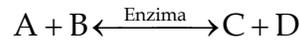


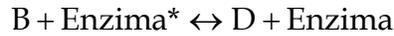
L-MetSO en un rango de concentración de 78 a 5000 μM ; TcTXNI entre 0,6 a 40 μM y TcPMSR10 o TcPMSR180, 0,5 μM y 2 μM , respectivamente.

3.7.3. Determinación de potencial de reducción estándar de EhTRXR.

A partir de las relaciones de los cocientes de los parámetros cinéticos (k_{cat} y K_m) determinados para cada sustrato de la reacción directa e inversa de una reacción catalizada por una enzima:



la cual es suma de dos semirreacciones:



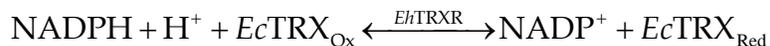
se obtienen las constantes bimoleculares de reacción entre la enzima y el sustrato para una dirección determinada, y acorde a la relación de Haldane (Alberty, 2006), el cociente de las constantes de velocidad bimoleculares de las reacciones directa e inversa para un sustrato determinado da la constante de equilibrio aparente de una de las semirreacciones (entre uno de los sustratos y la enzima) :

$$\frac{V_{m_d}/K_{m_d}}{V_{m_i}/K_{m_i}} = \frac{k_d}{k_i} = K_{\text{eq}}'$$

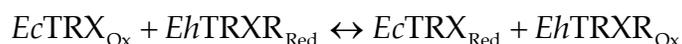
donde el subíndice d corresponde para la reacción directa y el subíndice i corresponde a la reacción inversa. A partir de la ecuación de Nernst, conociendo la constante de equilibrio de reacción de una semirreacción más el potencial de reducción estándar del sustrato utilizado como referencia se puede calcular el potencial de reducción estándar global de la enzima, como se describe a continuación:

$$\Delta E^{\circ} = \frac{RT}{nF} \ln K_{\text{eq}}' = E_1^{\circ} - E_2^{\circ}$$

Para el caso de EhTRXR la reacción que cataliza es:



la cual es suma de dos semirreacciones:



determinando las constantes de equilibrio entre la *EhTRXR* y los pares NADPH/NADP⁺ y *EcTRX*_{Ox}/*EcTRX*_{Red} y teniendo sus respectivos potenciales de reducción estándar como referencia se estimó el potencial de reducción de la enzima. Se empleó un *E*^{o'} del par NADP⁺/NADPH de -320 mV) y para el par *EcTRX*_{Ox}/*EcTRX*_{Red} de -283 mV (Cenas y col., 2004; Cheng y col., 2007).

Tanto la reacción directa como inversa se evaluaron por monitoreo de la oxidación/reducción de NADPH/NADP⁺ a 340 nm en un medio de reacción compuesto por fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM. En la reacción directa se empleó NADPH 1,5-300 μM; *EcTRX* 0,3-20 μM e insulina bovina 130 μM como aceptor final de electrones. En la reacción inversa se utilizó NADP⁺ 7-1000 μM; *EcTRX* 0,3-20 μM y DTT 5 mM como dador inicial de electrones. Para ambas reacciones se uso *EhTRXR* a una concentración de 0,1 μM.

3.7.4. Determinación de potenciales de reducción estándar de TRX.

La reversibilidad de la reacción $\text{NADPH} + \text{TRX}_{\text{Ox}} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NADP}^+ + \text{TRX}_{\text{Red}}$ fue empleada para determinar la constante de equilibrio usando el cambio de absorbancia a 340 nm. Las TRX en estudio en un rango de concentraciones desde 5 a 30 μM fueron mezcladas con NADPH 36 μM en un volumen total de 250 μl a pH 7,0, a 30 °C, seguido por la adición de *EhTRXR* 1 μM. Alcanzado el equilibrio, un exceso de NADP⁺ (1,2 mM) fue adicionado. La formación de NADP⁺ y NADPH fue analizada espectrofotométricamente evaluando las variaciones en la absorbancia a 340 nm, respectivamente. A partir de las concentraciones en el equilibrio, los potenciales redox fueron calculados acorde a la ecuación de Nernst:

$$E^{\circ'}_{\text{TRX}_{\text{Ox}}/\text{TRX}_{\text{Red}}} = E^{\circ'}_{\text{NADP}/\text{NADPH}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{NADP}][\text{TRX} - (\text{SH})_2]}{[\text{NADPH}][\text{TRX} - \text{S}_2]}$$

Un valor de -320 mV fue utilizado como potencial redox del par NADP⁺/NADPH (Cheng y col., 2007).

3.7.5. Determinación del potencial de reducción estándar por titulación redox.

Las titulaciones redox se llevaron a cabo incubando las proteínas en estudio (1-2 μM) por 3 h a 33 °C en un medio que contenía TRIS-HCl 200 mM pH 7,5; EDTA 2 mM; GSSG 0,5 mM y diferentes concentraciones de GSH de forma tal de obtener diferentes potenciales de semi-celda (E_h). Una vez finalizadas las incubaciones, se analizaron las muestras de cada una en SDS-PAGE no reductor (ver 3.5.1), determinando, sobre las bandas proteicas obtenidas, la abundancia de la fracción reducida mediante densitometría empleando el programa LabImage 2.7.2 Free edition (Kapelan GMBH). Las curvas de titulación fueron graficadas como fracción reducida versus E_h y el potencial de reducción estándar a pH 7,5 ($E_{m7,5}$) de cada proteína fue determinado mediante regresión no lineal de los datos obtenidos según el modelo logístico del programa Origin™ 7.0.

3.7.6. Espectroscopia UV-visible.

Espectros UV-visible de *Eh*TRXR y *Pt*GR fueron determinados utilizando el espectrofotómetro Lambda 20 UV-Vis (Perkin Elmer), a 25 °C. Los ensayos consistían en: 1) 0,6-1,2 mg ml⁻¹ de *Eh*TRXR en fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; o 2) 0,05 mg ml⁻¹ de *Pt*GR en TRIS-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 1 mM. Cada solución base fue utilizada como referencia para las mediciones.

3.7.7. Estequiometría de la interacción *Tc*TXNI/*Tc*PMSR.

La generación de intermediarios covalentes se realizó por incubación de *Tc*PMSR10 o *Tc*PMSR180 5 μM ; *Tc*TXNIC43S 10 μM y L-MetSO 30 mM por 1 h a 37 °C. Finalizado este tiempo, se reveló la interacción mediante SDS-PAGE no reductor (ver 3.5.1). Los controles negativos se realizaron por incubación de las proteínas en forma individual con L-MetSO o DTT, ambos a concentración 10 mM.

3.8. Microscopía.

Todos los ensayos de microscopía se realizaron en el laboratorio del Dr. Hugo Luján (INIMEC, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina).

3.8.1. Inmunolocalización de las proteínas en estudio en *E. histolytica* y *T. cruzi*.

Los cultivos de trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS o de epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener fueron cosechados por centrifugación a 500 g a temperatura ambiente. El paquete celular se lavó dos veces con solución PBS (KH_2PO_4 2mM; Na_2HPO_4 10 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,4) de forma tal de remover los componentes residuales del medio. Las células fueron fijadas con una solución de *p*-formaldehído al 4% (v/v) y permeabilizadas por 1 h a temperatura ambiente en una solución de PBS, Triton X-100 0,05% (v/v) y BSA al 3% (p/v). Posteriormente, los parásitos fueron incubados por 1 h a 37 °C con anticuerpos policlonales de conejo contra las proteínas de interés en una dilución 1/100 en PBS, Triton X-100 0,01% (v/v) y BSA 1% (p/v), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ICN Biomedicals), en dilución final 1/1000 por 1 h a 37 °C. La tinción nuclear se realizó por el agregado de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia CX31 (Olympus).

3.8.2. Microscopía confocal.

Para la realización de este estudio, las células de *E. histolytica* o *T. cruzi* fueron tratadas como se describió en el punto 3.8.1. Las imágenes confocales fueron colectadas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM5 Pascal *laser-scanning* equipado con un láser de argón/helio/neón y un objetivo de aceite de inmersión de 100x (apertura numérica de 1,4) (Zeiss Plan-Apochromat). Entre 20 a 35 secciones confocales de 0,5 μm fueron tomadas paralelas al cubreobjetos (secciones z). Las imágenes fueron adquiridas utilizando una cámara acoplada al dispositivo (Zeiss) y procesadas con LSM Image J software. Deconvolución 3D fue realizada utilizando el programa Autodeblur v9.3. Las intensidades máximas de 5 a 7 secciones z fueron proyectadas en imágenes que representan entre 3 a 4 μm de las secciones z totales.

