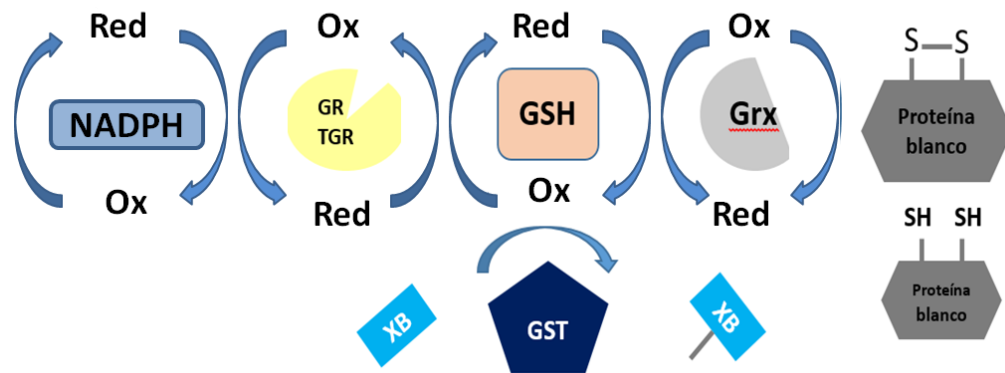


Figura 7. Sistema dependiente de GSH. Se esquematiza las diferentes reacciones redox y las diferentes enzimas que participan en este proceso. GR o TGR son capaces de reducir a la GSSG a través del NADPH para formar GSH, cuando la GSH se obtiene, esta molécula es capaz de donar sus electrones a diferentes proteínas y enzimas como glutarredoxina o glutatión transferasa (GST), para que estas proteínas actúen sobre diferentes sustratos.

2.4 Sistema dependiente de Tiorredoxina (Trx)

Está compuesto por los siguientes componentes que se muestran también en la figura 8:

Tiorredoxina (Trx). Las tiorredoxinas (Trxs) son proteínas globulares oxidorreductasas de aproximadamente 12 kD (Holmgren A, 1979, Bhatia M. et al 2016, Lee S. et al 2013). Se encuentran tanto en organismos procariotas como eucariotas (Minaya A. 2003), tienen un sitio activo conservado Cys-Gly-Pro-Cys como parte del pliegue de tiorredoxina compartido por la familia de las Trxs. (Line K. et al 2008). El pliegue tiorredoxina está formado por cuatro hojas β envueltas por tres hélices α (Figura 9). Dependiendo la especie, puede tener más hélices α y hojas β , ejemplo de ello es la Trx humana que está compuesta por cuatro hojas β y cuatro hélices α (Konigsberg M. et al 2008) (Wollman E et al 1988).

Se han descrito en humanos tres isoformas: Trx-1, Trx-2 y p32 TrxL. La Trx-1 es citosólica, tiene 104 aminoácidos esta proteína aparte de las cisteínas de su sitio activo tiene tres más: Cis 62, Cis 69 y Cis 73, las cuales juegan un papel importante en sus funciones biológicas. La Trx-2 es una isoforma mitocondrial y consta de 166 aminoácidos, pesa ~18 kD y a diferencia de la Trx-1 no posee las tres cisteínas mencionadas (Cacho-Valadez B. et al 2012). Por último la p32 TrxL está compuesta por una Trx a la que se le une una proteína citosólica de 32 kD (p32). La p32 TrxL posee 289 aminoácidos y no es reducida ni por el NADPH ni por la tiorredoxina reductasa (TrxR) por lo que se cree que no está relacionada con procesos antioxidantes (Ditgen D. et al 2016).

Las Trxs tienen múltiples funciones como antioxidantes (Campos AA 2016), entre algunos, funcionan como cofactores donando sus electrones a múltiples enzimas tales como: Tiorredoxin peroxidasa (TrxPx), Glutación peroxidasa (Gpx) y la superóxido dismutasa de manganeso (SOD_{Mn}). También tiene la capacidad de reducir por si solas al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Son capaces de traslocarse al núcleo donde pueden facilitar las interacciones proteínas-ácidos nucleicos y prevenir el daño oxidativo además de proveer equivalentes reductores (Konigsberg M. et al 2008).

Entre sus funciones biológicas oxidantes las Trxs actúan como promotores de crecimiento, como lo hace la Trx-1 estimula el crecimiento de linfocitos, fibroblastos normales y una variedad de líneas celulares tumorales (Martinez J. et al 2015). Su mecanismo es diferente al de otros factores de crecimiento. También incrementa la expresión de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), todas estas citocinas con funciones pro-inflamatorias (Konigsberg M. et al 2008).

Las Trxs juegan un papel importante en la síntesis de ADN ya que actúan proporcionando electrones a la ribonucleótido reductasa para poder formar desoxinucleótidos y así sintetizar ADN (Garcia I. 2015).

También se ha mencionado que la Trx-1 puede inhibir la apoptosis en células de leucemia linfocítica por acción de TNF- α , además interactúa con la ASK1 y NF- κ B protegiendo a la célula de la apoptosis (McCallum KC et al 2016).

Se ha reportado que la Trx es capaz de promover la unión de algunos factores de transcripción de ADN en donde interactúa con NF- κ B, AP1, AP2, p53. (Nuñez LA. 2014)

Las Trxs al donar sus electrones se convierten en proteínas oxidadas, para volver a estar en su forma reducida necesita de enzimas NADPH-dependientes como las tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), las cuales son las únicas enzimas capaces de realizar esta catálisis. Estas enzimas se clasifican como flavoproteínas oxidoreductasas dependientes de NADPH (Hanschmann EM. Et al 2013).

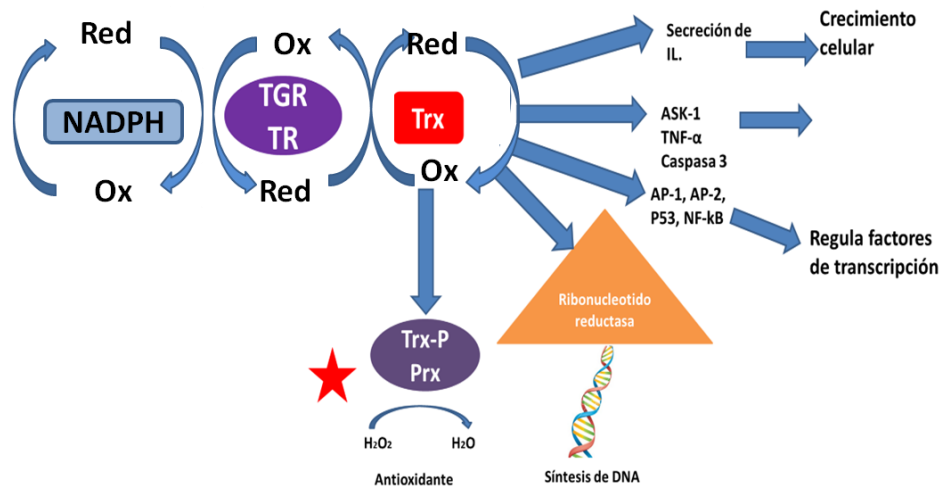


Figura 8. Funciones de la Trx. Se ejemplifica las diferentes funciones que tiene la tiorredoxina dentro de la célula.

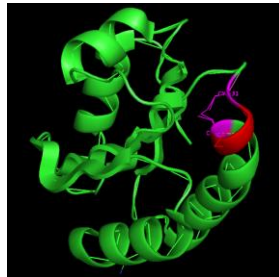


Figura 9. Estructura terciaria de la tiorredoxina. Se muestra en la imagen la conformación terciaria de Trx, la cual consta de 4 hojas β plegada envueltas de 3 α hélice. En morado se ejemplifica las dos cisteínas que están separadas (en rojo) por glicina y prolina formando el sitio activo.

Tiorredoxina reductasa (TrxR EC. 1.6.4.6): es una flavoproteína oxidoreductasa NADPH dependiente. Esta enzima utiliza los equivalentes reductores provenientes del NADPH para reducir a la tiorredoxina oxidada. Las TrxRs diméricas se expresan en vertebrados con subunidades de ~ 65 kD y en bacterias y levaduras existen las formas monoméricas con pesos moleculares de ~ 55 kD (Salinas G. 2010).

Las TrxRs están presentes en la mayoría de los organismos y se han descrito tres isoformas, una citosólica TrxR-1, una mitocondrial TrxR-2 y la tiorredoxin glutatión reductasa (TGR), esta última, capaz de reducir al glutatión y a la tiorredoxina. Estas enzimas conservan dominios para NADPH, FAD y dos sitios activos, uno con dos cisteínas separadas por dos diferentes amino ácidos y el otro compuesto de una selenocisteína (Williams D. et al 2014).

Tiorredoxina peroxidasa (TrxP EC 1.11.1.15) son enzimas hidropéroxido oxidoreductasa constituidas por una gran cantidad de proteínas con actividad de peroxidasa seleno-independiente, las cuales son capaces de reducir peróxidos como el peróxido de hidrógeno e hidropéroxidos de origen lipídico utilizando los equivalentes reductores de Trx reducida (Königsberg M 2008).

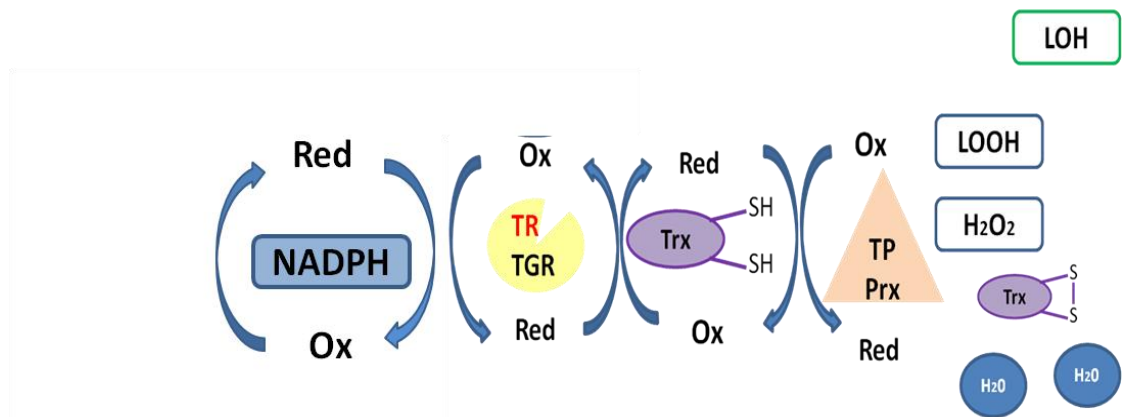


Figura 10 Sistema dependiente de Trx. Se esquematiza las diferentes reacciones redox y las diferentes enzimas que participan en este proceso. TrxR o TGR son capaces de reducir a la Trx a través del NADPH, cuando la Trx es reducida dona sus electrones a diferentes proteínas y enzimas como tiorredoxinas, peroxidasa o peroxirredoxinas, para que estas proteínas actúen sobre diferentes hidropéroxidos y neutralicen estos radicales libres.

3 Sistemas detoxificantes enzimáticos presentes en cestodos y la importancia de Tiorredoxina Glutatión reductasa (TGR).

Los parásitos son organismos especializados para poder vivir bajo un estrés oxidativo originado por la respuesta inmune (Tripathi T. et al 2015, Berriman M et

al 2013). En parte, esta adaptación están involucra diversas enzimas detoxificantes de los sistemas tiorredoxina (Trx) y glutatión (GSH). El conocer el papel de estas enzimas permitirá su manipulación con la finalidad de inhabilitarlas.

Como se mencionó, los cestodos poseen dos vías de detoxificación la de Trx y GSH.

En los mamíferos estas vías poseen de manera separada las enzimas tiorredoxina reductasa (TrxR) en la vía Trx y la glutatión reductasa (GR) en la del GSH, en los platelmintos estas enzimas TrxR y GR no están presentes de manera independiente (Williams D. et al 2013). En su lugar existe una enzima híbrida cuya estructura primaria está formada por dominios de TrxR, GR y glutarredoxina (Grx) y por ello se denomina tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) (Williams D. et al 2013). La TGR de los cestodos es una flavoproteína oxidorreductasa tiol disulfuro (E.C 1.8.1.9), su forma activa es un dímero con monómeros de 62 kD (Figura 11). Las TGRs son selenoproteínas con varios sitios catalíticos (Li Y et al 2014).

Esta enzima presenta diferentes dominios como son los de unión a: GSH, FAD, NADPH y para el sitio activo de selenocisteína. Su forma activa tiene un acomodo de sus subunidades de cola cabeza, esta configuración permite que los electrones viajen a través de los diferentes sitios activos redox para llevar a cabo su función de oxidorreductasa (Williams D. et al 2014). Las TGRs se han mencionado como un posible blanco farmacéutico contra diversas enfermedades parasitarias como la esquistosomiasis (Li T. et al 2015). Debido a que son inhibidas con moléculas derivadas del oro como el auranofin (Zhang J et al 2018).

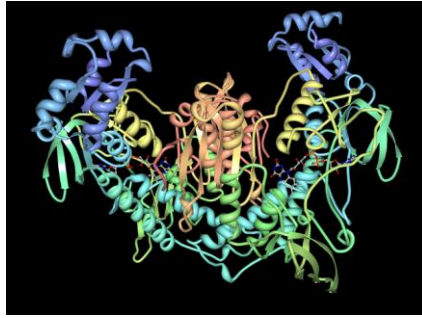


Figura 11 Estructura cuaternaria de TGR. Imagen realizada por cristalografía donde se aprecia el dímero la cual es la forma activa de la TGR.

Se han caracterizado diferentes TGR de organismos diversos, en los cuales se han utilizado sustratos de la misma especie y de especies diferentes, ejemplo de ello tenemos a TGR mitocondrial de *Fasciola hepatica* (William et al 2013), *Schistosoma mansoni* (Huang H et al 2011), *Taenia crassiceps* (Guevara et al 2010) y *Taenia solium* (Plancarte et al 2015). En dichas caracterizaciones se aprecia un efecto de mejores constantes catalíticas cuando se ocupa el sustrato propio de cada parásito. Contrariamente cuando se ocupa un sustrato diferente a la de su especie, las constantes cinéticas son inferiores comparando con las moléculas propias.

En los cisticercos de *T. solium* se han purificado y caracterizado dos isoformas de TGR, citosólica y mitocondrial. Éstas realizan todas las reacciones propias de las TGRs, (Plancarte et al 2015).

Sin embargo, la caracterización cinética de la actividad de TrxR de las TsTGRs ha sido realizada con una tioredoxina de *E. coli*. Por lo que no se tienen datos cinéticos más reales de este sistema en el cisticerco y es conveniente realizar estudios con proteínas propias.

II Justificación

Hasta el momento se sabe de la presencia de las isoformas tiorredoxina glutatión reductasa citosólica (*TsTGR*) en los cisticercos de *T. solium*, se demostró que es capaz de reducir la Trx de *E. coli* obteniendo valores cinéticos poco eficiente. Se ha visto que las TGR son más eficientes utilizando sustratos propios de la especie. Por lo que nos dimos a la tarea de expresar por biología molecular las tiorredoxinas citosólica (*TsTrx1*) y mitocondrial (*TsTrx2*). Con el fin de obtener valores cinéticos más cercanos a la realidad, entender y contribuir con el conocimiento de este sistema detoxificante y probable explicación de la evasión inmune de *T. solium*.

III Objetivo

Objetivo general

Clonar, expresar y purificar en la r-TrxTs1 y r-TrxTs2 de *T. solium* para usarlas como sustratos homólogos de la TsTGR.

Objetivo particular.

Expresar por procedimientos de biología molecular las proteínas recombinantes tiorredoxina citosólica (r-TsTrx1) y tiorredoxina mitocondrial (r-TsTrx2) de *T. solium*.

Caracterizar bioquímicamente a las r-TsTrx-1 y r-TsTrx-2.

Obtener las constantes catalíticas de la TGR citosólica de *T. solium* utilizando a la r-TsTrx-1 y r-TsTrx-2.

IV Material y métodos.

1 Parásitos

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron de cerdos infectados naturalmente provenientes del estado de Morelos, México.

Los parásitos se diseccionaron del músculo esquelético y lavaron exhaustivamente con solución salina, secaron y guardaron a -70°C hasta su uso.