3.9. Sobreexpresión de TcPMSR en epimastigotes de *T. cruzi*.

3.9.1. Construcción de vectores recombinantes.

El gen codificante para TcPMSR10 fue subclonado en el plásmido pTEX (Kelly y col., 1992) entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III para generar la construcción recombinante

[pTEX/TcPMSR]. Por otro lado, para control de transformación y de selección se generó la construcción [pTEX/GFP] por subclonado del gen codificante para GFP en pTEX entre los sitios *EcoRI* y *XhoI*. El gen codificante para GFP se obtuvo del plásmido pNUS-GFP (Tetaud y col., 2002).

3.9.2. Transformación de *T. cruzi*.

Los epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener, crecidos en fase logarítmica, fueron cosechados por centrifugación a 500 g a 4 °C, lavados y resuspendidos en solución de electroporación fría (sacarosa 272 mM y fosfato de sodio 7 mM pH 7,2) a densidad celular final de 10^8 cel ml⁻¹. Posteriormente, las muestras se incubaron en hielo en presencia de 50 µg de ADN plasmídico circular ([pTEX], o [pTEX/GFP], o [pTEX/TcPMSR]) por 15 min. Finalizada la incubación, los epimastigotes fueron electroporados utilizando el electroporador Hybaid Cellject Duo (Thermo Scientific), aplicando 10 pulsos de 200 V (450 µF y resistencia infinita) por cubeta (2 mm). Luego de la electroporación, se agregaron $2 \cdot 10^7$ células a 1 ml de medio LIT suplementado con hemina 20 µg ml⁻¹ y suero fetal bovino al 10% y se incubó a 28 °C por 18 h. A continuación, se adicionaron 9 ml de medio LIT suplementado con hemina 20 µg ml⁻¹ y suero fetal bovino al 10% en presencia del aminoglucósido G418 (Invitrogen) a concentración final de 100 µg ml⁻¹. A partir de aquí, las células fueron subcultivadas 1:3 por 3 días y luego 1:10 en presencia de G418. Los transformantes se seleccionan gradualmente mediante el aumento en la concentración del antibiótico hasta llegar a una concentración final de 500 µg.ml⁻¹ a las cuatro semanas. Esto se corroboró observando un aumento en el número de parásitos fluorescentes (transformados con la construcción [pTEX/GFP]) a través de los sucesivos días de cultivo. Las células de *T. cruzi* transformadas fueron mantenidas por pasajes sucesivos en medio LIT suplementado con hemina 20 µg ml⁻¹ y suero fetal bovino al 10% en presencia de G418 500 µg.ml⁻¹ a 28 °C.

3.9.3. Ensayos de sensibilidad al estrés oxidativo.

Los epimastigotes de *T. cruzi* recombinantes, crecidos en fase logarítmica, se inocularon a densidad celular de 10^6 cel ml⁻¹ en placas multipocillo con 1 ml de medio LIT suplementado con hemina 20 µg ml⁻¹, suero fetal bovino al 10%, G418 500 µg.ml⁻¹ y

diferentes concentraciones de H₂O₂. Luego de dos días de cultivo a 28 °C, la densidad celular se determinó por recuento en cámara de Neubauer. La concentración que inhibe el 50% del crecimiento de los parásitos (IC₅₀) se determinó luego de aplicar regresión no lineal a los datos obtenidos, utilizando el programa Origin™ 7.0

3.10. Modelado molecular.

Los estudios estructurales de las proteínas en estudio fueron generados utilizando modelado por homología mediante el programa Modeller v9.4 (Andrej Sali 2008), empleando algoritmos de optimización de estructura. Los alineamientos de secuencias se realizaron mediante el algoritmo Clustalx, utilizando el programa Bioedit v7.0.8 (Ibis Bioscience 2007). Las estructuras generadas fueron evaluadas empleando el programa *on-line* Verify 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) (Bowie y col., 1991; Luthy y col., 1992; Eisenberg y col., 1997), y la visualización se realizó utilizando el programa Deep view/Swiss PDB viewer v4.0 (www.expasy.org/spdbv). En la tabla 3.5 se presentan los templados utilizados para la generación de los modelos de las proteínas en estudio.

Incógnita	Templado	PDB	Valor E
	TRXR de <i>Arabidopsis thaliana</i>	1VCD	1 · 10 ⁻¹⁰¹
<i>Eh</i> TRXR	TRXR de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2A87	3 · 10 ⁻⁷⁴
	TRXR de <i>Escherichia coli</i>	1F6M	2 · 10 ⁻⁶⁵
<i>Eh</i> TRX6	TRX 3 mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2OE0	3 · 10 ⁻²⁵
<i>Eh</i> TRX8	TRX 1 de <i>Drosophila melanogaster</i>	1XWA	8 · 10 ⁻²¹
<i>Eh</i> TRX41	TRX 1 humana	1ERT	2 · 10 ⁻²⁰
	MsrA plastídica de <i>Populus trichocarpa</i>	2J89	3 · 10 ⁻²⁷
<i>Tc</i> PMSR10	MsrA de <i>Bos taurus</i>	1FVG	2 · 10 ⁻²⁵
	MsrA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1NWA	4 · 10 ⁻²⁴
	MsrA plastídica de <i>Populus trichocarpa</i>	2J89	1 · 10 ⁻²⁶
<i>Tc</i> PMSR180	MsrA de <i>Bos taurus</i>	1FVG	1 · 10 ⁻²⁵
	MsrA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1NWA	2 · 10 ⁻²⁴

Tabla 3.5: Templados utilizados en la construcción de los modelos de las proteínas en estudio. Las estructuras tridimensionales de los templados fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. CAPÍTULO 1: Caracterización del sistema tiorredoxina en *Entamoeba histolytica*.

4.1.1. Aislamiento y caracterización de los genes codificantes para las proteínas componentes del sistema TRX de *Entamoeba histolytica*.

La identificación de secuencias nucleotídicas que codifican para una posible TRXR (CDS 23.m00296), una 2CysPrx típica (CDS 298.m00058) y cuatro isoformas de TRX (TRX6, CDS 6.m00418; TRX8, CDS 8.m00422, TRX41, CDS 41.m00230 y TRX111, CDS 111.m00121) en la base de datos del proyecto genoma de *E. histolytica* (Wellcome Trust, Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit, www.genedb.org), permitió realizar el clonado molecular de los genes que contenían los ORF correspondientes. Estos genes fueron amplificados a partir de ADN genómico mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos (ver puntos 3.7.3 y 3.7.4), clonados en el vector pGEM-T *Easy* y confirmados por secuenciación.

El gen *ehtrxr* de 945 bp codifica para una proteína (*Eh*TRXR) de 314 aminoácidos y una masa molecular de 34 kDa. Esta proteína posee una masa molecular similar a otros miembros de la familia de TRXR de bajo peso molecular (L-TRXR), características de bacterias, plantas y eucariotas inferiores. En la Fig. 4.1.1 se presenta un alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de *Eh*TRXR con otras L-TRXR en la que podemos observar una alta identidad en la secuencia aminoacídica, pudiéndose determinar la presencia de tres sitios importantes para la funcionalidad de estas enzimas: un sitio de unión a flavina (FAD o FMN), un sitio de unión a NADPH y un motivo redox activo CXXC (véase Fig. 4.1.1) (Williams y col., 2000).

Por otro lado, la proteína *Eh*2CysPrx es una peroxirredoxina de dos cisteínas típica, codificada por el gen *eh2cysprx* de 702 bp. Esta proteína ha sido reportada por varios autores con el nombre de *Ehp*29 o TSA como uno de los antígenos superficiales más importantes en *E. histolytica* (Choi y col., 2005). Además, como ya se ha mencionado en el punto 1.9.1, es una de las proteínas más abundantes en las cepas resistentes a nitroimidazol, confiriendo resistencia contra el estrés oxidativo (Wassmann y col., 1999; Wassmann y col., 2000). Esta proteína posee una masa molecular de 27 kDa y está

constituida por 233 aminoácidos. Al realizarse un análisis de la secuencia de aminoácidos de esta proteína, se puede observar la presencia de los dos motivos redox activos (VCP) característicos de las 2CysPrx típicas (véase Fig. 4.1.2). Alternativamente, a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos, se puede observar que esta Prx posee un extremo N-terminal más largo y rico en residuos de cisteína. La función de este extremo no ha sido resuelta todavía, pero se ha mostrado que variantes truncas en este extremo N-terminal carecen de actividad peroxidasa (Bruchhaus y col., 1997).