1.2 Extracción de ARN totales proveniente de cisticercos de *T. solium*.

Se maceraron 3 cisticercos de *T. solium* en presencia de 500 µl de Trizol en un mortero estéril utilizando hielo seco. La mezcla se centrifugó a 13,000 g durante 3 minutos a 4°C y el sobrenadante (sn) se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml y se adicionó 220 µl de cloroformo, se mezcló por unos segundos en vórtex e incubó por 5 minutos a 4°C. A continuación la mezcla se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos a 4°C. En este proceso se formaron tres fases, la fase pigmentada (ADN), la interfase (proteínas) y la fase acuosa (ARN), esta última se colocó en un tubo de 1.5 ml estéril.

Se continuó con la precipitación del RNA, para este fin se le agregó a la fase acuosa 600 µl de isopropanol, se agito manualmente durante 5 minutos y se incubo a -80°C 1h, transcurrido el tiempo se centrifugó a 13,000 g durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se decantó el sn y se añadió 300 µl de etanol al 80% en agua más dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%, se agitó suavemente y se centrifugó a 13000 g por 5 minutos a 4°C, después se retiró el etanol y se dejó secar 5 minutos para evaporar cualquier traza de etanol, se añadió 40 µl de agua más DEPC 0.1% (Chomczynski P *et al.* 1987).

El ARN se cuantificó en un espectro de absorción Nanodrop 2000 (invitrogen) a longitudes de onda λ 260 y 280 nm, además se evaluó su integridad por geles de agarosa al 1.5 % en presencia de bromuro de etidio 0.001%

1.3 Diseño de oligos para la amplificación del gen de *TsTrx1* y *TsTrx2*.

Para llevar a cabo el diseño de los oligos se analizó la secuencia de los genes *TsTrx1* y *TsTrx2* utilizando el banco de información genética Genedb. Estas secuencias se examinaron en el programa Webcutter 2.0 con la finalidad de observar que sitios de corte son identificados por las múltiples enzimas de restricción conocidas.

Se encontró que las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* no cortaban la secuencia de ambos genes y por ello se determinó elaborar los oligos con estos sitios de corte. Para los oligo F (forward) se agregó la secuencia de reconocimiento de la enzima *NdeI* (CATATG) y adicionó los 15 primeros nucleótidos incluyendo el codón de inicio (ATG) para el gen *TsTrx1* y 16 nucleótidos para *TsTrx2*. Para el oligo R (Reverso) se agregó la secuencia de reconocimiento de la enzima *XhoI* (CTCGAG) adicionando nueve nucleótidos antes del codón de paro para *TsTrx1* (TGA) y 12 nucleótidos para *TsTrx2*. A todas las secuencias de oligos diseñadas, se les adiciono cinco nucleótidos antes del sitio de reconocimiento de las enzimas de corte para darles estabilidad para darle estabilidad.

Los oligos diseñados fueron:

***NdeI* CATATG (FORWARD)**

F-*TsTrx1* 5' a 3'

TTTAT CATATG TCG GTG GAG GTG **T_m = 53.5 °**

***XhoI* CTCGAG (REVERSE)**

R-*TsTrx1* 3' a 5'

ATTAT CTCGAG GAC GTT TGC TTG **T_m = 53.5°C**

***NdeI* CATATG (FORWARD)**

F-*TsTrx2* 5' a 3'

GAGAGG CATATG TTG GGT CAA AAA C Tm = 56°C

XhoI CTCGAG (REVERSE)

R *TsTrx2* 3' a 5'

CTT CTCGAG CTT GCA CAG CTC Tm = 56.3 °C

Para la clonación y expresión de los genes *TsTrx1* y *TsTrx2* se utilizaron dos plásmidos, el primero fue el pJET1.2 (Thermo Scientific) que es un plásmido de clonación con un gen de resistencia a ampicilina que permite insertar cualquier tipo de fragmentos de ADN con extremos romos.

El segundo plásmido fue el pET23a (Novagen), con él se llevó a cabo la expresión de los genes *TsTrx1* y *TsTrx2*. Este plásmido se escogió por poseer los sitios de corte en el sitio múltiple de clonación para NdeI y XhoI, además expresa una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal de la proteína recombinante. Esto último permite que la purificación de la proteína sea por métodos cromatográficos. Por último, es un plásmido de sobreexpresión al contener un sitio de replicación viral (T7) y un gen de resistencia a ampicilina (Sambrook J, 1989).

1.4 Síntesis de cDNA a partir de ARN totales

Para realizar la síntesis de cDNA a partir del ARN se utilizó el Kit cDNA Synthesis Kits for RT-PCR (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se adicionó 500 ng de ARN totales purificado de los cisticercos de *T. solium* mas oligo dT en un volumen final de 12 µl, después se incubo a 65 °C durante 5 minutos, a continuación se puso en hielo y se homogenizó en vortex durante 5 segundos. Después se añadió buffer 5x y 4µl de inhibidores de RNAsas, dNTP´s y la retrotranscriptasa obteniendo un volumen de 20 µl. Posteriormente, la mezcla se

homogenizó y dejó incubar a una temperatura de 42°C durante una hora e inactivo a 70 °C 5 minutos. (Sambrook J, 1989).

A partir del cDNA de *T. solium* se llevaron a cabo reacciones de PCR empleando los oligos diseñados para cada uno de los genes, los productos de PCR fueron corridos electroforéticamente en gel de agarosa 1.5% con 0.0001% de bromuro de etidio, en amortiguador TAE. Las condiciones empleadas en el termociclador (Biorad) para llevar a cabo las reacciones se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1: Condiciones utilizadas para la amplificación de *TsTrx1* y *TsTrx2*

Condiciones <i>TsTrx-1</i>	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 minutos
2	94 °C	45 segundos
3	54 °C	45 segundos
4	72 °C	1 minuto
5	72 °C	5 minutos
6	12°C	



X 30 ciclos

Condiciones <i>TsTrx-2</i>	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 minutos
2	94 °C	45 segundos
3	56 °C	45 segundos
4	72 °C	1 minuto
5	72 °C	5 minutos
6	12°C	



X 30 ciclos

1.5 Purificación del gen *TsTrx1* y *TsTrx2* y ligación en plásmido pJET 2.1

El amplificado de ambos genes se cortó del gel de agarosa y purificó con el kit GeneJET Extraction kit de Thermo scientific. La ligación de ambos genes con el plásmido pJET 2.1 blunt, se realizó colocando 71 ng de cada gen de *TsTrx* más 50 ng del plásmido pJET1.2 Blunt en presencia de T4 ligasa (5U) Thermo scientific más el amortiguador del proveedor y aforando con agua a un volumen de 20µl, la reacción se dejó incubando 16 horas a 16°C. (Sambrook J, 1989).

1.6 Construcción de los plásmidos pJET 2.1/*TsTrx1* y pJET 2.1/*TsTrx2* en bacterias competentes

Se descongelaron dos viales de 50 µl de bacterias *E. coli* TG1 y dos viales de 50 µl de bacterias XL Gold en hielo durante 10 minutos. Se añadió 10 µl de reacción de ligación (pJET 2.1/*TsTrx1* y pJET 2.1/*TsTrx2*) a cada vial de bacterias, a continuación se homogenizaron suavemente y se incubaron en hielo durante 30 minutos.

Posteriormente, las células se sometieron a un choque térmico por 40 segundos a 42°C, inmediatamente después se pusieron en hielo durante dos minutos y se les agregó 1 ml de medio de cultivo estéril de LB, se agitaron a 300 rpm durante 1 hora a 37 °C.

Al término de la incubación se centrifugaron las células a 2500 G por 3 minutos, el sobrenadante se desechó y los botones de bacterias formados se sembraron en cajas de cultivo (LB al 1% de agar en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml) dejando crecer las bacterias por 16 horas a 37°C) (Sambrook J, 1989).

Se examinaron cuidadosamente las colonias observadas en las cajas de cultivo y se seleccionaron 5 colonias al azar. Éstas colonias se incubaron en medio de cultivo esteril LB en presencia de ampicilina 0.2 mg/ ml a 300 rpm a 37°C durante 3 horas, para dejar que las bacterias incrementaran en número. Transcurrido el

tiempo se realizaron reacciones de PCR con las condiciones descritas anteriormente para cada gen. Se tomaron 2 µl del cultivo para este paso. La finalidad de haber realizado estos PCR, fue la de observar si las bacterias insertaron los plásmidos construidos.

Los productos de PCR se visualizaron por medio de un corrido electroforético en un gel de agarosa al 1.5 % con 0.001% de bromuro de etidio utilizando amortiguador TAE.

Se seleccionaron dos colonias positivas al gen de *TsTrx1* y 5 colonias positivas a *TsTrx2*, los cultivos se llevaron a 10 ml de LB estéril en presencia de ampicilina 0.2 mg/ ml 300 rpm a 37 °C, se dejaron crecer toda la noche. Después de dicho proceso se centrifugaron las bacterias por 20 minutos a 2000g a 4 °C, el sobrenadante se descartó.

A la pastilla obtenida se le extrajo el plásmido con el kit GeneJET plasmid miniprep Thermo scientific, se siguieron los pasos recomendados por el fabricante hasta la elución, la cual se realizó en dos ocasiones utilizando 30 µl de amortiguador de elución.

Los eluidos de los plásmidos obtenidos (pJET 1.2 /*TsTrx1* y pJET 1.2/*TsTrx2*) se cuantificaron por espectrofotometría de absorbancia utilizando el equipo nanoDrop 2000 de Thermo scientific. El DNA purificado de los plásmidos provenientes de las bacterias positivas al gen *TsTrx1* y *TsTrx2*, fueron secuenciados por el método de Sanger (Sanger et al. 1975) en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y analizados con en el programa 320 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas de nucleótidos se compararon en el programa BLAST del NCBI (Altschul et al. 1979) y se confirmaron como dos Trx pertenecientes a *T. solium*.

1.7 Restricción de los insertos *TsTrx1* y *TsTrx2*

Con la finalidad de liberar los genes *TsTrx1* y *TsTrx2* de sus respectivos plásmidos, se elaboró la restricción del plásmido pJET2.1 con el gen *TsTrx1* y *TsTrx2* utilizando las enzimas mencionadas anteriormente (NdeI y XhoI) en presencia del amortiguador Tango durante 12 horas a 37°C, el resultado de la restricción se visualizó por medio de un corrido electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio utilizando amortiguador TAE.

Los genes *TsTrx1* y *TsTrx2* liberados por el proceso de restricción se cortaron de los geles y se purificaron con el kit GeneJET Extraction kit de Thermo scientific utilizando las indicaciones recomendadas por el proveedor, el DNA purificado se cuantificó empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo scientific.

Se realizaron ligaciones utilizando 90 ng del gen *TsTrx1* y 89 ng del gen *TsTrx2* proveniente de la restricción. Se agregó 30 ng de plásmido pET23a abierto con los sitios de corte hecho por las enzimas NdeI y XhoI, más 2 µl del amortiguador que el proveedor proporciona en presencia de T4 ligasa, en un volumen final de 20 µl durante 16 horas a 16 °C y un periodo de inactivación de 10 minutos a 65 °C. (Sambrook J, 1989)

Se descongelaron dos alícuotas de bacterias *E.coli* origami (50 µl) y dos alícuotas de bacterias K-12 Tuner durante 10 minutos. Se añadió 10 µl del producto de ligación pET23a/*TsTrx1* a un vial de bacterias *E. coli* origami y 10 ul del producto de ligación *TsTrx1* a un vial de bacterias K-12 Tuner. De igual manera se agregó 10 ul del producto de ligación pET23a/*TsTrx-2* a bacterias *E.coli* origami y 10 ul del producto de ligación pET23a/*TsTrx2*.

A continuación se homogenizaron suavemente las mezclas y se incubaron en hielo durante 30 minutos, al haber transcurrido el tiempo, las células se sometieron a un choque térmico por 40 segundos a 42°C, inmediatamente después se pusieron en hielo durante 2 minutos y se les agregó 1 ml de medio de cultivo LB

estéril. Se incubaron a 300 rpm durante 1 hora a 37 °C, al término de la incubación se centrifugaron las células a 2500 g por 3 minutos, el sobrenadante se desechó y la pastilla que quedo con las bacterias, las cuales se resuspendieron en 200 µl de LB y se sembraron en cajas de cultivo (LB al 1% de agar en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml para bacterias K-12 Tuner y LB al 1% de agar en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml, kanamicina 0.015 mg/ml, cloramfenicol 0.034 mg/ml, tetraciclina 0.0125 mg/ml para bacterias *E. coli* origami. Se dejaron incubando las cajas de Petri por 16 horas a 37°C (Sambrook J, 1989).

1.8 Construcción de los plásmidos pET23a/TsTrx1 y pET23a/TsTrx2.

Para saber qué colonias tenían los genes de *TsTrx1* y *TsTrx2* se realizaron reacciones de PCR en las condiciones mencionadas anteriormente. Las colonias positivas a los genes *TsTrx1* y *TsTrx2* se les agrego 10 ml de medio de cultivo esteril LB en los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C y 300 rpm durante toda la noche, después de dicho proceso las bacterias se centrifugaron 2000 g por 20 minutos a 4 °C el sobrenadante se descartó, a la pastilla se le extrajo el plásmido utilizando el kit GeneJET plasmid miniprep Thermo scientific, siguiendo los pasos recomendados por el fabricante hasta la elución, la cual se realizó en dos ocasiones utilizando 30 µl de buffer de elución. Los plásmidos obtenidos se cuantificaron por espectrofotometría de absorbancia utilizando el equipo nanoDrop 2000 de Thermo scientific.

Los plásmidos purificados fueron secuenciados por el método de Sanger (Sanger et al. 1975) y analizados en el programa 320 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. La secuencia obtenida de nucleótidos se modificó a aminoácidos. Con el programa Translate de Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>) se comparó con el programa BLAST del NCBI (Altschul et al. 1979).

1.9 Inducción de las proteínas TsTrx1 y TsTrx2 por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Una colonia positiva al gen *TsTrx1* y otra del gen *TsTrx2* se recuperaron en 1 ml de medio de cultivo LB estéril en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml, kanamicina 0.015 mg/ml, cloramfenicol 0.034 mg/ml, tetraciclina 0.0125 mg/ml para bacterias origami y solo con ampicilina 0.2 mg/ml para las bacterias K-12 Tuner y se monitoreo la densidad óptica de estos cultivos cada. Se escalaron los cultivos a 10 ml y se esperó hasta que volvieran a tener una $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$. Se tomó una alícuota de 1 ml de cada cultivo. Éstas se consideraron como control sin inducción o tiempo 0 y el resto se indujeron con 1mM de IPTG para las bacterias K-12 Tuner se agregó IPTG mas arabinosa (2g/litro de cultivo). Se tomaron alícuotas de los cultivos inducidos a 1, 2, 5 y 16 horas después de la inducción para las bacterias *E. coli* origami. Para las bacterias K-12 Tuner se indujo con IPTG 1 mM más arabinosa 2g/ litro a 37°C a 320 rpm, se tomaron alícuotas a los tiempos 1,2 ,3 (Sambrook J, 1989).

Las bacterias inducidas se recuperaron por medio de centrifugación a 2000 g por 20 minutos a 4 °C, la pastilla formada se resuspendió en 0.2 ml de Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM NaH_2PO_4 20 mM (pH 7.4), se rompieron las bacterias por el método físico de sonicación, se centrifugaron a 13000 g para obtener una fracción soluble y una fracción insoluble. Se evaluó la expresión de la proteína por métodos electroforéticos en geles de acrilamida al 18%.

1.10 Cromatografía, purificación y concentración de la proteína r-TsTrx1 (Sefarosa-IMAC)

Para purificar a la proteína r-*TsTrx1* se realizó un cultivo de bacterias en 200 ml de medio de cultivo LB estéril en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml, kanamicina 0.015 mg/ml, cloramfenicol 0.034 mg/ml, tetraciclina 0.0125 mg/ml. Cuando el

cultivo llegó a la $OD_{600nm} = 0.6$ se indujo con IPTG 1 mM durante 16 horas. Las bacterias inducidas se recuperaron por centrifugación a 2,000 g por 20 min a 4°C, la pastilla obtenida se resuspendió en 3 ml de Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM NaH_2PO_4 20 mM (pH 7.4), las bacterias se rompieron por medio de sonicación y se centrifugaron a 13000 g por 10 minutos. El sobrenadante se cromatografió en una columna (1cm x 5 cm) con resina Hi-Trap IMAC sefarosa (GE Healthcare) equilibrada con NaH_2PO_4 20 mM, Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM (pH 7.4). Después de ingresar toda la muestra en la resina, ésta se lavó con 5 volúmenes de amortiguador de equilibrio, la proteína recombinante se eluyó usando NaH_2PO_4 20 mM, imidazol 500 mM y 500 mM de NaCl (pH 7.4). La concentración proteica se determinó espectrofotométricamente a una absorbancia de 280 nm. También se evaluó el proceso de purificación por métodos electroforéticos en geles de acrilamida 18% PAGE-SDS.