Finalmente, cuatro isoformas de TRX “clásicas” fueron identificadas en la base de datos del proyecto genoma de *E. histolytica*. Estas TRX están codificados por cuatro genes diferentes: *EhTRX6* por el gen *ehtrx6* de 345 bp; *EhTRX8* por el gen *ehtrx8* de 312 bp; *EhTRX41* está codificada por el gen *ehtrx41* de 318 bp y *EhTRX111* por el gen *ehtrx111* de 435 bp. Las masas moleculares predichas de estas TRX varían entre 12 y 16 kDa. Un alineamiento de secuencias aminoacídicas de éstas TRX con otras TRX de otras fuentes, reveló la existencia del motivo catalítico WCGPC, típico de estas proteínas (ver Fig. 4.1.3). También pueden identificarse otros residuos importantes para la modulación de la actividad catalítica y correcto plegamiento como ser: Asp⁶², Pro⁷⁷ y Gly⁸⁵ (la numeración corresponde a *EcTRX*, ver Fig. 4.1.3). Particularmente, la proteína *EhTRX111* presentó una longitud mayor a la comúnmente encontrada en este grupo de proteínas. Un análisis de las secuencias aminoacídicas utilizando servidores *on-line* en busca de péptidos señal o dominios transmembranas, SignalP 3.0 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> y SOSUI System, <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>, respectivamente reveló la ausencia de péptidos señal en las cuatro isoformas de TRX. Por otro lado, se pudo determinar *in-silico* la existencia de un dominio de transmembrana C-terminal (de 18 aminoácidos) en la *EhTRX111*, lo cual explicaría su mayor tamaño.

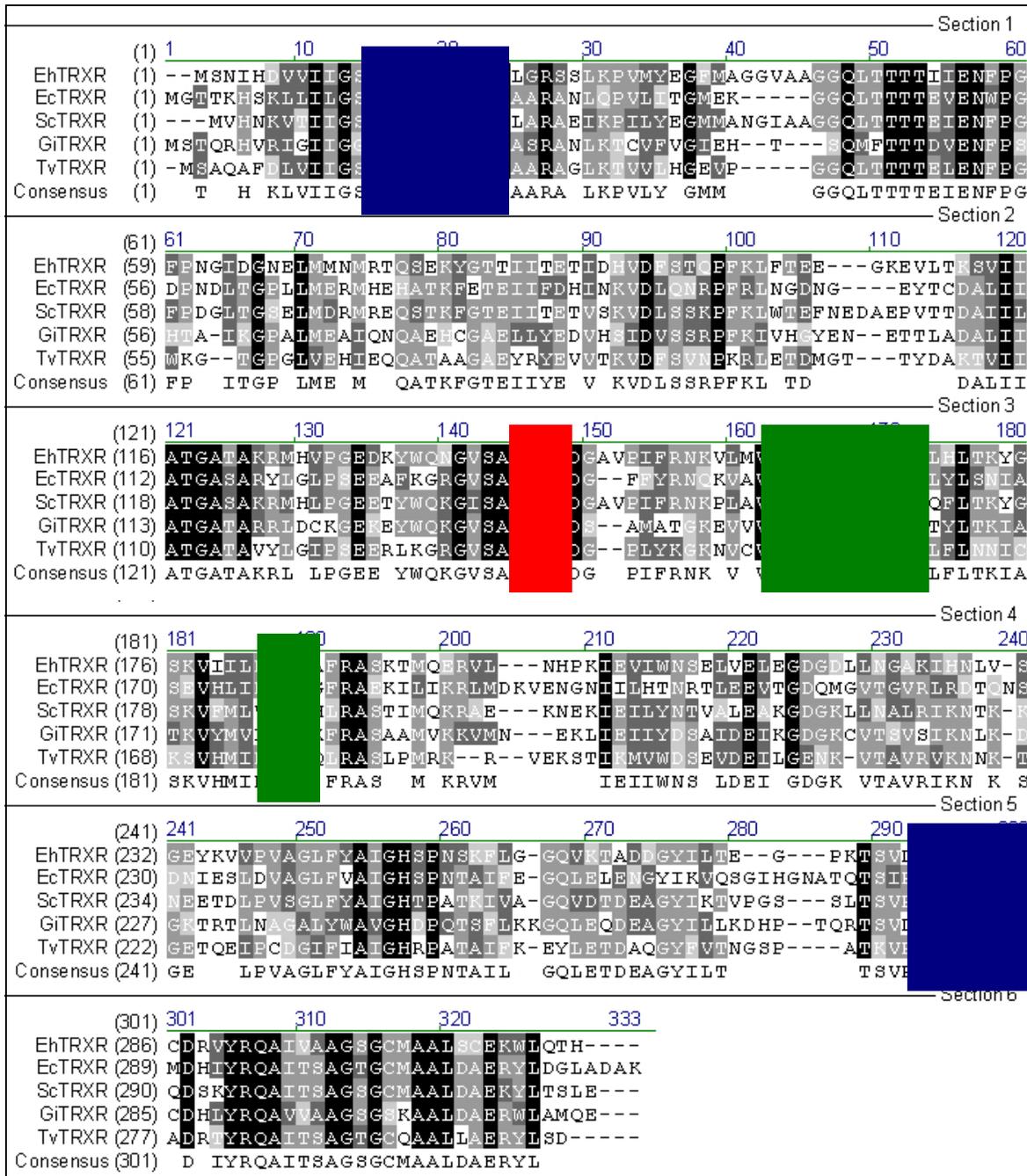


Fig. 4.1.1: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *EhTRXR* (este estudio) con homólogos de *E. coli* (NCBI - BAA35613), *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI - NP010640), *Giardia intestinalis* (NCBI - CAD47839) y *Trichomonas vaginalis* (NCBI - CAD47837). Recuadrado se muestra en rojo el motivo redox activo CXXC, en verde motivos de unión a NADPH y en azul los motivos de unión a FAD. El alineamiento se realizó utilizando el programa Vector NTI 9.0.

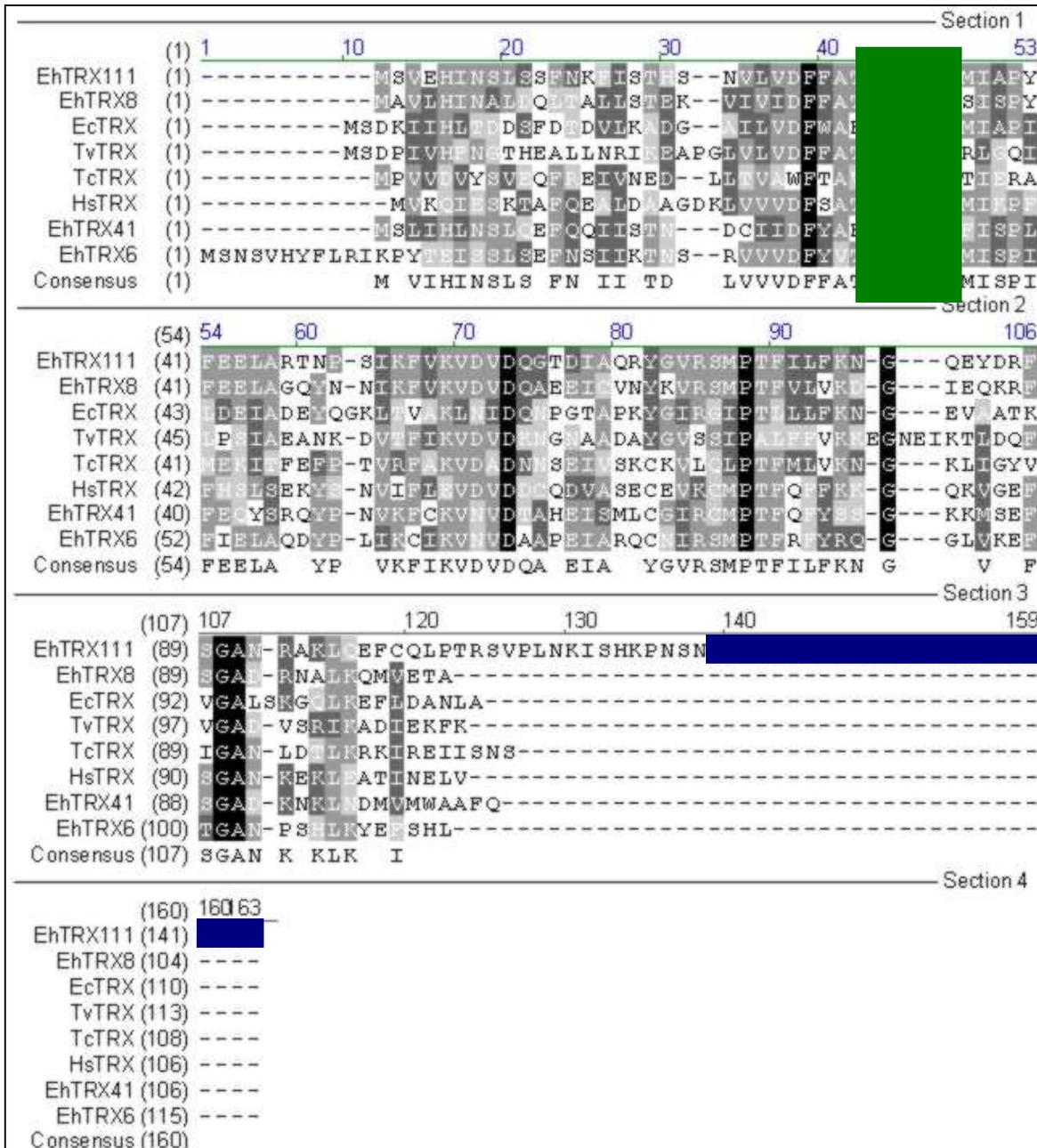


Fig. 4.1.2: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de EhTRX (este estudio) con TRX de *E. coli* (NCBI - M54881), *Trichomonas vaginalis* (NCBI - CAD47836), *T. cruzi* (NCBI - AAT9533) y *Homo sapiens* (NCBI - JH0568) El recuadrado verde muestra el motivo redox activo CXXC. El trazo azul indica el dominio de transmembrana C-terminal de EhTRX111. El alineamiento se realizó utilizando el programa Vector NTI 9.0.

4.1.2. Expresión y purificación de los componentes del sistema TRX de *E. histolytica*.

Los genes codificantes para *EhTRXR*, *EhTRX6*, *EhTRX8*, *EhTRX41*, *EhTRX111* y *Eh2CysPrx* fueron subclonados en el vector de expresión pRSET-A y expresadas en células de *E. coli* BL21 (DE3). Las proteínas expresadas de esta forma se obtuvieron como proteínas de fusión a una cola de poli-His en el extremo N-terminal, adicionando aproximadamente 3 kDa más a la masa de cada proteína. La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes fue llevada a cabo como se describe en materiales y métodos (ver punto 3.6.1) de forma tal de optimizar la expresión de éstas de forma soluble. No obstante, tanto *EhTRX6* como *EhTRX111* se expresaron mayoritariamente de forma insoluble (Fig. 4.1.4). Una alternativa para mejorar los rendimientos en la fracción soluble fue la coexpresión de chaperonas moleculares utilizando el plásmido pG-KJE8 (Fig. 4.1.4, calles 5 y 6). Se realizaron diferentes ensayos de expresión variando condiciones de inducción, pudiéndose mejorar esta situación sólo para *EhTRX6*. La obtención de *EhTRX111* de forma soluble se dificulta posiblemente debido a la gran extensión C-terminal, predicha como dominio de transmembrana, razón por la cual se continuará su caracterización en el futuro y fuera de los contenidos de este trabajo de tesis.

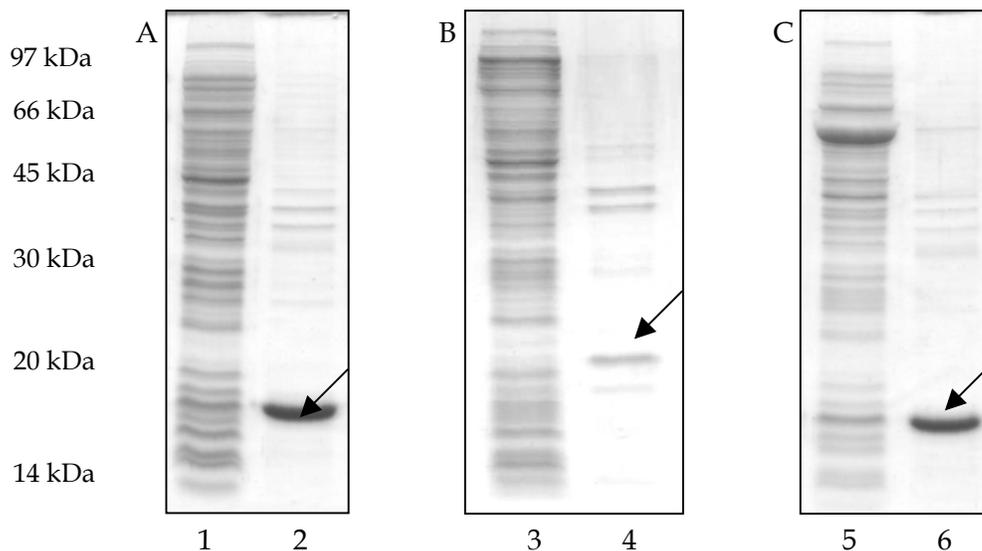


Fig. 4.1.4: SDS-PAGE de extractos obtenidos de A) *E. coli* BL21 (DE3) [pRSET-A/*EhTRX6*], calle 1) fracción soluble, calle 2) fracción insoluble; B) *E. coli* BL21 (DE3) [pRSET-A/*EhTRX111*], calle 3) fracción soluble, calle 4) fracción insoluble y C) *E. coli* BL21 (DE3) [pRSET-A/*EhTRX6*] cotransformada con [pG-KJE8] calle 5) fracción soluble, calle 6) fracción insoluble.

La purificación de las proteínas recombinantes en forma nativa fue realizada mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) utilizando una resina de Co^{2+} -IDA-Agarosa (punto 3.6.3) con lo cual se obtuvo un alto grado de pureza (mayor al 90%) evaluado por SDS-PAGE con tinción con Coomassie blue (Fig. 4.1.5).

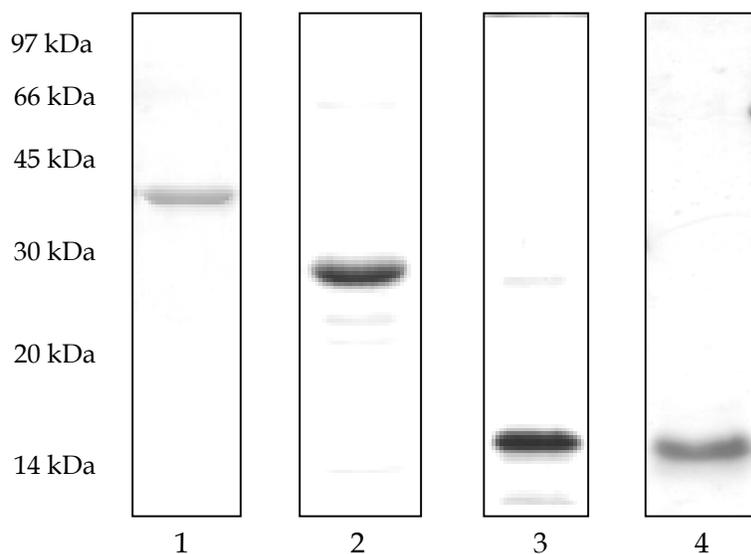


Fig. 4.1.5: Análisis electroforético de las proteínas recombinantes purificadas por IMAC.
1) *EhTRXR*; 2) *Eh2CysPrx*;
3) *EhTRX41*; 4) *EhTRX8*.

Las proteínas purificadas se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin pérdida de actividad biológica por un período no menor a ocho meses. Una situación diferente fue la que presentó *EhTRX6*, que, expresada como proteína de fusión a poli-His, mostró ser completamente inestable y precipitaba a los pocos minutos luego de eluirse de la columna de afinidad. Con el fin de aumentar la estabilidad de esta proteína se evaluaron los efectos de diferentes aditivos (glicerol, EDTA, DTT y NaCl) sobre las fracciones purificadas, pero ninguno fue efectivo para resolver el problema. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió expresar a *EhTRX6* como proteína de fusión a MBP, para lo cual se subclonó el gen que la codifica en el vector de expresión pMAL-C2. Con la construcción recombinante se transformaron células de *E. coli* JM109 y se realizó la inducción de la expresión de la proteína recombinante en idénticas condiciones, obteniéndose la proteína de forma soluble. La proteína de fusión MBP-*EhTRX6* se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa-agarosa, obteniéndose altos rendimientos con gran pureza (Fig. 4.1.6, calle 1). Contrariamente a la situación anterior, la proteína de fusión era estable a las condiciones de purificación y almacenamiento. Con el objetivo de obtener la *EhTRX6* liberada de la MBP, se realizó la digestión proteolítica de la proteína de fusión utilizando el factor Xa. Dado que era fundamental mantener la actividad biológica de la

TRX, la reacción se evaluó a dos temperaturas 4 y 37 °C, a distintos tiempos. La evolución de la reacción se llevó a cabo por SDS-PAGE, observándose muy bajos rendimientos en el corte (Fig. 4.1.6, calle 2 a 7) para lo requerido en los ensayos futuros, por lo que se decidió realizar los estudios siguientes utilizando la proteína de fusión MBP-*Eh*TRX6 sin digerir.