Una vez determinadas las fracciones cromatográficas eluidas y con la presencia de la r-TsTrx1, se colectaron y concentraron en un sistema de filtración con presión negativa (nitrógeno gaseoso) (Amicon Millipore) y posteriormente se dializaron en Tris-HCl 100 mM 1mM pH 7.8.

1.11 Inducción de la proteína r-TsTrx2 en bacterias K-12 Tuner y su extracción de r-TsTrx2 de cuerpos de inclusión.

Para purificar a la proteína r-TsTrx2 se realizó un cultivo de bacterias en 200 ml de medio de cultivo LB estéril en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml. Cuando el cultivo llegó a la $OD_{600nm} = 0.6$ se indujo con IPTG 1 mM más arabinosa 2g/l durante 3 horas, las bacterias inducidas se recuperaron por centrifugación a 2000 g por 20 min a 4°C, la pastilla se resuspendió en 3 ml de amortiguador de equilibrio, las bacterias se rompieron por el método físico de sonicación y a continuación se centrifugaron a 13000 g por 10 minutos. La fracción insoluble se resuspendió en 4 ml de amortiguador de equilibrio con 4M de urea, y se dejó incubando a

temperatura ambiente. Cada 5 minutos el cultivo se homogenizó en vórtex durante 30 segundos y este proceso se repitió durante media hora. Posteriormente la fracción se dializó en 4 litros de amortiguador de equilibrio toda la noche. La muestra dializada se recuperó y se centrifugó a 14000 g 10 min, el sobrenadante se recuperó y cromatografió en una columna (1 X 5 cm) con resina Hi-Trap IMAC sefarosa, eluyéndolo con un pulso de NaH_2PO_4 20 mM, imidazol 500 mM y 500 mM de NaCl (pH 7.4). El proceso de extracción de proteínas de cuerpos de inclusión y la purificación de la r-TsTrx2 se evaluó por métodos electroforéticos en geles de acrilamida al 18% PAGE-SDS (Laemmli, 1970).

2 Purificación de la enzima Tiorredoxina glutatión reductasa de *T. solium* (TsTGR)

La obtención de la enzima TGR de los cisticercos de *T. solium* se llevó a cabo como se describe en: Plancarte A. Nava G. 2015. Se homogenizaron 14 g de cisticercos de *T. solium* en 26 ml de imidazol-HCl 50 mM, EDTA 1mM (pH 6.5) y 100 μM de PMSF, empleando un Polytron (Brinkam inst) a 15 000 rpm en intervalos de pulsos de 1 min con 1 min de descanso en hielo, hasta obtener un total homogenado.

La muestra se centrifugó a 105,000 g por 45 minutos a 8°C (Ultracentrifuga Beckman, rotor 50 Ti). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana con poros de 0.45 μm y se cromatografió en el Biological LP System (BioRad) empleando la resina DEAE sefarosa (Sigma DFF100) (2.6 cm X 41cm) previamente equilibrada con el amortiguador Imidazol-HCl 50 mM, 1mM EDTA (pH 6.5) (amortiguador A). Las proteínas adsorbidas se eluyeron con un gradiente salino de NaCl (0 – 500 mM) disuelto en el amortiguador A con un flujo constante de 1 ml/min. El desarrollo de la cromatografía se monitoreó con el cambio de absorbancia en el espectro UV mediante el programa Biological LP Dataview Software (BioRad). Las fracciones eluidas con actividad catalítica de tiorredoxina

reductasa (reducción del DTNB, Arner et al. 1999), se juntaron y dializaron vs 4L de amortiguador Tris-HCl 100 mM con EDTA 1 mM (pH 7.8) (amortiguador B) durante 16 hrs.

Las fracciones eluidas de DEAE sefarosa y dializadas, se cromatografiaron nuevamente en el Biological LP System (BioRad) empleando la resina 2'5' ADP sefarosa (GE17-0700-01) (1.6 cm X 21cm) previamente equilibrada con el amortiguador B. Las proteínas adsorbidas se eluyeron con un gradiente de NADPH (0 – 120 μ M) disuelto en el amortiguador B con un flujo constante de 1 ml/min. El desarrollo de la cromatografía se monitoreo con el cambio de absorbancia en el espectro UV mediante el programa Biological LP Dataview Software (BioRad). Las fracciones eluidas con actividad catalítica de tiorredoxina reductasa (reducción del DTNB), se juntaron, dializaron vs amortiguador B y concentraron a 1 ml de volumen en el sistema de concentración negativa Amicon (Amicon Millipore) empleando una membrana de ultrafiltración YM-5 (Amicon Millipore).

El proceso de purificación de la TsTGR se analizó en SDS-Page acrilamida al 15% (Laemmli, 1970).

3 Estimación de la concentración proteica de las Trxs y la TGR de *T. solium*

La cuantificación de proteína se obtuvo por el promedio de los valores de absorbancia a 280 nm conseguidos de diferentes diluciones realizadas a las Trxs recombinantes y a la TsTGR. Estos valores se relacionaron con el coeficiente de extinción (ϵ) de cada una de las proteínas y el factor de dilución empleado (Torres A, et al 2008).

El ϵ de las proteínas se obtuvo por el análisis de sus secuencias primarias con ayuda del programa ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>): ϵ TsTGR = 0.865, ϵ TsTrx1 = 0.554 y ϵ TrTrx2 = 0.427.

Se empleó Tris-HCl 100 mM (pH 7.8) como amortiguador de dilución.

4 Caracterización bioquímica de *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2*.

4.1 Ensayo de precipitación de insulina.

La función de óxido-disulfuro reductasa de las Trxs se evaluó espectrofotométricamente a 650 nm mediante un ensayo de turbidez en presencia de insulina y ditioneitol (DTT): La Tiorredoxina cataliza la reducción de la insulina por la adición del DTT; este sistema permite la división de las dos cadenas (A y B) de la insulina unidas por puentes disulfuro. La cadena B es insoluble lo que provoca su precipitación y turbidez del medio (Holmgren A, 1979).

El ensayo consistió en colocar 78 μ M de insulina (Insulinex 100 UI/10 ml), DTT 4 mM y diversas concentraciones de las Trxs (*r-TsTrx1*: 3.75, 7.5; *r-TsTrx2*: 3 y 6 μ g) en volumen final de 1 ml de amortiguador de ensayo (K_2HPO_4 100 mM, EDTA 2 mM, pH 7.0). Se registró el cambio de absorbancia durante 25 minutos y como control negativo se llevó a cabo un ensayo de precipitación en ausencia de Trx.

4.2 Estabilidad de las proteínas *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2* a diferentes pH.

La estabilidad de las Trxs en función del pH se evaluó mediante ensayos de turbidez a 650 nm en las condiciones descritas con anterioridad. Alícuotas de 20 μ M de *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2* se dializaron vs a diversos amortiguadores en un rango de pH de 4 a 12 (Cuadro 3). En un sistema de ultrafiltración (Amicon Ultracon membrana de Ultracel-30, 30.000 NMWL).

Cuadro 3. Amortiguadores con diferentes rangos de pH

Amortiguador	pH
50 mM citrato de sodio – 50 mM ácido cítrico	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0
50 mM de fosfato de sodio monobásico-dibásico	6.5, 7.0, 7.5, 8.0
50 mM Tris – HCL	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0

5 Caracterización cinética de *TsTGR*, *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2*.

5.1 Actividad de reductasa de la *TsTGR* utilizando a *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2*.

La evaluación de la actividad enzimática específica de TrxR se realizó utilizando *TsTGR* y *r-TsTrx1* tomado de Holmgren (1982). El ensayo de reacción consistió en colocar en una celda de cuarzo NADPH 90 μ M, *r-TsTrx1* 20 μ M y 8.4 μ g de *TsTGR*, en amortiguador de 50 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA pH 7.8 (volumen final de 1 ml). Se registró el cambio de absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences), cuando la reacción se estabilizó (sin cambio de absorbancia) se agregaron 8.6 μ g de insulina homogenizando completamente la mezcla y se continuo el registro del cambio de absorbancia a 340 nm cada 2 segundos durante 5 minutos más.

De igual manera se realizó este procedimiento con la proteína mitocondrial *r-TsTrx2* pero se ocupó una concentración de 11 μ M.

5.2 Actividad de reductasa de la *TsTGR* utilizando los sustratos *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2* mas H_2O_2 .

La evaluación de la actividad enzimática específica de TrxP se realizó utilizando a la *TsTGR* y su sustrato *r-TsTrx1*, tomado de Bauer H 2002. La mezcla de ensayo contenía 50 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA (pH 7.8), mas NADPH 90 μ M, se agregó *r-TsTrx1* 20 μ Mol y 8.4 μ g *TsTGR* el ensayo se realizó en un volumen de 1 ml. La velocidad de reacción se leyó a 340 nm cada 2 segundos en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro de Amersham Biosciences y se visualizó 5 minutos o hasta que se estabilizara la reacción, de manera seguida se añadió 78.75 μ M de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se agitó tres ocasiones. Siguiendo este paso se volvió a leer a 340 nm cada 2 segundos para visualizar el cambio de la velocidad de la reacción.

De igual manera se realizó con la proteína mitocondrial *r-TsTrx2* pero se ocupó una concentración de 11 mM.

5.3 Valores para la determinación de las constantes cinéticas de reacción de TrxR.

Para obtener estos valores catalíticos se realizaron ensayos de velocidad inicial en donde se mantuvo fija la concentración de *TsTGR* (8.4 μ g), la de insulina (8.6 μ g), la del NADPH (90 μ M) y concentraciones variables de *r-TsTrx1* (2.6 μ M- 65 μ M), para la prueba con *r-TsTrx2* se utilizó (5.7 μ M – 456 μ M). Además se realizaron pruebas manteniendo fija la concentración de *TsTGR* (8.4 μ g), *r-TsTrx2* (11 μ M), *r-TsTrx1* (20 μ M) (cada proteína se ocupó en ensayos separados) y NADPH (90 μ M), variando la concentración de insulina en un rango de 30 μ M a 1537 μ M para ambas proteínas.

Para determinar los valores de las constantes cinéticas se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten y se construyeron gráficas de Lineweaver – Burk con los

inversos de las velocidades iniciales frente a los inversos de las concentraciones de los sustratos. De esta gráfica la pendiente de la recta es la K_m/V_{max} el intercepto de la recta en la ordenada es $1/V_{max}$ y el intercepto de la recta en la abscisa es $-1/K_m$ (Lineweaver y Burk, 1934).

5.4 Valores para la determinación de las constantes cinéticas de reacción para TrxR utilizando H_2O_2 .

Para obtener estos valores catalíticos se realizaron ensayos de velocidad inicial en donde se mantuvo fija la concentración de TsTGR (8.4 μ g), r-TsTrx1 (20 μ M), r-TsTrx2 (11 μ M), 90 μ M de NADPH y concentraciones variables de H_2O_2 (1.5 mM a 510 mM) Para determinar los valores de las constantes cinéticas se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten y se construyeron gráficas de Lineweaver – Burk con los inversos de las velocidades iniciales frente a los inversos de las concentraciones de los sustratos. De esta gráfica la pendiente de la recta es la K_m/V_{max} el intercepto de la recta en la ordenada es $1/V_{max}$ y el intercepto de la recta en la abscisa es $-1/K_m$ (Lineweaver y Burk, 1934).

V Resultados.

1 Obtención de las proteínas r-TsTrx1 y r-TsTrx2.

1.1 Análisis bioinformático de los genes TsTrx1 y TsTrx2.

La secuencia del gen Trx- 1 de *T. solium* (TsTrx1) TsM_000941400 de datos GeneDB (<http://www.genedb.org/>), en la cual existen en total 5 genes descritos como tiorredoxina 1 o 2 de origen citosólico y un solo gen reportado como tiorredoxina mitocondrial (TsM_000726200). El gen empleado en este trabajo de la isoforma citosólica se determinó por el mayor porcentaje de identidad obtenido con

la Trx funcional del cestodo *E. granulosus*. La secuencia de este gen presenta el sitio activo clásico de las tiorredoxinas, triptófano cisteína glicina prolina cisteína (WCGPC). A partir de esta secuencia se realizó el diseño de oligos. La estructura del gen TsM_000941400, al cual decidimos llamar *TsTrx1* cuenta con dos intrones y tres exones organizados en un total de 607. El transcrito de la *TsTrx2* está formado de 324 pb produciendo una proteína de 113 aminoácidos con un peso calculado de 12,250 Da y un coeficiente de extinción ξ de 0.565. Estos últimos datos se calcularon utilizando el sitio web.expasy.org.

Por otro lado, la secuencia del gen Trx- mitocondrial de *T. solium* TsM_000726200, al cual nombramos *TsTrx2*, presenta el sitio el sitio activo clásico de las tiorredoxinas, triptófano cisteína asparagina prolina cisteína (WCNPC), cabe mencionar que esta proteína contiene una asparagina en vez de glicina. A partir de esta secuencia se realizó el diseño de oligos para su amplificación del gen de *TsTrx2*. La estructura del gen cuenta con dos intrones y tres exones conformados con un número total de 581 pares de bases. El transcrito de este gen es de 363 pb originando una proteína de 150 aminoácidos con un peso molecular calculado de 15560 Daltons y un ξ 0.427, estos datos se calcularon utilizando el sitio web.expasy.org.

1.2 Amplificación de los genes *TsTrx1* y *TsTrx2*.

Con el ARN extraído de los cisticercos de *T. solium* (Figura 12) se realizó una reacción en Cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa Reversa RT-PCR con oligo dT para obtener cDNA a partir del ARN de los cisticercos de *T. solium*, a continuación se amplificó específicamente el gen *TsTrx1* con los sitios de corte NdeI (5´- 3´) y XhoI (3´- 5´) de igual manera que con el gen de *TsTrx2*.

En la figura 13 se muestra el resultado de la amplificación del gen *TsTrx1* el cual es un producto de PCR cercano a las 300 pb y en la figura 14 se muestra el resultado de la amplificación del gen *TsTrx2* con un tamaño cercano a las 400 pb

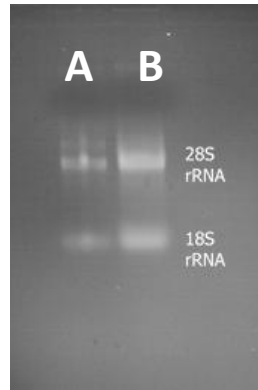


Figura 12. ARN en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. A) 100 ng de ARN totales de cisticercos de *T. solium*. B) 300 ng de ARN totales de cisticercos de *T. solium*.

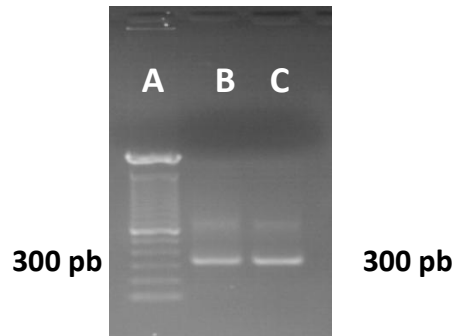


Figura 13. Amplificación del gen *TsTrx1*. Gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio A) Marcador de Número de bases (Nb) B) 2 µl del producto de PCR del amplificado de *TsTrx1*, C) 4 µl del producto de PCR del amplificado de *TsTrx1*. En ambos carriles se observa una banda con un pm molecular de 300 pb.

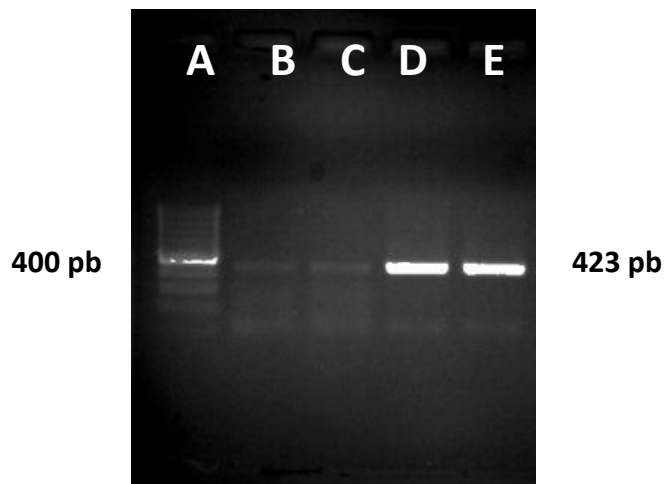


Figura 14. Amplificación del gen *TsTrx2*. Gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio A) Marcador de Nb, B-E) diferentes cantidades del producto de PCR del amplificado de *TsTrx2*. En todos los carriles se observa una banda con un pm molecular alrededor de 400 pb.

1.3 Transformación de bacterias competentes con los plásmidos pJET 2.1/*TsTrx1* y pJET 2.1/*TsTrx2*.

Se transformaron bacterias competentes con los plásmidos pJET 2.1/*TsTrx1* y pJET 2.1/*TsTrx2*, de las colonias que crecieron se seleccionaron 6 al azar de cada construcción y se evaluaron mediante una PCR usando los oligos específicos para cada Trx.

Los resultados se muestran en la figura 15 y figura 16 donde se aprecian los genes amplificados de *TsTrx1* y *TsTrx2* de las colonias de bacterias que insertaron los plásmidos construidos respectivamente.

A partir de una colonia de c/u de las construcciones se obtuvieron los plásmidos pJET2.1/*TsTrx1* y pJET2.1/*TsTrx2* de los cuales se obtuvo su secuencia. Los resultados de este análisis en ambos genes mostraron el 100% de identidad al ser comparados con las secuencias genómicas reportadas en la base de datos del Genedb (Figura 17 y Figura 18).

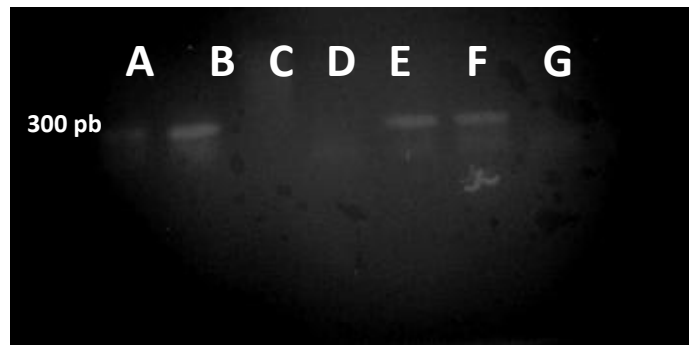


Figura 15. Amplificación al gen *TsTrx1* de bacterias TG1 y XL gold. Gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, A) Marcador de Nb, B) control positivo del PCR, C) control negativo de PCR, D) colonia TG1 negativa, E) y F) Amplificación del *TsTrx1* mediante PCR empleando una alícuota de las colonias transformadas con pJET 2.1/*TsTrx1* G) amplificado negativo de *TsTrx1* de PCR empleando colonias transformadas con pJET2.1/*TsTrx1* XL gold.



Figura 16. Amplificación del gen *TsTrx2* de bacterias TG1 y XL gold. Gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, A) Marcador de Nb, B).- control negativo del PCR, C) control positivo del PCR, D) F) Amplificación del *TsTrx2* mediante PCR empleando alícuota de colonias transformadas TG1 con pJET2.1/*TsTrx2*, E) amplificado negativo de *TsTrx2* mediante PCR empleando alícuota de colonias transformadas TG1 con pJET2.1/*TsTrx2*, G) Amplificación del *TsTrx2* mediante PCR empleando alícuota de colonias transformadas XL Gold con pJET2.1/*TsTrx2*, H) amplificado negativo de *TsTrx2* mediante PCR empleando alícuota de colonias transformadas XL gold con pJET2.1/*TsTrx2*.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
599 bits(324)	4e-176	324/324(100%)	0/324(0%)	Plus/Plus

TsTrx1	ATGTCGGTGGAGGTGGTTGTTAAGACGGTGGATGGTGACGGTCTTGAGGCAGCTATTAAG	60
r-TsTrx1	ATGTCGGTGGAGGTGGTTGTTAAGACGGTGGATGGTGACGGTCTTGAGGCAGCTATTAAG	60
TsTrx1	GGAGACAAGCTCCTCGTTTGTGATTTCTTTGCAACTTGGTGCGGTCCCTGTAAGGCGCTT	120
r-TsTrx1	GGAGACAAGCTCCTCGTTTGTGATTTCTTTGCAACTTGGTGCGGTCCCTGTAAGGCGCTT	120
TsTrx1	GCTCCAAAATTAGACGAAATGGCAAAGGAGAATGCTAACGTCGTCTTTGTAAGGTCGAC	180
r-TsTrx1	GCTCCAAAATTAGACGAAATGGCAAAGGAGAATGCTAACGTCGTCTTTGTAAGGTCGAC	180
TsTrx1	GTCGATGAGTGTCCAGGATGTCGCCGAGAAGTACCGAGTTACCGCCATGCCTACTTTGGTT	240
r-TsTrx1	GTCGATGAGTGTCCAGGATGTCGCCGAGAAGTACCGAGTTACCGCCATGCCTACTTTGGTT	240
TsTrx1	GTGTTCAAGAACGGGAATGAAATCGGTCGTGTCGTGGAGCCAATGAGGCTAGCATTAGG	300
r-TsTrx1	GTGTTCAAGAACGGGAATGAAATCGGTCGTGTCGTGGAGCCAATGAGGCTAGCATTAGG	300
TsTrx1	GAACTTATCCAAGCAAACGTCTGA	324
r-TsTrx1	GAACTTATCCAAGCAAACGTCTGA	324

Figura 17. Alineamiento de la secuencia obtenida del plásmido construido pJET2.1/TsTrx1 vs TsM_000941400

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
782 bits(423)	0.0	423/423(100%)	0/423(0%)	Plus/Plus

TsTrx2	ATGTTGGGTCAAAAACCTCGTCGCCCTTGTGCTCGTATTCTGCGACTCGGGCGCCACGT	60
r-TsTrx2	ATGTTGGGTCAAAAACCTCGTCGCCCTTGTGCTCGTATTCTGCGACTCGGGCGCCACGT	60
TsTrx2	TACTTCACTTCTCTGCGTGTGCTTTAGCAAGGAATGTGGATTATCAATATTCAGGAT	120
r-TsTrx2	TACTTCACTTCTCTGCGTGTGCTTTAGCAAGGAATGTGGATTATCAATATTCAGGAT	120
TsTrx2	CCAGCTGATTTACCAAGAAGGTCACCGAGAACGAACTCCCAGTTCTCGTCGATTTCCAC	180
r-TsTrx2	CCAGCTGATTTACCAAGAAGGTCACCGAGAACGAACTCCCAGTTCTCGTCGATTTCCAC	180
TsTrx2	GCCTCATGGTGTAAACCTTGTAAAGATGCTTGGACTGAGATTGAACGGAGTCATGAAAAAT	240
r-TsTrx2	GCCTCATGGTGTAAACCTTGTAAAGATGCTTGGACTGAGATTGAACGGAGTCATGAAAAAT	240
TsTrx2	CACATGGAGAAGGTCTCCTAGCTAAGTTCGACATCGACTCGCTGGAGGACCTAGCCACT	300
r-TsTrx2	CACATGGAGAAGGTCTCCTAGCTAAGTTCGACATCGACTCGCTGGAGGACCTAGCCACT	300
TsTrx2	CAATTCAAGGTGGCAGCTGTTCCAACCGTGGTTGGGATGCGGGGCGGCAGGGAAGTGTCT	360
r-TsTrx2	CAATTCAAGGTGGCAGCTGTTCCAACCGTGGTTGGGATGCGGGGCGGCAGGGAAGTGTCT	360
TsTrx2	CGATTACCGGTCTAAAGGAGGAGCCGAGATTGAGGAGTTCATCCAGGAGCTGTGCAAG	420
r-TsTrx2	CGATTACCGGTCTAAAGGAGGAGCCGAGATTGAGGAGTTCATCCAGGAGCTGTGCAAG	420
TsTrx2	TAG	423
r-TsTrx2	TAG	423

Figura 18. Alineamiento de la secuencia obtenida del plásmido construido pJET2.1/TsTrx2 vs TsM_000726200.

1.4 Transformación de bacterias competentes con el plásmido pET23a/*TsTrx1* y pET23a/*TsTrx2*.

En la figura 19 y 20 se observa el resultado de la liberación del inserto *TsTrx1* y *TsTrx2* por el proceso de digestión, utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI. Ambos insertos liberados de *TsTrx1* y *TsTrx2* se purificaron, utilizando el kit mencionado anteriormente. Se utilizaron los insertos para realizar la ligación en el plásmido pET23a previamente digerido (Figura 21) con las mismas enzimas de restricción NdeI y XhoI. Se purificó con el kit GeneJET Extraction kit de Thermo scientific.

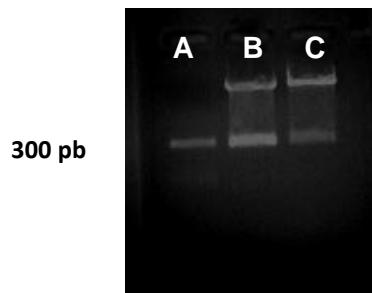


Figura 19. Restricción del plásmido pJET 1.2 y liberación del gene *TsTrx1*. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. A) Marcador de Nb (300 pb), B), C) Liberación del inserto y linearización del plásmido pJET 2.1

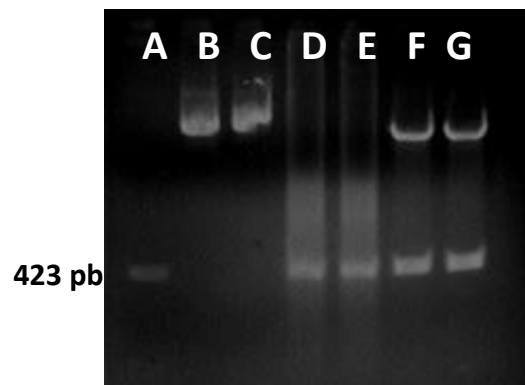


Figura 20. Restricción del plásmido pJET 1.2 y liberación del gene *TsTrx2*. Gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. A) Marcador de Nb (423 pb), B) y C) Plásmido sin digerir, D), E) restricción del gen *TsTrx2* T F.- G) Liberación del inserto y linearización del plásmido pJET 2.1

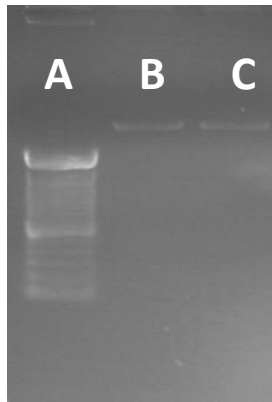


Figura 21. Restricción del plásmido pET23a con NdeI y XhoI. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A) Marcador de Nb, B) C) Plásmido pET23a digerido con enzimas NdeI y XhoI.

Se transformaron bacterias competentes *E.coli* BL21 Origami (Novagen) y K12 Tuner con los plásmidos construidos pET23a/*TsTrx1* y pET23a/*TsTrx2* .

A las bacterias que crecieron se les realizó PCR utilizando los oligos específicos para cada *Trxs*, de las cuales seis colonias resultaron positivas con el producto de ligación pET23a/*TsTrx-1* y nueve con el producto de ligación pET23a/*TsTrx-2* (figura 22 y figura 23).

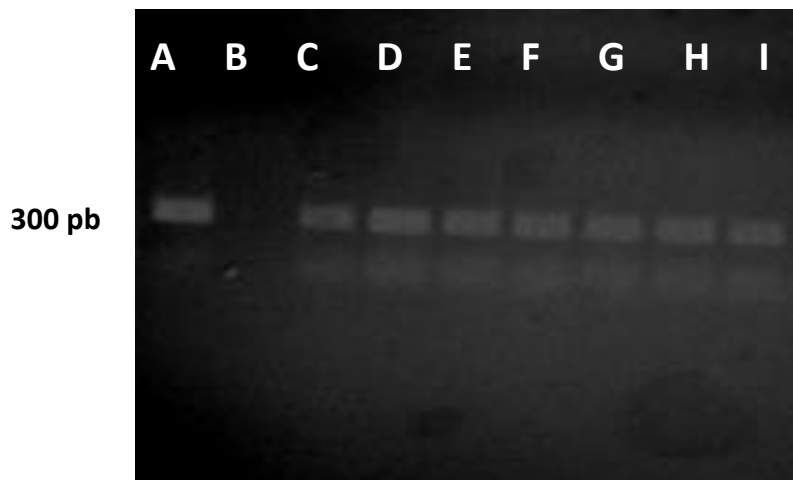


Figura 22. Selección de colonias positivas al gen *TsTrx1*. Gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. A) Marcador de Nb (300 pb), B) Control negativo, C) Control positivo, D)I) colonias positivas al gen *TsTrx1*.

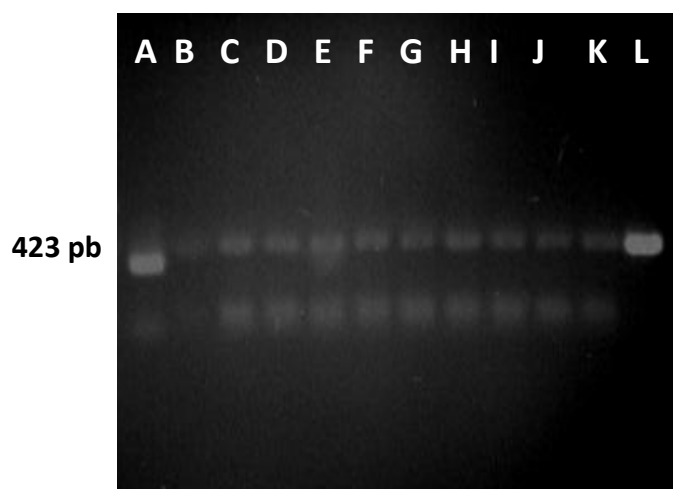


Figura 23. Selección de colonias positivas al gene *TsTrx2*. Gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio. A) Marcador de Nb (423 pb), B) Control negativo, C) Control positivo, D), F), G), H), I),J) K), L), M) colonias positivas al gen *TsTrx2*.

A partir de una colonia de c/u de las construcciones se purificaron los plásmidos pET23a/*TsTrx1* y pET23a/*TsTrx2* de los cuales se obtuvo su secuencia, estas secuencias fueron transformadas a aminoácidos con el programa Traslate de Expasy (www.Expasy.com) y se obtuvieron los marcos de lectura abiertos (ORF)

de las secuencias proteicas de r-TsTrx1 y r-TsTrx2. Los resultados de este análisis en ambas proteínas mostraron el 100% de identidad al ser comparadas con las secuencias reportadas en www.genedb.org (Figura 24, Figura 25).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
233 bits(595)	2e-86	Compositional matrix adjust.	117/117(100%)	117/117(100%)	0/117(0%)

TsTrx1	METSVEVWKTVDGDGLEAAIKGDKLLVCDFFATWCGPCKALAPKLDOMETAKENANVVF	60
r-TsTrx1	METSVEVWKTVDGDGLEAAIKGDKLLVCDFFATWCGPCKALAPKLDOMETAKENANVVF	60
TsTrx1	VKVDVDECQDVAEKYRVTAMETPTLVFKNGNEIGRVVGANEASIRELIQANVSTOP	117
r-TsTrx1	VKVDVDECQDVAEKYRVTAMETPTLVFKNGNEIGRVVGANEASIRELIQANVHHHHHSTOP	123

Figura 24. Alineamiento de los aminoácidos secuenciados de TsTrx1 vs los aminoácidos de TsM_000941400.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
312 bits(799)	3e-116	Compositional matrix adjust	152/152(100%)	152/152(100%)	0/152(0%)

TsTrx2	MLGQKLVALVARIPATRAPRYFTSSACCFKSKECGIINIQDPADFTKKVTENELPVLVDFH	60
r-TsTrx2	MLGQKLVALVARIPATRAPRYFTSSACCFKSKECGIINIQDPADFTKKVTENELPVLVDFH	60
TsTrx2	ASWCNPCKMETLGLRLNGVMETKNHMETEKVLLAKVDIDSLEDLATQFKVAAPTPTVVGME	120
r-TsTrx2	ASWCNPCKMETLGLRLNGVMETKNHMETEKVLLAKVDIDSLEDLATQFKVAAPTPTVVGME	120
TsTrx2	TRGGREVSFRFTGLKEEAIEEFIQELCKSTOP	152
r-TsTrx2	TRGGREVSFRFTGLKEEAIEEFIQELCKHHHHHSTOP	156

Figura 25 Alineamiento de los aminoácidos secuenciados de TsTrx2 vs los aminoácidos de TsM_000726200.