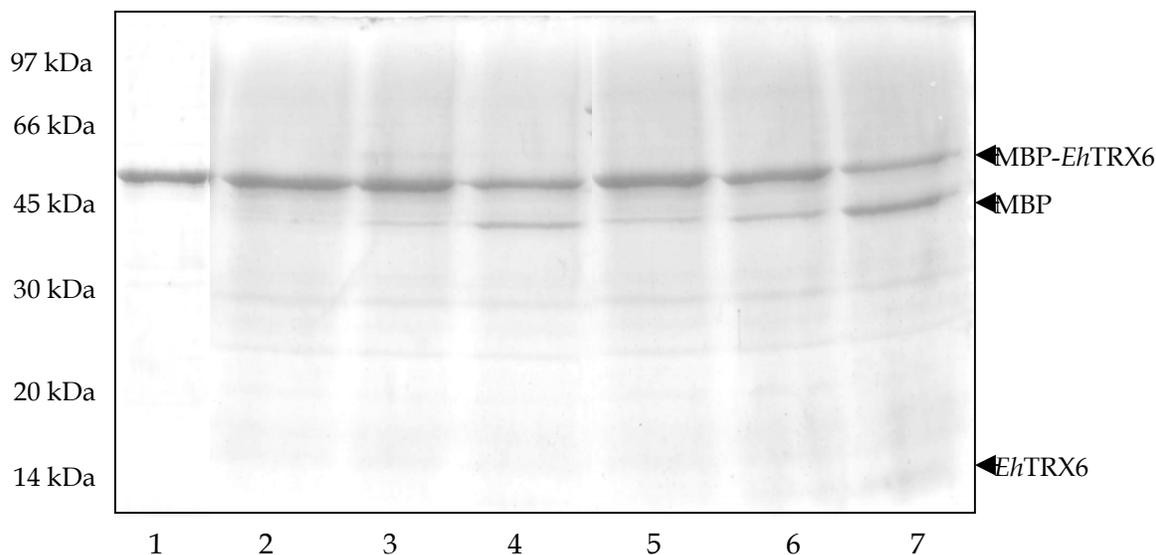


Fig. 4.1.6: SDS-PAGE de ensayo de digestión proteolítica de MBP-*Eh*TRX6. Calle 1) proteína purificada sin tratar; calle 2) proteína tratada a 4 °C durante 1 h; calle 3) proteína tratada a 4 °C durante 5 h; calle 4) proteína tratada a 4 °C durante 16 h; calle 5) proteína tratada a 37 °C durante 1 h; calle 6) proteína tratada a 37 °C durante 5 h y calle 7) proteína tratada a 37 °C durante 16 h.

Los rendimientos típicos obtenidos, en mg/l de cultivo, fueron aproximadamente de 60 para *Eh*TRXR; 17 para *Eh*TRX41; 7 para *Eh*TRX8; 46 para *Eh*2CysPrx y 20 para MBP-*Eh*TRX6.

4.1.3. Caracterización funcional del sistema TRX de *Entamoeba histolytica*.

4.1.3.1. Evaluación de la actividad biológica de las *Eh*TRX.

La actividad redox de las TRX recombinantes (MBP-*Eh*TRX6, *Eh*TRX8 y *Eh*TRX41) de *E. histolytica* fue evaluada mediante el ensayo de reducción de la insulina. Este método se basa en la capacidad de las TRX, previamente reducidas con DTT, de reducir los puentes disulfuros de la insulina bovina, resultando en la precipitación de la cadena β de ésta y por ende un aumento en la turbidez del medio. Como se muestra en la Fig. 4.1.7, en ausencia de TRX no hubo incremento en la turbidez dentro de los primeros

45 min de reacción, mientras que en presencia de las proteínas purificadas la reducción de insulina fue detectable luego de 5 min de incubación, observándose que la velocidad de reducción de insulina es dependiente de la cantidad de TRX presente en el medio de reacción. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de reducción de insulina entre la *Eh*TRX8 y la *Eh*TRX41; mientras que con MBP-*Eh*TRX6 fue necesario esperar cinco veces más de tiempo para comenzar a observar incremento en la turbidez.

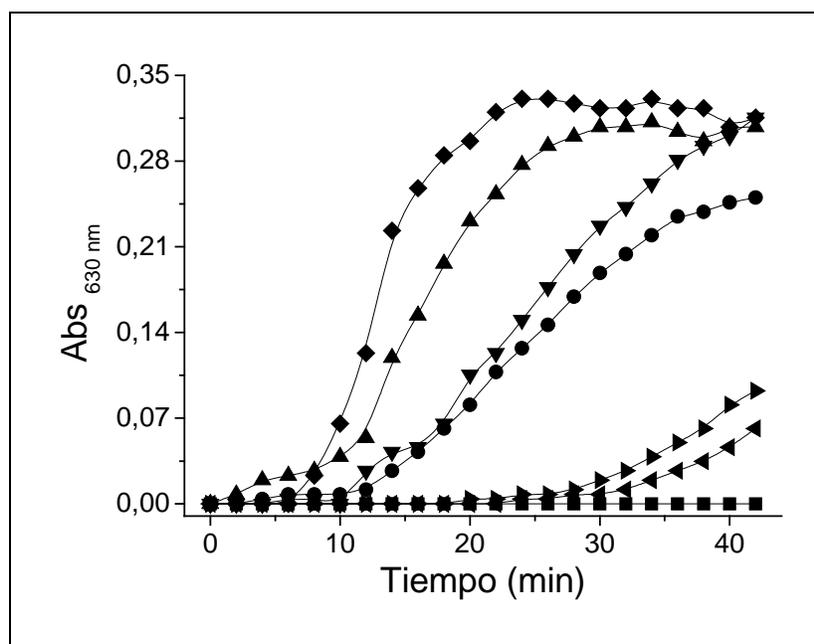


Fig. 4.1.7: Reducción de insulina bovina por *Eh*TRX recombinantes. La reacción fue realizada a pH 7,0 y 30 °C en presencia de diferentes concentraciones de *Eh*TRX: (!) sin *Eh*TRX; (.) *Eh*TRX8 1,5 µM; (7) *Eh*TRX8 3 µM; (B) *Eh*TRX41 1,5 µM; (Λ) *Eh*TRX41 3 µM; (◀) MBP-*Eh*TRX6 1,5 µM y (▶) MBP- *Eh*TRX6 3 µM.

4.1.3.2. Características físicas de *Eh*TRXR.

Un hecho interesante fue que las soluciones concentradas de *Eh*TRXR presentaban un intenso color amarillo en ausencia de algún agente reductor. Los espectros de absorción UV-Vis de esta proteína revelaron tres picos importantes, uno a 270 nm, a 380 nm y el otro a 453 nm (ver Fig. 4.1.8) siendo los dos últimos característicos de las flavoproteínas (proteínas con FAD o FMN como grupo prostético). Bajo condiciones aeróbicas, el pico a 453 nm disminuyó luego de la adición de NADPH 100 µM. Aproximadamente 1 min luego de la adición de la coenzima reducida el pico comenzó a

aumentar hacia valores iniciales, lo que sugiere un efecto de autooxidación de la enzima en presencia de O_2 (Fig. 4.1.9).

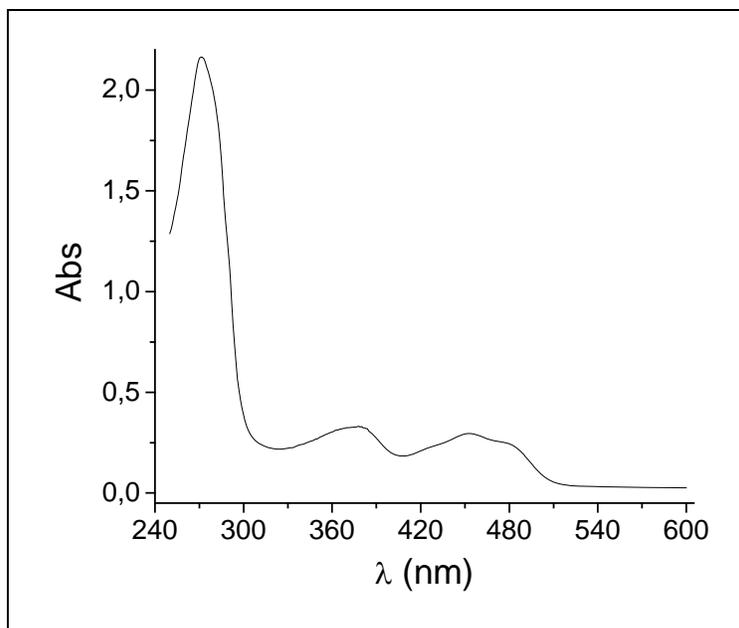


Fig. 4.1.8: Espectro de absorción de *EhTRXR* purificada. El ensayo se realizó a 25 °C a pH 7,0 con *EhTRXR* a concentración final de 1,23 mg ml⁻¹.