1.5 Expresión de las proteínas r-TsTrx1 y r-TsTrx2.

En la figura 26 se muestra una curva de inducción de bacterias *E. coli* BL21 Origami con la construcción pET23a/TsTrx1. Se tomaron 5 tiempos a la 0 horas, 1, 2, 5 y 16 horas de inducción. Se aprecia, que parte de la proteína se queda en el precipitado, también se puede observar que a tanto a las 5 horas de inducción como a las 16 horas, existe una misma cantidad de proteína producida.

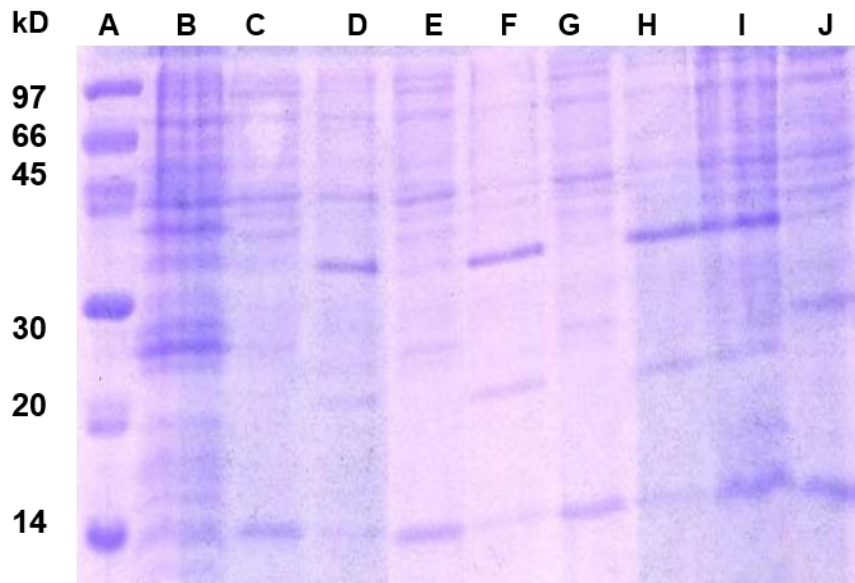


Figura 26. Curva de inducción de bacterias positivas al gen r-TsTrx1. Gel de acrilamida al 18% teñido con azul de Coomassie .A) Peso Molecular , B) Tiempo 0 C) sobrenadante (Sn) tiempo 1 hora , D) precipitado (pp) tiempo 1 hora, E) Sn tiempo 2 horas, F) Pp tiempo 2 horas, G) Sn 5 horas, H) Pp 5 horas, I) Pp tiempo 16 horas, J) Sn tiempo16 horas.

En la figura 27 se muestra una curva de inducción de bacterias K-12 Tuner con el inserto pET23a/TsTrx2. Se tomaron 3 tiempos a las 0 horas, 2 y 3 horas de inducción. Se puede apreciar, que la proteína se dirige a cuerpos de inclusión. No importando que estemos manejando bacterias capaces de modular la expresión gracias a la arabinosa. Al observar estos datos, se decidió tratar la fracción insoluble (Pp) con 4 M de urea.

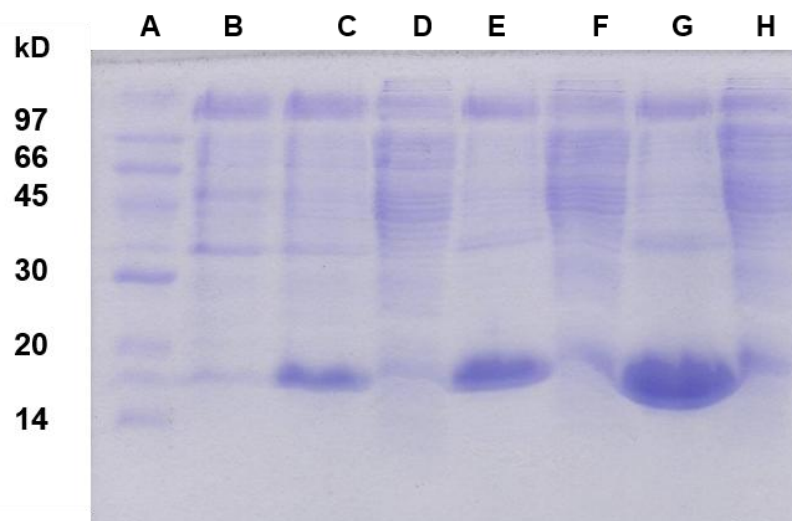


Figura 27. Curva de inducción de bacterias positivas al gen *r-TsTrx2*. Gel de acrilamida al 18% teñido con azul de Coomassie. A) Peso Molecular, B) Tiempo 0 C) precipitado (Pp) tiempo 1 hora, D) Sn tiempo 1 hora, E) Pp tiempo 2 horas, F) Sn tiempo 2 horas, G) Pp tiempo 3 horas, H) Sn tiempo 3 horas.

1.6 Purificación de la *r-TsTrx1* (Sefarosa-IMAC)

La proteína *TsTrx1* se expresó con una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal, que fue añadida por el plásmido pET23a. Esto permitió su purificación en el sistema sefarosa-IMAC 6 Fast Flow (GE Healthcare). En la figura 28 se muestran el resultado de la cromatografía de la fracción soluble de un cultivo de bacterias inducidas con IPTG. Se aprecia en la fracción eluída con el gradiente de imidazol se concentró y se evaluó el proceso de purificación por medio de una electroforesis. Además se puede apreciar que este sistema de purificación fue efectivo y específico para *r-TsTrx1*. Se obtuvo un rendimiento de 1.2 mg de proteína *r-TsTrx1* por litro de cultivo.

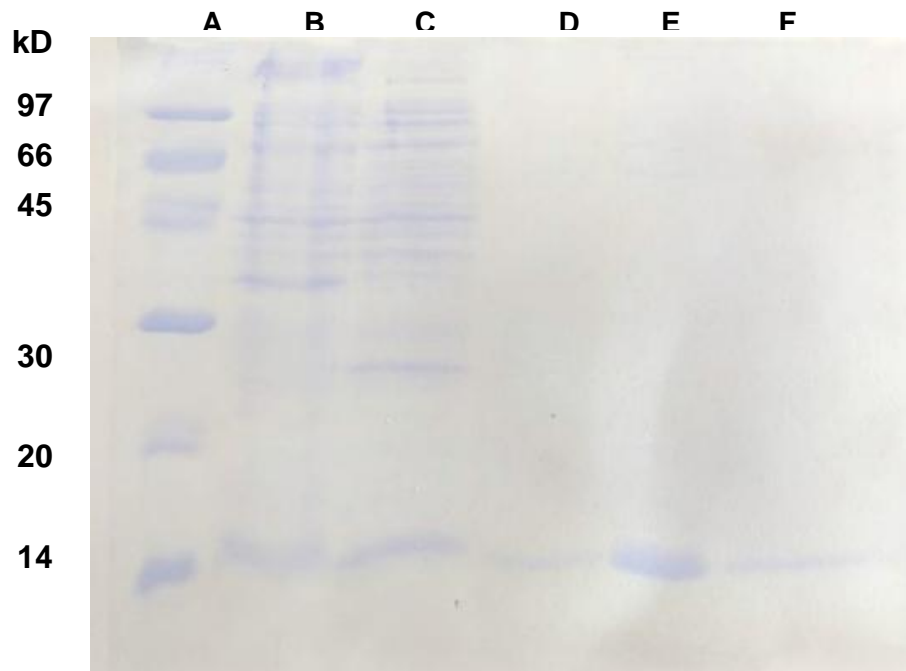


Figura 28. Purificación de r-TsTrx1. Gel de acrilamida al 18% teñido con azul de Coomassie, A) Marcador de peso molecular, B) Sn de las bacterias *E. coli* BL21 Origami pET23a/TsTrx1, C) Pp de las bacterias *E. coli* BL21 Origami pET23a TsTrx1 D), E), F) Fracciones eluidas de Hi-Trap IMAC correspondiente a TsTrx1

1.7 Purificación de la r-TsTrx2 de cuerpos de inclusión con urea 4 M y cromatografía Sefarosa-IMAC.

Las bacterias K-12 Tuner poseen un operón lac Z como la mayoría de bacterias de expresión, pero en estas células este operón posee dos promotores uno propio de lac Z y el otro es el promotor C de arabinosa. Esta construcción ayuda a regular la expresión de proteínas recombinantes que tengan una sobreexpresión y se dirijan a cuerpos de inclusión.

Al agregar arabinosa 2g/L mas IPTG 1mM notamos que la proteína se dirigía a cuerpos de inclusión desde el tiempo 1 o una hora (Figura 29), por lo que optamos hacer un tratamiento con urea 4 M al pp de las bacterias sonicadas. El sobrenadante obtenido se cromatografió en el sistema sefarosa-IMAC 6 Fast Flow

y se logró separar estas proteínas de los cuerpos de inclusión. Se obtuvo un rendimiento de 2.25 mg de proteína de un cultivo de 1 litro de bacterias.

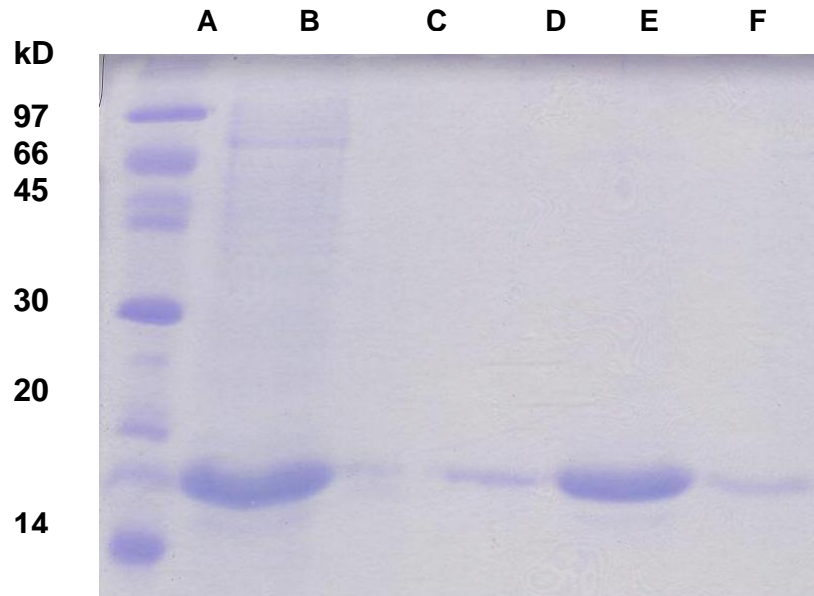


Figura 29. Purificación de r-TsTrx2. Gel de acrilamida al 18% teñido con azul de Coomassie A) Marcador de peso molecular, B) Sn de las bacterias Tuner K12 pET23a/TsTrx2 D), E), F) Fracciones eluidas de Hi-Trap IMAC correspondientes a r-TsTrx2, se aprecia una mayor cantidad de proteína purificada y funcional en el carril E).

2 Caracterización bioquímica de r-TsTrx1 y r-TsTrx2

2.1 Resultado de los ensayos de precipitación de insulina

En la Figura 30 y Figura 31 se muestran los resultados del ensayo de turbidez provocado por la reducción de insulina que realizó r-TsTrx1 y r-TsTrx2. Se aprecia r-TsTrx1 y r-TsTrx2 realizan su función de óxido-reductasa-tiol-disulfuro y esta capacidad de reducir la insulina es proporcional con la concentración tanto de r-TsTrx1 y r-TsTrx2.

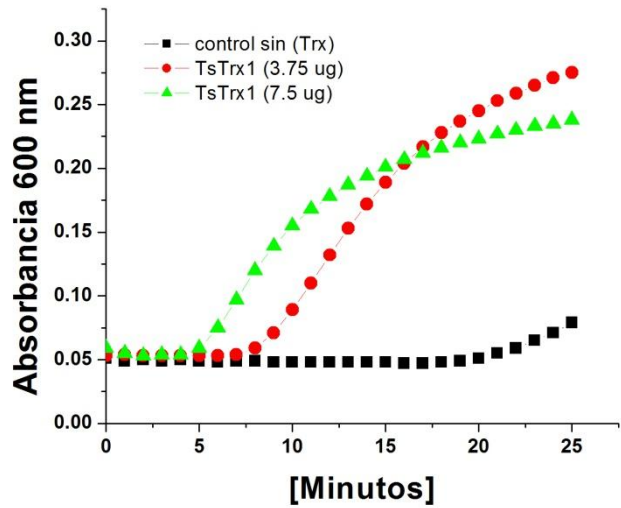


Figura 30. Precipitación de insulina r-TsTrx1. Se muestra en la gráfica el aumento en la absorbancia ocasionada por la capacidad de precipitar insulina por parte de r-TsTrx1 y a medida que aumenta la concentración de r-TsTrx1 es capaz de precipitar una mayor cantidad de insulina.

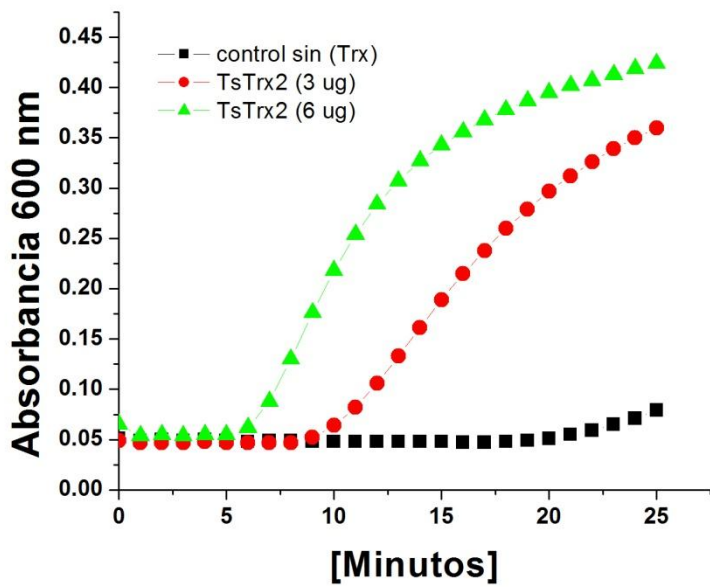


Figura 31. Precipitación de insulina r-TsTrx2. Se muestra en la gráfica el aumento en la absorbancia ocasionada por la capacidad de precipitar insulina por parte de r-TsTrx2 y a medida que aumenta la concentración de r-TsTrx1 es capaz de precipitar una mayor cantidad de insulina.

2.2 Estabilidad de *r-TsTrx1* y *r-TsTrx2* a diferentes pH.

La estabilidad conformacional de las tiorredoxinas en ambientes con diferentes valores de pH, se analizó con los ensayos de turbidez registrando la capacidad de éstas para precipitar la cadena β de la insulina.

Se puede apreciar que *r-TsTrx1* (Figura 32) y *r-TsTrx2* (Figura 32) mantienen una actividad óptima entre pH 6 a 7.5. La proteína *r-TsTrx1* pierde su actividad al llegar a pH de 5 y 10, en comparación con la proteína mitocondrial la cual pierde su actividad en pH 10 pero mantiene un 60% de su actividad en pH ácidos. Tanto la proteína *r-TsTrx1* como la *r-TsTrx2* tienen parámetros óptimos cercanos al pH fisiológico, indicando que este parásito está normalmente en pH fisiológico en los tejidos del huésped

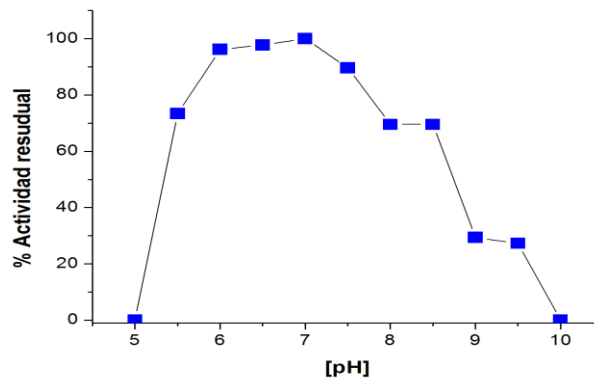


Figura 32. Estabilidad de la *r-TsTrx1* en función del pH. En la gráfica se observa el % de actividad residual para la precipitación de la insulina frente el valor de pH al cual la Trx fue dializada. La conformación activa de la proteína se mantiene en el rango de pH 6-7.5

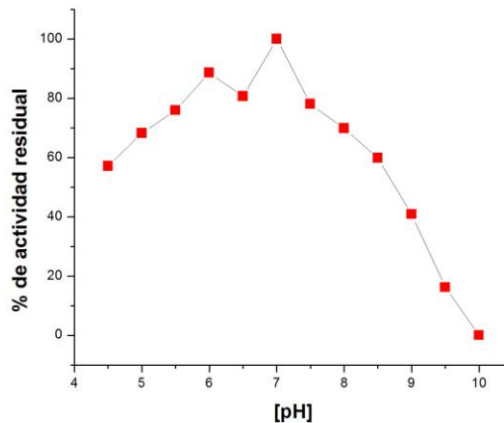


Figura 33. Estabilidad de la r-TsTrx2 en función del pH. En la gráfica se observa el % de actividad residual para la precipitación de la insulina frente el valor de pH al cual la Trx fue dializada. La conformación activa de la proteína mitocondrial se observa a pH 7, siendo estable con un 90% de actividad residual a pH 6.0

3 Purificación de la Tiorredoxina Glutación Reductasa de *T. solium* (TsTGR).

3.1 Cromatografía de intercambio iónico DEAE pH 6.5

La figura 34 muestra el resultado del proceso cromatográfico del Sn de *T. solium* en una cromatografía de intercambio iónico DEAE (Sefarosa-DEAE). En cuadros negros se aprecia la absorbancia 280 nm (-■) Existen dos grandes grupos de proteínas uno compuesto por las fracciones 47-70 fracción excluida y 83-100 fracción eluída. Cabe mencionar que el eluído se realizó mediante un gradiente de NaCl (0-0.5 M). Los puntos rojos de la figura representan la actividad enzimática medida por la reducción de DTNB (●) que se realizó para localizar la proteína de interés (TsTGR). En la fracción excluida se puede apreciar poca actividad de TrxR, mientras que en la fracción se juntaron eluída se aprecia una alta actividad entre las fracciones 87 y 97. Estas fracciones se juntaron y dializaron 16 horas en amortiguador Tris-HCL 100 mM pH 6.5.

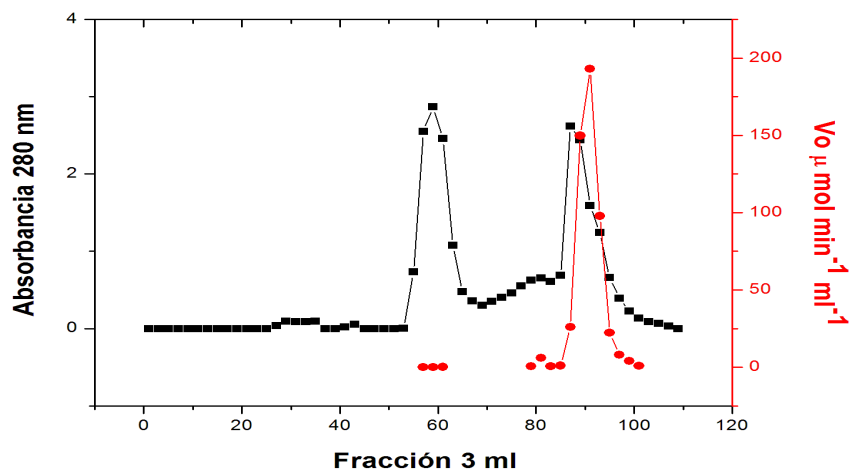


Figura 34. Cromatografía Sefarosa-DEAE –Sef. En la gráfica se observa el desarrollo cromatográfico de una fracción soluble de proteínas de *T. solium* a través de una resina de intercambio iónico. En el eje de las ordenadas (izquierda) se observa la absorbancia a λ 280 nm correspondiente a cada fracción colectada (eje de las abscisas) y en el otro eje de las ordenadas (derecha) la V_o correspondiente a la actividad de TrxR ($\mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$).

3.2 Cromatografía de afinidad sefarosa 2'5' ADP.

La figura 35 muestra el resultado del proceso cromatográfico de las fracciones con actividad a la reducción de DTNB las cuales fueron dializadas con Tris-HCl 100 mM pH 6.5 en una resina sefarosa - 2'5' ADP.

En cuadros negros se aprecia la absorbancia a 280 nm donde existen dos grandes picos de proteínas, el primero formado por las fracciones 15- 41 o fracción excluida y el segundo pico formado de las fracciones 75 a 91 o fracción eluída. En círculos azules se representa los resultados de la reducción de DTNB. Se aprecia que en la fracción excluida existe poca actividad y en la fracción eluída de la fracción 75 a 80 existe una mayor actividad $56 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

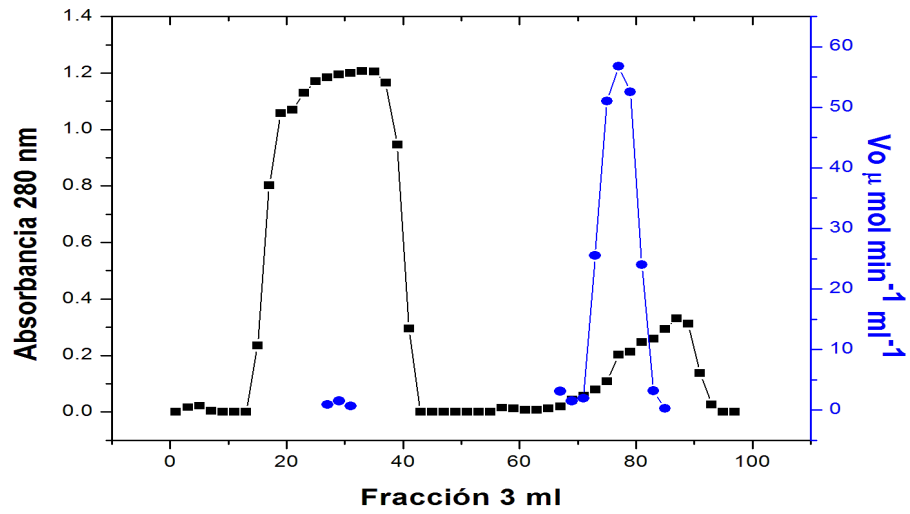


Figura 35. Cromatografía de afinidad Sefarosa- 2'5' ADP. En la gráfica se observa el desarrollo cromatográfico de un conjunto de fracciones dializadas de proteínas de *T. solium* a través de una resina de afinidad. En el eje de las ordenadas (izquierda) se observa la absorbancia a λ 280 nm correspondiente a cada fracción colectada (eje de las abscisas) y en el otro eje de las ordenadas (derecha) la V_o correspondiente a la actividad de TrxR ($\mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)

3.3 Análisis electroforético del proceso de purificación de la TsTGR.

En la Figura 36 se muestra el proceso de purificación de TsTGR desde la obtención de la fracción soluble de proteínas de los cisticercos de *T. solium* (Sn), pasando por la cromatografía de intercambio iónico (DEAE) hasta la obtención de la enzima pura con el proceso cromatográfico de 2'5'ADP-Sef. Se aprecia banda proteica pura en el carril F de un peso cercano a los 66000 Da.

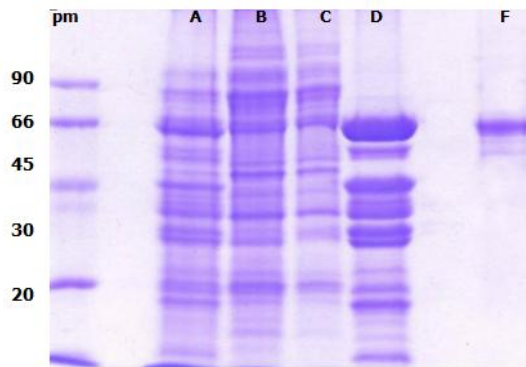


Figura 36. Análisis de la purificación de TsTGR. Sistema electroforético en gel de acrilamida al 15 %. Pm peso molecular, A) Extracto crudo, B) Excluido DEAE, C) eluído DEAE, D) excluido 2'5 ADP, F) eluído 2'5 ADP.

3.4 Determinación de las constantes catalíticas de TsTGR y r-TsTrx1

La figura 37 38 y 39 se muestra las gráficas de velocidad inicial, donde se variaron los diferentes sustratos (r-TsTrx1, insulina y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Todas estas gráficas tienen un comportamiento hiperbólico que cumple con lo descrito por Michaelis-Menten y se logró obtener los valores de Km y Vmax de c/u de los sustratos que se variaron en las reacciones cinéticas. Con los valores de Km y Vmax se obtuvieron los parámetros de Kcat y Kcat/Km.

En el cuadro 4 se resumen los parámetros cinéticos de la TsTGR con los diferentes sustratos mencionados.

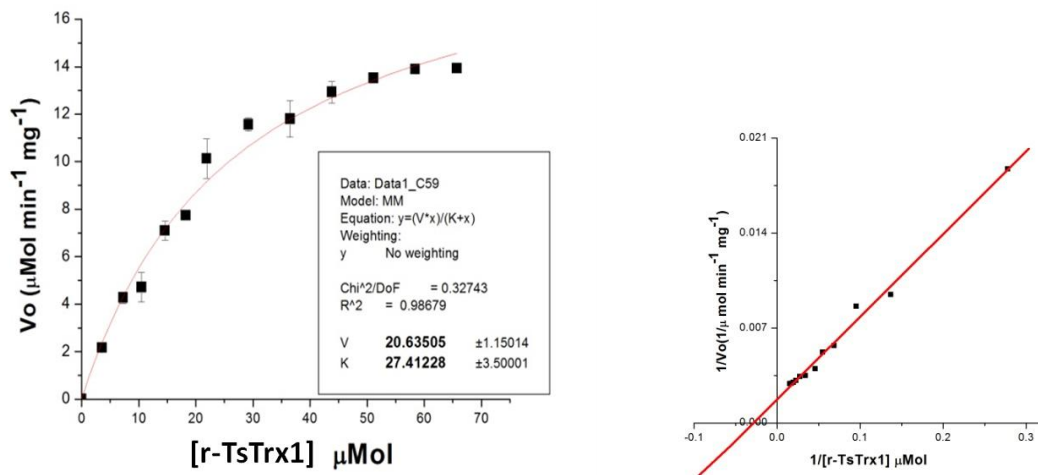


Figura 37. Caracterización cinética de TstGR y r-TsTrx1 (r-TsTrx1). A) Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa la Km y Vmax para la r-TsTrx1 con la TstGR empleando a la insulina como co-sustrato. B) Gráfica de Lineweaver-Burk (dobles inversas) para corroborar los valores de Km y Vmax.

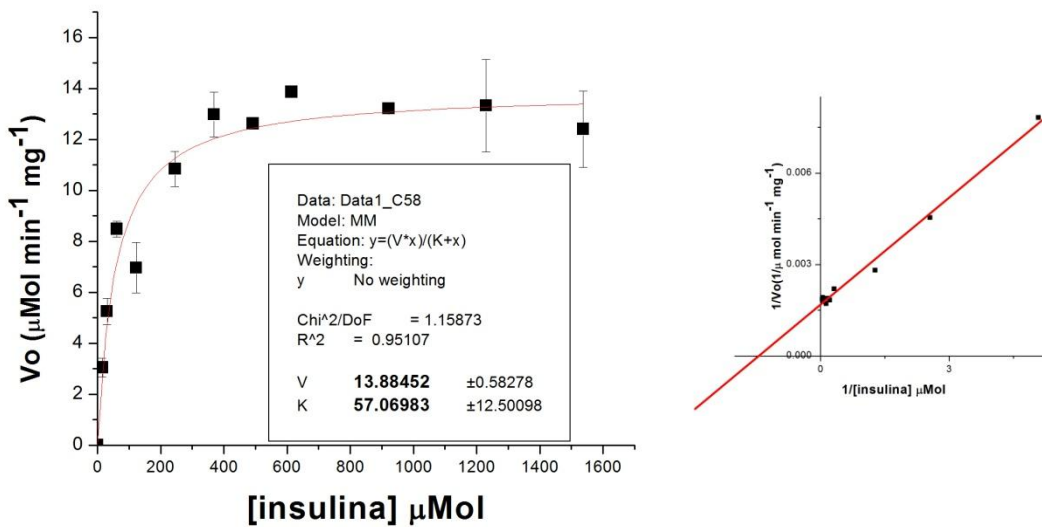


Figura 38. Caracterización cinética de TstGR y r-TsTrx1 (insulina). A) Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa la Km y Vmax para la insulina con la TstGR empleando a la TsTrx1 como co-sustrato. B) Gráfica de Lineweaver-Burk (dobles inversas) para corroborar los valores de Km y Vmax.

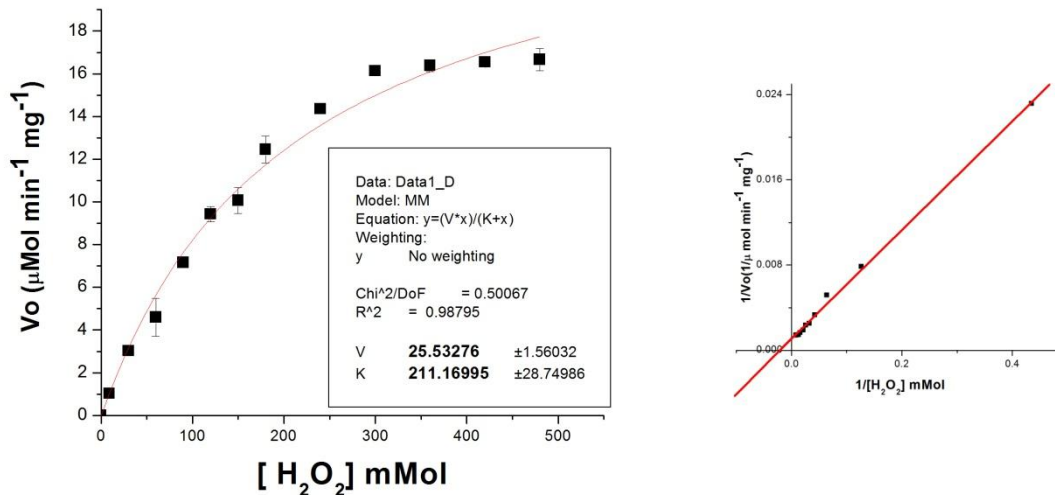


Figura 39. Caracterización cinética *TsTGR* y *r-TsTrx1* (H_2O_2). A) Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa la K_m y V_{max} para el H_2O_2 con la *TsTGR* empleando a la *TsTrx1* como co-sustrato. B) Gráfica de Lineweaver-Burk (dobles inversas) para corroborar los valores de K_m y V_{max} .

3.5 Determinación de las constantes catalíticas de *TsTGR* y *r-TsTrx2*

Las figura 40, 41 y 42 se muestran las gráficas de velocidad inicial, donde se variaron los diferentes sustratos (*r-TsTrx2*, insulina y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Todas estas gráficas presentan un comportamiento hiperbólico que cumple con lo descrito en la ecuación de Michaelis-Menten, se obtuvieron los valores de K_m y V_{max} para cada sustrato y con ellos se determinó las constantes de K_{cat} y K_{cat}/K_m .