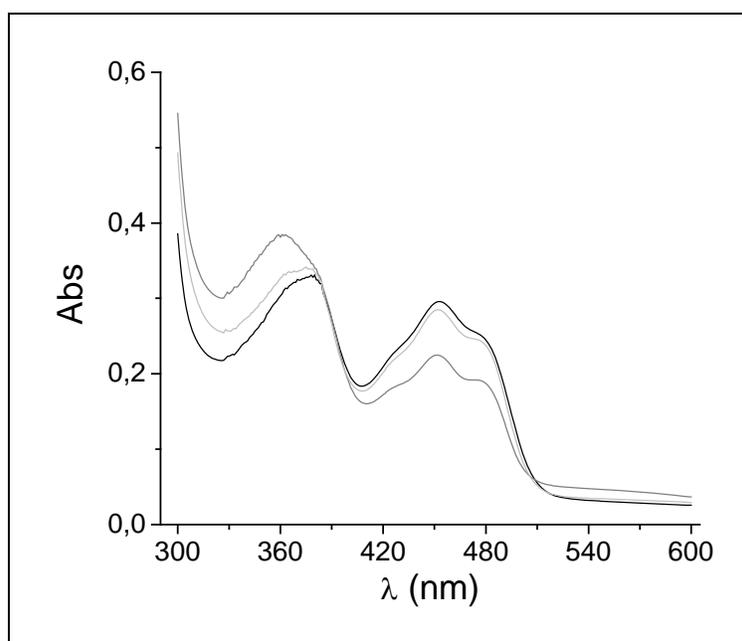


Fig. 4.1.9: Espectro de absorción de *EhTRXR* purificada. El ensayo se realizó a 25 °C a pH 7,0 con *EhTRXR* a concentración final de 1,23 mg ml⁻¹. Trazo negro: *EhTRXR* sin tratamiento, trazo gris: *EhTRXR* + NADPH 100 μM y trazo gris claro: *EhTRXR* 1 min después de la adición de NADPH.

La desnaturalización de *Eh*TRXR por calentamiento a 100 °C resultó en la liberación de la flavina, lo que indicó que el grupo prostético no se encontraba unido covalentemente a la apoproteína. El espectro de absorción de la fracción flavina libre, indicó la presencia de FAD como grupo prostético con una relación, aproximadamente, de 1 mol de FAD cada 1 mol de polipéptido.

Al realizar experimentos de SDS-PAGE con *Eh*TRXR, se observó que la proteína, en ausencia de agente reductor, migró como una banda mayoritaria de masa molecular de 64 kDa (Fig. 4.1.10). Preincubaciones de la proteína realizadas en presencia de diamida 10 mM o NADPH 200 μ M o NADPH 200 μ M + DTNB 5 mM no presentaron modificaciones en el perfil de migración de ésta, observándose la banda mayoritaria de 64 kDa, de forma similar a lo obtenido con la proteína sin tratamiento (Fig. 4.1.10). Contrariamente, cuando la proteína fue preincubada con DTT 100 mM, ésta migró como una única banda de aproximadamente 36 kDa, resultado similar a lo expuesto en la Fig. 4.1.5-calle 1.

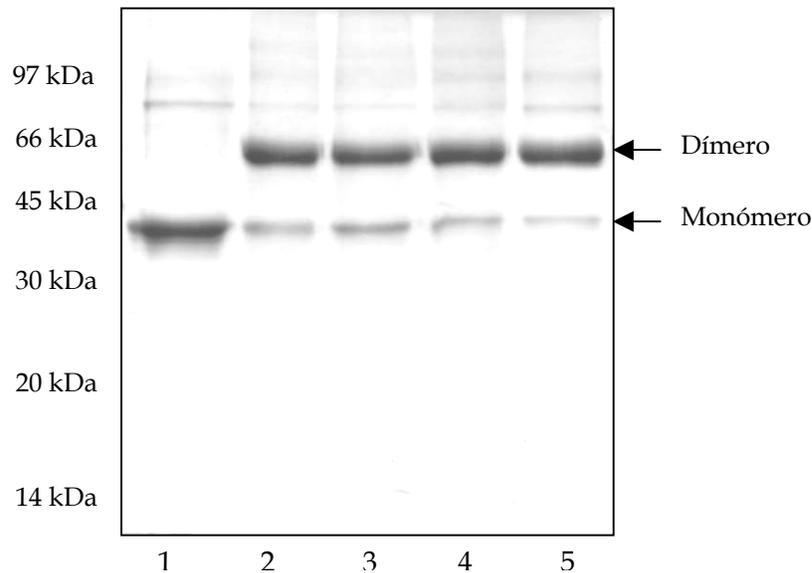


Fig. 4.1.10: SDS-PAGE no reductor al 12 % de *Eh*TRXR. 1) Proteína preincubada con DTT 100 mM; 2) Proteína sin aditivos; 3) Proteína preincubada con diamida 10 mM; 4) Proteína preincubada con NADPH 200 μ M; 5) Proteína preincubada con NADPH 200 μ M + DTNB 5 mM. Todas las preincubaciones se realizaron por 10 min a 37 °C a pH 7,0.

Con el fin de determinar la masa molecular en estado nativo de *Eh*TRXR, se realizaron corridas en PAGE nativos (en presencia y ausencia de DTT 10 mM) y a partir de la movilidad electroforética a distintos porcentajes de gel se determinó la masa molecular

mediante el método de Ferguson (ver punto 3.7.1). Como se observa en la Fig. 4.1.11-A-B, los resultados obtenidos arrojaron una masa molecular nativa de aproximadamente 78 kDa, no encontrándose diferencias ante la presencia o no de un agente reductor (DTT).

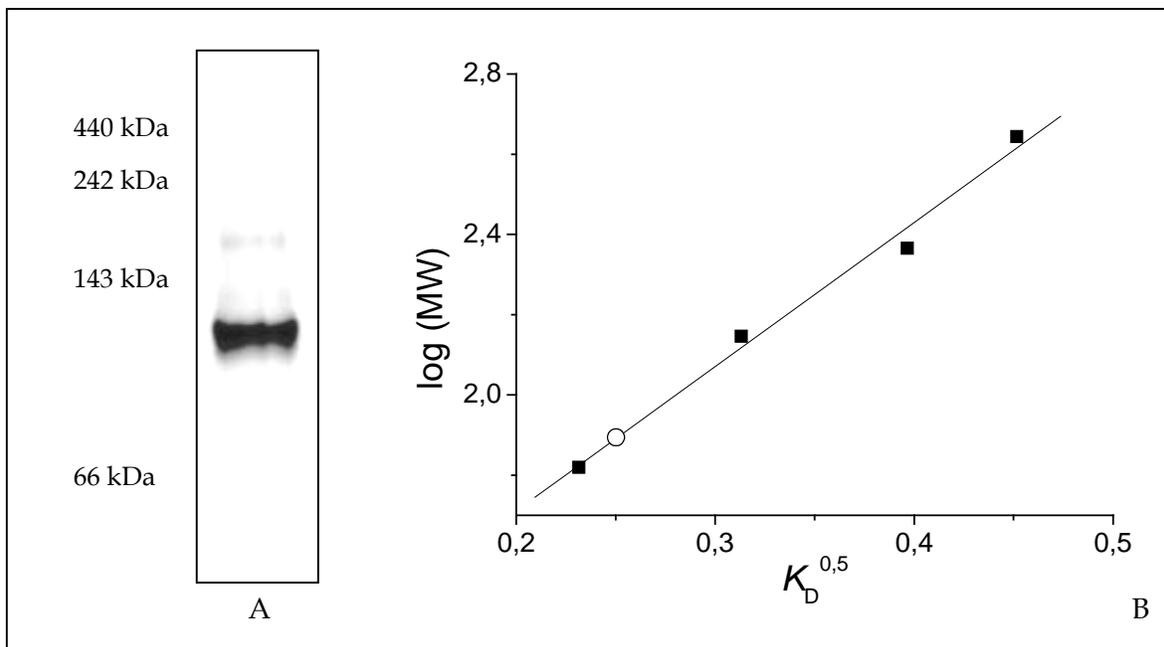
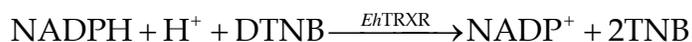


Fig. 4.1.11: Determinación de la masa molecular nativa de *EhTRXR*. A) La proteína fue corrida en PAGE nativo al 6% (p/v) y teñida con Coomassie blue. B) El gráfico de Ferguson fue generado por graficar la raíz cuadrada del coeficiente de retardo en función del Log de la masa molecular de varias proteínas estándares (!). El coeficiente de retardo calculado de *EhTRXR* fue 0,063 (O), el cual correlacionó con una masa molecular estimada de 78 kDa.

Los valores de masa molecular obtenidos tanto en el SDS-PAGE no reductor como en el PAGE nativo son similares, concluyéndose que *EhTRXR* es una proteína homodimérica, en donde las dos subunidades estarían unidas por puentes disulfuros. Más aún, como se mencionó anteriormente, cada subunidad contiene una molécula de FAD como grupo prostético unido no covalentemente. Estas características encontradas son similares a las reportadas para la gran mayoría de las TRXR (Hirt y col., 2002).

4.1.3.3. Caracterización de *EhTRXR* como disulfuro reductasa.

La funcionalidad de *EhTRXR* como disulfuro reductasa fue evaluada mediante la determinación de la capacidad de reducción del sustrato disulfuro modelo para TRXR, el ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB), a expensas de NADPH como dador de equivalentes de reducción, acorde a la siguiente reacción:



Como se muestra en la Fig. 4.1.12, la velocidad de reducción de DTNB es proporcional a la concentración de *EhTRXR* ensayada.

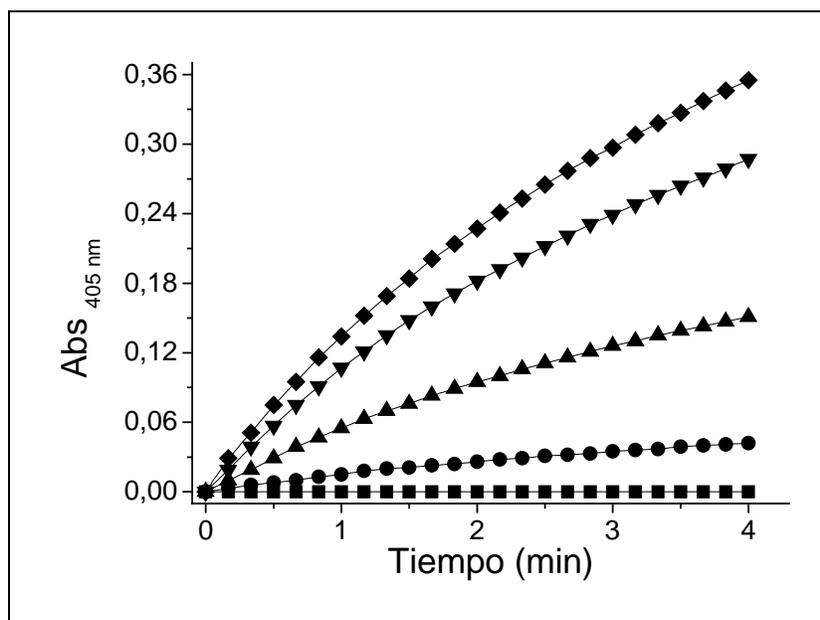
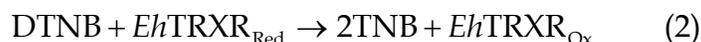
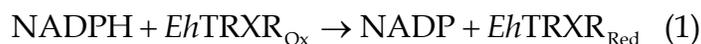


Fig. 4.1.12: Actividad DTNB reductasa de *EhTRXR*. Las reacciones se realizaron a pH 7,0 y 30 °C en presencia de NADPH 300 μM y DTNB 5 mM. Curvas de progresión de generación de TNB en función del tiempo a diferentes concentraciones de *EhTRXR*: (●) sin *EhTRXR*; (○) *EhTRXR* 0,13 μM; (◐) *EhTRXR* 0,33 μM; (◑) *EhTRXR* 0,53 μM y (▲) *EhTRXR* 0,66 μM.

Estudios cinéticos en estado estacionario, demostraron que la reacción de reducción de DTNB dependiente de NADPH catalizada por *EhTRXR* sigue un mecanismo “ping-pong”, este mecanismo es común para este tipo de enzimas (Bironaite y col., 1998; Cenas y col., 2004). Esto se muestra en la Fig. 4.1.13, en donde se presenta un paralelismo en las rectas de los dobles recíprocos. Este mecanismo “ping-pong” o de doble desplazamiento puede ser descrito como una secuencia de reacciones consecutivas:



donde subíndice “Ox” y “Red” corresponden a las especies de la enzima oxidada y reducida, respectivamente. En adición, esta enzima exhibió una cinética de saturación tipo Michaelis-Menten para ambos sustratos (Fig. 4.1.14 A y B).

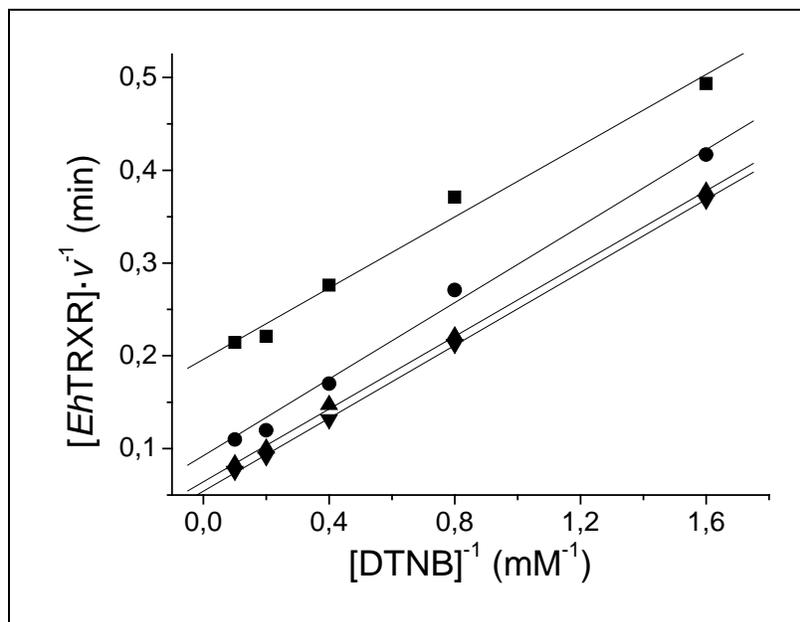


Fig. 4.1.13: Análisis de cinética de estado estacionario de *EhTRXR* para NADPH y DTNB. Las reacciones fueron realizadas a pH 7,0 a 30 °C, empleándose *EhTRXR* 0,1 μ M, DTNB desde 0,1 a 10 mM y diferentes concentraciones de NADPH: (!) 3,3 μ M; (,) 6,7 μ M; (7) 13,4 μ M y (B) 300 μ M.

Los parámetros cinéticos derivados de este análisis son enlistados en la Tabla 4.1.1. Tanto los K_m como las eficiencias catalíticas determinadas para NADPH y DTNB se encuentran dentro de los órdenes reportados para otras TRXR de otras fuentes (Holmgren, 1977; Holmgren, 1979). Se ha evidenciado que *EhTRXR* posee una alta afinidad por la coenzima reducida (NADPH), siendo un factor importante para su funcionalidad bajo condiciones de estrés oxidativo, en donde escasean las fuentes de poder reductor.

Sustrato	K_m (μ M)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
NADPH	1,80	15	$1,40 \cdot 10^5$
DTNB	1100	15	$2,27 \cdot 10^2$

Tabla 4.1.1: Parámetros cinéticos de *EhTRXR* para la reducción de DTNB dependiente de NADPH a 30 °C y pH 7,0.