Las constantes catalíticas de las *TsTGR* obtenidas se resumen en el cuadro 4

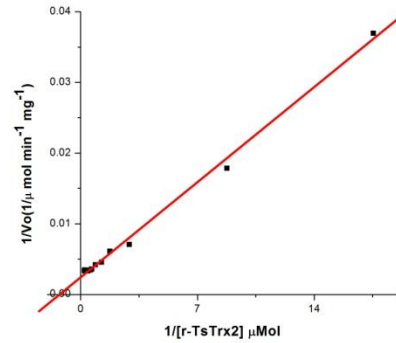
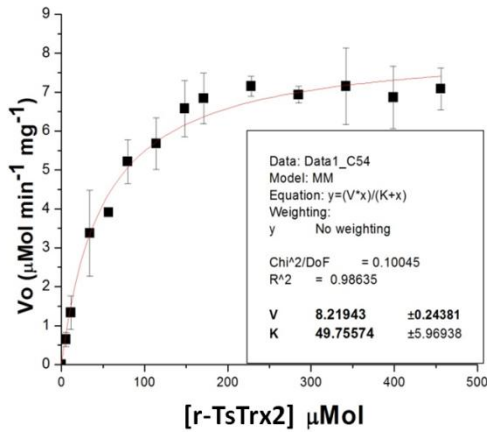


Figura 40. Caracterización cinética *TsTGR* y *r-TsTrx2* (*r-TsTrx2*). A) Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa la K_m y V_{max} para la *TsTrx2* con la *TsTGR* empleando a la *TsTrx2* como co-sustrato. B) Gráfica de Lineweaver-Burk (dobles inversas) para corroborar los valores de K_m y V_{max} .

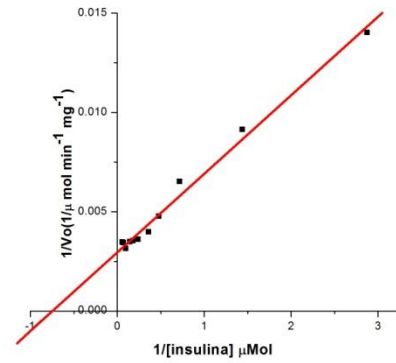
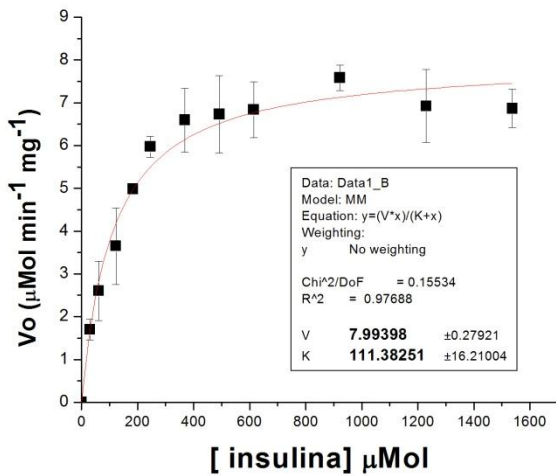


Figura 41. Caracterización cinética *TsTGR* y *r-TsTrx2* (Insulina). A) Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa la K_m y V_{max} para la insulina con la *TsTGR* empleando a la insulina como co-sustrato. B) Gráfica de Lineweaver-Burk (dobles inversas) para corroborar los valores de K_m y V_{max} .

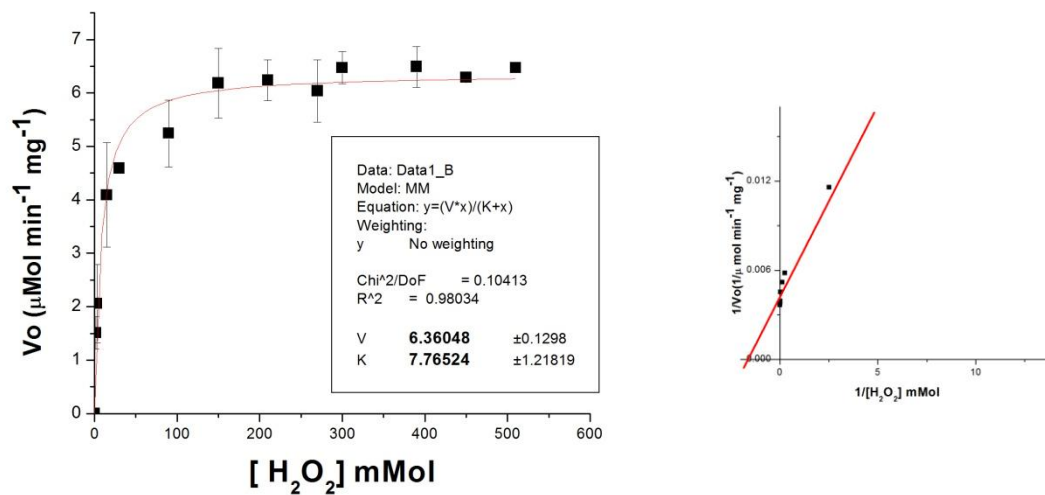


Figura 42. Caracterización cinética *TsTGR* y *r-TsTrx2* (H_2O_2). A) Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa la K_m y V_{max} para el H_2O_2 con la *TsTGR* empleando a la *r-TsTrx2* como co-sustrato. B) Gráfica de Lineweaver-Burk (dobles inversas) para corroborar los valores de K_m y V_{max} .

Cuadro 3: Constantes catalíticas de *Ts*TGR utilizando r-*Ts*Trx1 r-*Ts*Trx2 propia de *T. solium*.

Enzima	Actividad	Sustrato fijo	Sustraro variable	K_m (mM)	Actividad específica (U/mg)	K_{cat} (S ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ S ⁻¹)
<i>Ts</i> TGR	TrxR	Insulina	r- <i>Ts</i> Trx1	0.027	20	23.2	1.1 X 10 ⁶
<i>Ts</i> TGR	TrxR	Insulina	r- <i>Ts</i> Trx2	0.050	8.21	9.32	1.8 X10 ⁵
<i>Ts</i> TGR	TrxR	r- <i>Ts</i> Trx1	Insulina	0.057	13.9	15.8	2.7X 10 ⁵
<i>Ts</i> TGR	TrxR	r- <i>Ts</i> Trx2	Insulina	0.111	8	9.1	8.1 X 10 ⁴
<i>Ts</i> TGR	TPx	r- <i>Ts</i> Trx1	H ₂ O ₂	78.4	3.2	3.4	0.4 X 10 ²
<i>Ts</i> TGR	TPx	r- <i>Ts</i> Trx2	H ₂ O ₂	7.8	6.4	7.22	9 X 10 ²

VI Discusión y Conclusión.

Los sistemas tiol-disulfuro redox son importantes para la supervivencia de todos los organismos (McBean GJ, et al 2015) incluyendo los parásitos (Huang H, et al 2012). El desequilibrio en la producción de radicales libres y mecanismos detoxificantes provocan grandes daños celulares (Sartorio CL, et al 2013). Los helmintos poseen sistemas detoxificantes eficientes contra los EROs (Henkle-Dührsen K et al 2001) y tienen claras diferencias tanto con helmintos de vida libre

como con otros organismos, los sistemas reductores Trx y GSH, en el caso de los cestodos están unidas por una enzima híbrida capaz de realizar la reducción de ambas moléculas. Esta enzima es la TGR y es fundamental para la supervivencia de los parásitos (Williams D. et al 2013).

El estudio bioinformático (Nature 2013) de las proteínas *TsTrx1* y *TsTrx2* muestran claras diferencias entre ellas tratándose de dos isoformas provenientes de genes independientes. La tiorredoxina citosólica conformada por 113 aminoácidos y la Tiorredoxina mitocondrial por 150 aminoácidos. La principal diferencia en la longitud de las trxs, refiere a un extremo de 30 aa en el N-Terminal de la isoforma mitocondrial, el cual corresponde al péptido <señal que permite su ingreso del citoplasma a la mitocondria. Los sitios activos redox de las trxs son altamente conservados, presentan la secuencia clásica WCXXC; en el caso de la isoforma citosólica está conformado por WCGPC, mientras que para la Trx2 la gly se sustituye por la Asp (N). Estas diferencias son también visibles en los sitios redox de las isoformas citosólicas y mitocondriales de *E. granulosus* (Eg-NCBI XP_024351745 y Eg-gen Bank CDS22397) y *E. multilocularis* (Em-genBank CUT98964.1 y Em-genbankCDS36502.1).

Ambas proteínas se purificaron por medio de una cromatografía de Hi Trap IMAC-Sef. En el diseño de oligos para llevar a cabo la clonación de los genes se decidió utilizar el plásmido de clonación y expresión pET23a, el cual está diseñado para agregar una etiqueta de 6 histidinas en el carboxilo terminal de las proteínas expresadas y de esta manera facilitar su purificación.

Sin embargo se observó que tanto la r-*TsTrx1* como la r-*TsTrx2* formaban cuerpos de inclusión aunque en el caso de la isoforma citosólica si se logró obtener proteína de manera soluble a diferencia de la Trx mitocondrial, que aun utilizando una cepa de bacterias (Tuner), capaces de regular la sobreexpresión de proteínas recombinantes, desde la primer hora de inducción con IPTG, la Trx2 se agregó en su totalidad en cuerpos de inclusión y por ello fue necesario solubilizarla con urea

4M. A pesar de que la r-TsTrx2 se sometió a un tratamiento desnaturalizante, se logró obtener de manera homogénea a la Trx mitocondrial con un rendimiento de 2.25 mg por litro de cultivo, mayor que el rendimiento para la r-TsTrx1, el cual fue de 1.2 mg por litro de cultivo. Esta diferencia se debió tal vez a que no se consideró la pérdida en los cuerpos de inclusión de Trx1 mientras la Trx2 se obtuvo de estos. La r-TsTrx2 en su secuencia primaria presenta 6 cisteínas probablemente éstos residuos contribuyan a la formación de puentes disulfuros entre las Trx sobrepresadas en la bacteria, originando su agregación y formación de cuerpos de inclusión.

Como se mencionó se caracterizó bioquímica y cinéticamente a la enzima híbrida TGR de *T. solium*, se obtuvieron las constantes cinéticas para las actividades de glutarredoxina (Grx), glutatión reductasa (GR), peroxirredoxina (Prxs), tiorredoxina reductasa (TrxR) (Plancarte et al 2015). La actividad de TrxR obtuvo con la trx comercial de *E. coli* y las constantes obtenidos (cuadro 4) se resumen en menor eficiencia catalítica al compararlas con otras TGR y Trx (Guevara A. 2012). El ensayo de TrxR y TPx con las Trx propias de *T. solium* obtenidas por técnicas de biología molecular sugiere que ambas funciones catalíticas son importantes en la detoxificación del cisticerco. Los sustratos propios del parásito (Trx1 y Trx2) para TsTGR poseen valores superiores a los encontrados en *T. crassiceps* y *T. solium* fueron evaluados con Trx de *E. coli* (Guevara A. 2012) (Plancarte et al 2015). En la actividad de TrxR se encontró una mayor afinidad a la r-TsTrx1 ($K_m = 0.027 \text{ mM}$) en comparación con su Trx mitocondrial ($K_m = 0.050 \text{ mM}$), este valor correspondiente a que la r-TsTrx1 es el sustrato natural de la TsTGR citosólica. Al evaluar la eficiencia catalítica podemos corroborar que es ligeramente más eficiente TsTGR con r-TsTrx1 ($1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) que utilizando la proteína r-TsTrx2 ($K_{cat}/K_m = 1.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$). De manera similar ocurre en la misma reacción de TrxR mayor cuando se varía la concentración de insulina; en esta situación existe una mayor afinidad hacia la insulina por parte de r-TsTrx1 ($K_m = 0.057 \text{ } \mu\text{M}$) en comparación con r-TsTrx2 (0.111 mM), la eficiencia catalítica está en un orden

mayor ($2.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) que r-TsTrx2 ($8.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$). Estos datos sugieren fuertemente que ambas tiorredoxinas cumplen su función de manera eficiente de óxido-reductasa-tiol-disulfuro ayudando a las células a contrarrestar el efecto oxidativo en la proteínas reduciendo los puentes disulfuros presentas en ellas, evitando agregados y modificaciones estructurales.

La actividad específica de 20 U/mg desarrollada por la TsTGR cuando redujo a la insulina con su sustrato natural, r-TsTrx1, resultó mucho más alta que la obtenida originalmente (0.00023 U/mg) al emplear a la Trx-S₂ *E. coli*. Cuando se utilizó a la TsTrx1 como sustrato variable para obtener las variables catalíticas de la TsTGR con este sustrato, mostró una mejor afinidad de la TsTGR por la r-TsTrx1 ($K_m = 0.027 \text{ mM}$) que por la Trx-S₂ *E. coli* ($K_m = 0.07$) por ser mayor el valor de la K_m para este último sustrato en comparación con la r-TsTrx1. Por otro lado, el número de veces que la TsTGR redujo una molécula de insulina por unidad de tiempo resultó decenas de veces más elevado al emplear a la r-TsTrx1 ($k_{cat} = 23.2 \text{ s}^{-1}$) que a la Trx-S₂ *E. coli* ($k_{cat} = 0.35 \text{ s}^{-1}$). Adicionalmente, el resultado de la k_{cat}/K_m , a mayor valor mejor desempeño enzimático por un particular sustrato, indicó un aumento de dos órdenes de magnitud con la r-TsTrx1 (8.6×10^5) que con la Trx-S₂ *E. coli* (5.2×10^3). Valores dentro del mismo rango a los anteriores resultaron cuando se utilizó a la insulina como sustrato variable para este mismo fin.

También la actividad específica de tiorredoxina reductasa de la r-TsTrx1 (3.2 U/mg), empleando a la TsTGR, mostró un incremento de 128 veces frente a la desarrollada con la Trx-S₂ *E. coli* (0.025 U/mg). Sin embargo, esta actividad de TrxR utilizando el peróxido de hidrógeno es poco eficiente y fisiológicamente inviable.

La actividad específica desarrollada por la TsTGR cuando redujo a la insulina con su sustrato natural, r-TsTrx2, (8.21 U/mg) resultó mucho más alta que la obtenida originalmente al emplear a la Trx-S₂ *E. coli* (1 U/mg). El resto de las variables

catalíticas en el sistema tiorredoxina mitocondrial en este cestodo estuvieron en el rango obtenido en su sistema tiorredoxina citosólico. En relación a la actividad de TrxPx desarrollada por la TsTGR, esta fue superior con el empleo de la r-TsTrx2 (6.4 U/mg) que con la obtenida con la Trx-S₂ *E. coli* (1.3 U/mg) e inclusive con la r-TsTrx1. Sin embargo su valor K_m/k_{cat} se encuentran muy cercano a los del sistema citosólico reflejando también una baja eficiencia para reducir H₂O₂.

Al evaluar la actividad de TrxR utilizando a la TGR, las tiorredoxinas de *T. solium* y el peróxido de hidrógeno como oxidante de las tiorredoxinas, se puede observar en el cuadro 3 que la reacción es poco eficiente por lo que este sistema no está adaptado para poder contrarrestar el daño oxidativo del peróxido. Deben estar implicadas otras enzimas como las peroxirredoxinas para llevar a cabo esta función. Además las concentraciones utilizadas de peróxido de hidrógeno para este ensayo no están presentes dentro de la célula.

Comparando las constantes catalíticas de ambas proteínas recombinantes en función de TrxR con otras enzimas observamos que el conjunto TsTGR con ambas Trxs es mayor al citado en el trabajo de Guevara A. (2015) donde utilizando una TGR mitocondrial de *Taenia crassiceps* realizaron ensayos de TrxR con diferentes tiorredoxinas de *T. crassiceps*, *P. falciparum* y *H. sapiens* donde obtuvieron una K_m de 0.0019 mM, 0.028 mM 0.021 mM respectivamente, con estos datos podemos observar que las tiorredoxinas propias de cada parásito poseen una afinidad mayor que utilizando a otras Trxs de otros organismos. Comparando la eficiencia catalítica obtenidos del trabajo citado (*T. crassiceps* $4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, *P. falciparum* $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ y *H. sapiens* $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) podemos observar que trabajando con TGR y las tiorredoxinas de *T. solium* su eficiencia catalítica de r-TsTrx1 es un orden mayor ($1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) a la obtenida con *T. crassiceps* ($4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) y su sustrato natural, mientras que TsTGR utilizando su Trx mitocondrial su eficiencia catalítica es similar al reportado en *T. crassiceps*, en el trabajo de Guevara A. en el trabajo realizado por nosotros

cuando se utiliza una tiorredoxina diferente a la de la especie, los valores catalíticos son más bajos que utilizando su proteína homóloga, por lo que con esta observación la mejor manera de trabajar con TGR es utilizar una proteína propia o de una especie cercana para obtener valores más cercanos a la realidad.

Se ha descubierto que algunas células son capaces de secretar Trx al medio extracelular, además se ha visto que este proceso cumple una función de señalización y modulación en otras célula como se publicó en 2018 en un trabajo de una Trx-1 de *T. solium* capaz de modular la respuesta inmune en macrófagos de ratón. Este dato es muy importante ya que las Trx no solo cumplen con la reducción de proteínas oxidadas, la catálisis de peróxido de hidrógeno a agua y su participación en las diferentes vías de señalización intracelular; si no además, son capaces de modular el sistema inmune del huésped. Las Trxs caracterizadas en este trabajo podrían estar participando en procesos de modulación del sistema inmune del huésped y de esta manera ayudar a la evasión de la respuesta inmune del hospedero para favorecer su estancia dentro de sus tejidos. Aunando más en su caracterización. Podrían realizarse trabajos sobre estas Trxs enfrentándolas con diferentes tipos celulares (Leucocitos) para evaluar cambios al estar en contacto con estas Trxs, contribuyendo a dilucidar el papel de estas proteínas en la supervivencia del parásito (Xinastle LO, 2018).

VII Bibliografía.

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular 6° edición. Editora S.A Elseiver 2011 impreso en Madrid España.

Aguilar-Diaz H, Bodes R, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos M et al. 2006. The genome project of *Taenia solium*. *Parasitol Int* 55: S127-S130.

Altschul SF, Maden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1979. Apped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleid Acids Res*: 25: 3389-3402.

Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette JP, Larralde C, et al. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de cultura económica. México 1987.

Apostolova N, Victor M. 2015. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Mar 10; 22(8): 686–729. doi: 10.1089/ars.2014.5952.

Ayala A, Muñoz F, Argüelles S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2014.

Berriman M, Brehm K, Laclette JP. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to Parasitism. *Nature*. 496(7443): 57–63. doi:10.1038/nature12031.

Bhatia M, McGrath k, DiTrapani G, Charoentong P, Shah F, King M, et al. 2016. The thioredoxin system in breast cancer cell invasion and migration. *Redox Biology* 8 68–78.

Botero D, Restrepo M. 2012. *Parasitosis Humanas* 5ª edición Colombia Medellín, editora Corporación para investigaciones biológicas-CIB. Pag 530-549.

Cacho-Valadez B, Muñoz-Lobato F, Pedrajas JF, Cabello J, Fierro-González JC, Navas P et al, .2012. The Characterization of the *Caenorhabditis elegans* Mitochondrial Thioredoxin System Uncovers an Unexpected Protective Role of

Thioredoxin Reductase 2 in b-Amyloid Peptide Toxicity. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING Volume 16, Number 12,

Campos AA, Análisis de la interfaz dimérica de la tioredoxina 1 del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, y el efecto de mutaciones en su estructura. Tesis de doctorado. UNAM, Maestría y doctorado en ciencias bioquímicas, junio 2016.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ 2003..Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III J Biol Chem. 2003 Sep 19; 278(38):36027-31.

Chiumento y Bruschi. 2009 Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. Parasitology Research. 105: 593-603

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162(1): 156-159.

Damian T, Morales-Montor J, Olecki P, Talhouk, Morales-Montor DJ, Talhouk O, Hashmey R, Clinton A. 2005. Characterization of excretory/secretory endopeptidase and metallo-aminopeptidases from metacestodes *Taenia crassiceps* 2005. Salman Baig, Raymond. Journal of Parasitology, 91(5):983-987.

Ditgen D, Anandarajah, EM, Hansmann, J, Winter D, Schramm G, Erttmann KD et al: 2016. Multifunctional Thioredoxin-Like Protein from the Gastrointestinal Parasitic Nematodes *Strongyloides ratti* and *Trichuris suis* Affects Mucosal Homeostasis. J Parasitol Res. 2016; 2016: 8421597.

Englard S, 1969. Extramitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. Meth Enzymol 13: 123-129.

Figuroa-García M, Espinosa-García MT, Martínez-Montes F, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R. 2015. Even a Chronic Mild Hyperglycemia Affects Membrane Fluidity and Lipoperoxidation in Placental Mitochondria in Wistar Rats PLoS One. 2015; 10(12): e0143778.

Fleury A, Escobar A, Chavarria A, Carrillo-Mezo R, Sciutto E. 2006. Cisticercosis en el ser humano. Cisticercosis para profesionales de la salud. C. Larralde de Aluja A.S México D.F Fondo de cultura económica pag 41-80.

Foro "Prevención y control de la teniasis/cisticercosis en México" situación de la cisticercosis en México publicado julio 28 de 2016 http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/CE_NAPRECE_CisticercosisMERCK.pdf revisado 16032018.

Garcia I. Caracterización parcial de una tiorredoxina recombinante (trx) de *Taenia solium*. 2015. Tesis de maestría. México, Ciudad de México, facultad de medicina.

Gomez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Sciutto E et al. 2015. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). Scientific reports| 5 : 9683.

Guevara A. Purificación y comparación de las propiedades bioquímicas de la Tiorredoxina-glutation reductasa (TGR) en dos representantes del Phylum Platyhelminthes: *Taenia crassiceps* (Cestoda) y *Fasciola hepatica* (Trematoda). Tesis de doctorado. UNAM. Doctorado en ciencias biológicas. Junio de 2012.

Guevara-Flores A, del Arenal P, Mendoza-Hernández G, Pardo JP, Flores-Herrera O, Rendón JL Mitochondrial Thioredoxin-Glutathione Reductase from larval *Taenia crassiceps* (Cysticerci). J Parasitol Res. 2010; 2010: 719856.

Guevara-Flores A, Herrera-Juarez IM, Martínez-González JJ, del Arenal IP, Flores-Herrera O, Rendón JL. 2017. Differential expression of disulfide reductase enzymes in a free-living platyhelminth (*Dugesia dorotocephala*). PLOS ONE.

Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) Free Rad. Res, Vol 31, pp. 261-272.

Hansberg W. 2002. Biología de las especies reactivas de oxígeno. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI.

Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Horst C. 2013. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins— Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. Antioxidants y redox signaling Volume 19, Number 13.

Henkle-Dührsen K, Kampkötter A. 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. Molecular and biochemical parasitology. 114: 129-142

Holmgren A, 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiotheritol and dihidrolipoamide. The journal of biological chemistry. Vol 254 9627-9632.

Holmgren A, 1979 Rat Liver Thioredoxin and Thioredoxin Reductase: Purification and Characterization. American Chemical Society 0006-2960/82/0421-662

Huang H, Day H, Cass C, Ballou D, Williams C, Williams D. 2011 Investigations on the Catalytic Mechanism of Thioredoxin Glutathione Reductase (TGR) from *Schistosoma mansoni*. Biochemistry. July 5; 50(26): 5870–5882.

Huang H, Rigouin C, Williams DL. 2012. The Redox Biology of Schistosome Parasites and Applications for Drug Development. Curr Pharm Des. 18(24): 3595–3611.

Huang J, Hua W, Li J, Hua Z. 2015. Molecular docking to explore the possible binding mode of potential inhibitors of thioredoxin glutathione reductase Mol Med Rep. Oct; 12(4): 5787–5795.

Jeong C, Joo S. 2016. Downregulation of reactive oxygen species in apoptosis Vol. 21, No. 1.

H.Z. Chae, S.J. Chung, S.G. Rhee Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast J. Biol. Chem., 269 (1994), pp. 27670-27678

Jiménez L, Rodríguez-Lima O, Ochoa-Sánchez A, Landa A. 2015. Characterization of a Thioredoxin-1 Gene from *Taenia solium* and Its Encoding Product. BioMed Research International Volume, Article ID 453469, 10 pages

Jiménez-Hidalgo M, Léopold C, Pedrajas J, Naranjo-Galindo FJ, González-Barrios M, Cabello J et al. 2014. Functional characterization of thioredoxin 3 (TRX-3), a *Caenorhabditis elegans* intestine-specific thioredoxin. Free Radical Biology and Medicine 68 205–219.

Konigsberg M. Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médicas. Ciudad de México 2008 Editora manual moderno. Pag 97-135

Kunchithapautham K, Padmavathi B, Narayanan RB, Kaliraj P, Scott AL. 2003. Thioredoxin from *Brugia malayi*: Defining a 16-Kilodalton Class of Thioredoxins from Nematodes. Infection and immunity, p. 4119–4126 Vol. 71, No. 7 0019-9567/03/\$08.000 DOI: 10.1128/IAI.71.7.4119–4126.2003

Lee S, Kim S, Lee RT, 2013. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. Antioxidants and redox signaling. 18: 133-137.

Li T, Ziniel P, He P, Kommer VP, Crowther GJ, He M. et al. 2015. High-throughput screening against thioredoxin glutathione reductase identifies novel inhibitors with potential therapeutic value for schistosomiasis. *I. Infectious Diseases of Poverty* 4:40 DOI 10.1186/s40249-015-0071-z

Li Y, Wu Q, Peng Y, Huang F, Li X, Chen L et al. 2014. Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma japonicum* in complex with FAD Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. Jan 1; 70(Pt 1): 92–96.

Line K, Isupov M, Esther Garcia-Rodriguez E, Maggioli G, Parra F, Littlechild J.2008. The *Fasciola hepatica* thioredoxin: High resolution structure reveals two oxidation states. *Molecular & Biochemical Parasitology* 161 (2008) 44–48.

Manta B. Análisis funcional de glutarredoxinas monotiólicas de tripanosomas. 2013. Tesis de doctorado, Uruguay. Universidad de la Republica, PEDECIBA-biología.

McBean GJ, Aslan M, Griffiths HR, Torrão RC.2015. Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. *Redox Biology* 5 (2015) 186–194.

McCallum KC, Liu B, Fierro-González JC, Swoboda P, Arur S, Miranda-Vizueté A, Garsin A. 2016. TRX-1 Regulates SKN-1 Nuclear Localization Cell Non-autonomously in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, Vol. 203, 387–402 .

Minaya A. Inmunolocalización de una tiorredoxina H en órganos reproductivos de *Nicotina alata*. 2003. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química, México D.F.

Mkupasi EM, Sikasunge CS, Aminiel H, Leifsson PS, Vang M. 2013 Detection of cysteine protease in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. *Veterinary Parasitology* 197: 360–363

Nava G, Laclette J, Bobes R, Carrero J, Reyes H, Enriquez S, et al 2011. Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Experimental parasitology* 128: 217-224.

Nava G, Plancarte A, Mendoza G, et al 2009. Purificación, propiedades, and kinetics studies of cytoplasmic malate dehydrogenase from *Taenia solium* cysticercosis. *Parasitol Res.* 105: 175-183.

Nieto D, Historical notes on cysticercosis. En flisser A, Willims K, Laclette JP, Larralde C, et al *Cysticercosis. Present state of Knowledge and perspectives academic.* Press, New York. 1982.

Nilsson L, Gustafsson A, Mannervi B. 2000. Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic PNAS August 15, 2000 vol. 97 no. 17 9408.

Nuñez LA, Alvares AF, Arias-Olguin II, Torres A, Georgellis D. The ArcB Leucine Zipper Domain Is Required for Proper ArcB Signaling. *Plos one* open acces. Published: May 30, 2012 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038187>.

Nuñez LA. Caracterización del mecanismo de regulación de ArcB: papel de las vías reductoras de tiorredoxinas y glutarredoxinas en la activación de cinasa ArcB. Tesis de doctorado. Maestría y doctorado en ciencias bioquímicas. UNAM diciembre de 2014.

Organización mundial de la salud México avanza hacia un plan de intervención integrada para la prevención y control de la teniasis y neurocisticercosis publicado 20 de Febrero de 2017 http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=article&id=1232:mexico-avanza-hacia-un-plan-de-intervencion-integrada-para-la-prevencion-y-control-de-la-teniasis-y-neurocisticercosis&Itemid=499 revisado 030318.

Organización mundial de la salud. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria publicado 3 de diciembre de 2015 <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/> revisado el 140318

Organización Mundial de la Salud. Teniasis y cisticercosis, nota descriptiva. Última actualización marzo 2017 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/> revisado el 05/04/18.

Plancarte A, Nava G, Munguía JA. 2017. A new thioredoxin reductase with additional glutathione reductase activity in *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol.* doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.006.

Plancarte A, Nava G. 2015 Purification and kinetic analysis of cytosolic and mitochondrial thioredoxin glutathione reductase extracted from *Taenia solium* cysticerci. *Exp Parasitol.* Feb; 149:65-73. doi: 10.1016/j.exppara.2014.12.009.

Rendon J. Del Arenal P. Guevara A. Uribe A. Plancarte A. Mendoza G. Al 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular & Biochemical Parasitology* 133 61–69.

Rev Argent Cardiol; 81:216-218. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v81.i3.2616>

Rodriguez RR. Contribución al estudio de la cisticercosis porcina. Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. UNAM. México 1962 15-35.

Rodriguez U, Rios C, Corona T, Talayero B, Ostrosky P, Herrera L. 2008 Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocisticercosis. *Trans R. Soc Trop. Med Hyg* 102, 1025-1031.

Ross F, Hernández P, Porcal W, Lopez G, Cerecetto H, González M et al 2012. Identification of thioredoxin glutathione reductase inhibitors that kill cestode and trematode parasites. *Plos one. Drug Hits for the Control of Flatworm Parasites*. Volumen 7, issue 4.

Salinas G. 2010 Bioquímica de las selenocisteína el 21^{er} aminoácido y rol de las selenoproteínas en la salud humana. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIV, 2010, 121-133.

Salinas G. Selkirk M. Chalar C. Maizels R. Fernández C. 2014 Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trens in Parasitology* Vol.20 No.7 341-346.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TM, 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual second edition*. Cold spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

Sanger F, Goulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448.

Sartorio CL, Araujo A, Bello A. 2013. La protección de la tiorredoxina-1 frente a la isquemia y reperfusión miocárdica... ¡no ocurre como con los buenos vinos!.

Sies H 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, Nos. 9/10, pp. 916–921.

Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem. 215, 213-219.

Sies H, Berndt C, Jones DP. 2017. Oxidative Stress. Annu Rev Biochem. Jun 20;86:715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

Suttiprapa S, Matchimakul P, Suttiprapa S, Matchimakul P, Loukas A, Lahad T, et al 2012. Molecular expression and enzymatic characterization of thioredoxin from the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. Parasitol Int. 2012 March ; 61(1): 101–106.

Torres A, Ianda A. 2008. Glutathione transferase from parasites. A biochemical view. Acta trópica Vol 105: 99-112.

Tripathi T, Suttiprapa S, Sripa B. 2015. Unusual thiol-based redox metabolism of parasitic flukes. Parasitology International <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.013>.

UNAM. Facultad de Medicina. Departamento de microbiología y parasitología. Cisticercosis, Dra. Teresa Uribarren. Actualización 6 febrero 2018 <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html> revisado 140218.

Williams D, Bonilla M, Gladyshev, Salinas G. 2013. Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites. Antioxidants and redox signaling 19(7) 735-745.

Wollman E, Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, et al 1988. Cloning and expression of cDNA for Human thioredoxin. The journal of biological chemistry. Vol. 263, No. 30, 15506-1551

Xinastle LO. Efecto de la tiorredoxina-1 recombinante de *Taenia solium* (TSTRX-1r) sobre macrófagos peritoneales de ratón Balb/c /

tesis de Maestría. Maestría y doctorado en ciencias bioquímicas. UNAM. Febrero de 2018

Young-Mi G, Dean J, 2017, Redox theory of aging: implications for health and disease. Clin Sci ; 131(14): 1669–1688. Doi: 10.1042/CS20160897.

Zhang J, Zhang B, Li X, Han X, Liu R, Fang J, 2018. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: An update. Med Res Rev. May 4. doi: 10.1002/med.21507.

Zimica M, Pajuelo M, Gilman RH, Gutiérrez AH, Rueda LD, Flores M, et al 2012. The highly antigenic 53/25 kDa *Taenia solium* protein fraction with cathepsin-L like activity is present in the oncosphere/cysticercus and induces non-protective IgG antibodies in pigs. Vet Immunol Immunopathol. 2012 January 15; 145(1-2): 171–178. doi:10.1016/j.vetimm.2011.11.002.

Zúñiga F, Palomares A et al 2016. El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología. BioTecnología, Vol. 20 No. 2.