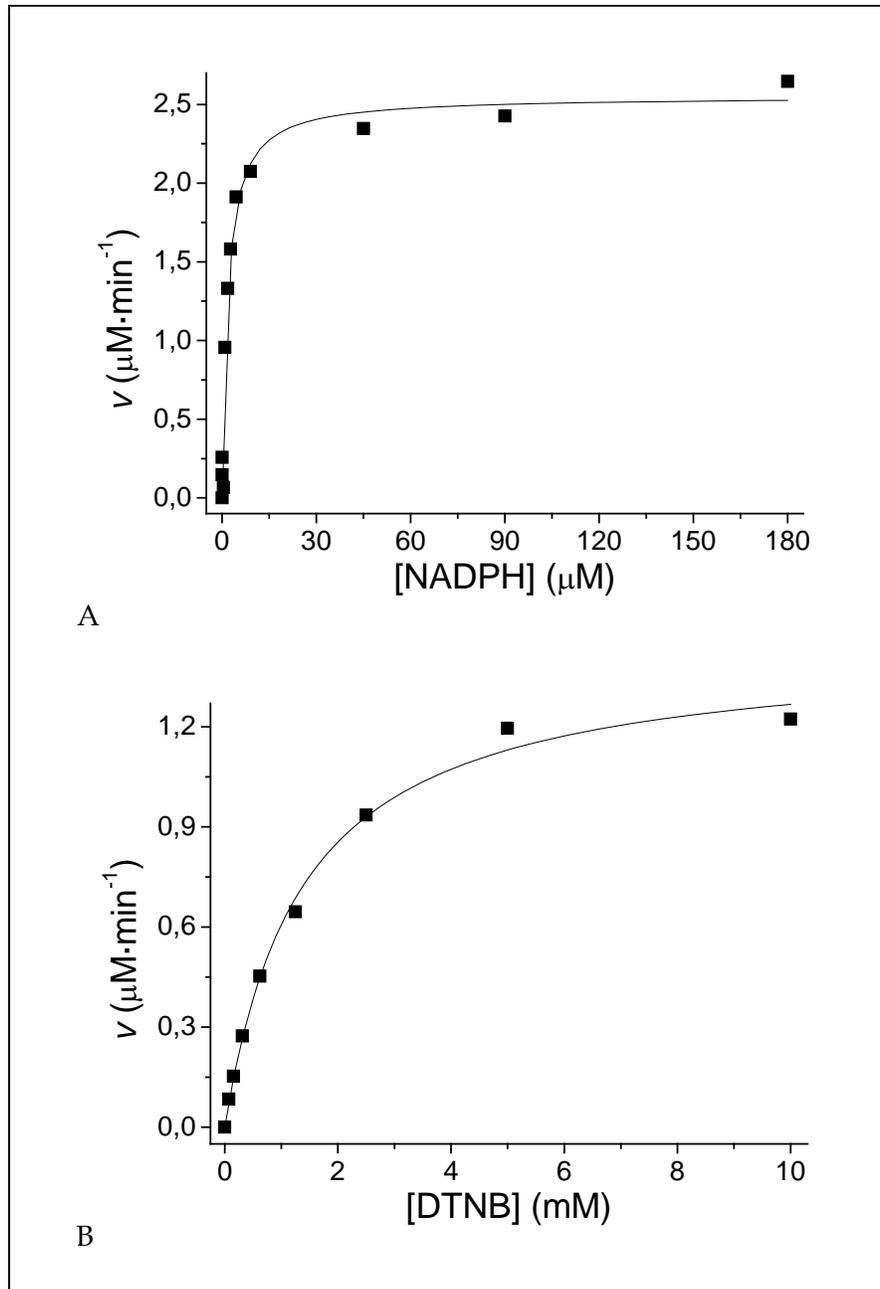


Fig. 4.1.14: Curvas de saturación para *EhTRXR* de A) NADPH, con DTNB 5 mM y B) DTNB, con NADPH 300 μM . Los ensayos se realizaron a pH 7,0 y a 30 °C.

Como parte de la caracterización de esta enzima se ha evaluado su capacidad reductiva con otros sustratos disulfuros de bajo peso molecular: GSSG, TS_2 , cistina y lipoamida mediante un ensayo análogo al anterior en donde se ha reemplazado al DTNB por el disulfuro a investigar, manteniendo constante la concentración de NADPH (a saturación, 200 μM). En la Tabla 4.1.2 se describe el rango de concentraciones ensayado

para cada sustrato. No se ha detectado actividad disulfuro reductasa con ninguno de los sustratos alternativos dentro de los rangos de concentraciones evaluados.

Actividad	Rango de concentraciones ensayado (mM)	Resultado
Glutación reductasa	GSSG [0,03 - 2]	No detectable
Tripanotión reductasa	TS ₂ [0,01 - 0,5]	No detectable
Cistina reductasa	Cistina [0,03 - 2]	No detectable
Lipoamida reductasa	Lipoamida [0,05 - 5]	No detectable

Tabla 4.1.2: Ensayo de actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR con sustratos alternativos, a pH 7,0 y 30 °C.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo informado en la bibliografía, ya que en muy pocos casos la TRXR exhibe un amplio espectro en la especificidad de sustratos. Un caso particular es el que presentan las H-TRXR de mamíferos, las cuales son selenoenzimas, donde diversos reportes han demostrado su capacidad de reducción de lipoamida y GSSG, como moderada eficiencia y una gran diversidad de sustratos no disulfuros (Holmgren, 1977; Holmgren, 1979). En adición, diversos estudios han demostrado una “nula” capacidad de emplear otros sustratos diferentes de TRX por parte de muchas L-TRXR (Arner y col., 1996; Arner y col., 1999; Coombs y col., 2004; Urig y col., 2006).

A modo de evaluar la importancia de los residuos de cisteína (como tioles) en la actividad disulfuro reductasa de la *Eh*TRXR, es que se decidió ensayar la actividad DTNB reductasa en presencia de metales pesados, específicamente Cu²⁺ y Zn²⁺. Se conoce de la bibliografía que los metales pesados inhiben reacciones dependientes de tioles por unirse irreversiblemente a residuos de cisteína, bloqueándolos y modificando su funcionalidad (Osipova y col., 2005; Picaud y col., 2006). Como se muestra en la Fig. 4.1.15 la enzima bajo estudio fue sensible a bajas concentraciones (< 10 µM) de ambos metales pesados, obteniéndose IC₅₀ de 2,5 µM y 3,4 µM para Cu²⁺ y Zn²⁺ respectivamente. Estos resultados refuerzan la participación de un centro activo compuesto por residuos cisteína (probablemente del motivo CAIC) en la actividad disulfuro reductasa de esta enzima.

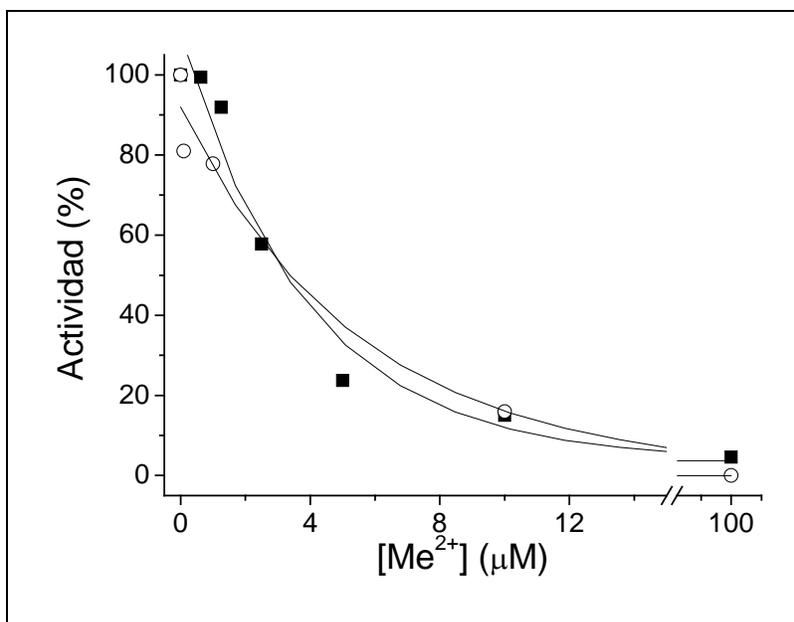


Fig. 4.1.15: Inhibición de actividad DTNB reductasa por metales pesados. El ensayo se realizó a pH 7,0 y 30 °C con NADPH 300 µM; DTNB 5 mM; *Eh*TRXR 0,1 µM y diferentes concentraciones de Cu²⁺ (■) y Zn²⁺ (○).

El siguiente análisis realizado fue examinar el efecto del producto de reacción, NADP⁺, sobre la actividad disulfuro reductasa. En un primer análisis se evaluó la actividad de la enzima en presencia de diferentes concentraciones de NADP⁺, a una concentración de DTNB fija y varias concentraciones de NADPH. Aplicando el tratamiento de Dixon (Butterworth, 1972) a los datos, se determinó que el NADP⁺ actuó como inhibidor competitivo respecto al NADPH (Fig. 4.1.16), con un K_i de 26 µM. En un segundo análisis se evaluó la actividad de la enzima en presencia de diferentes concentraciones de NADP⁺, a una concentración de NADPH fija y varias concentraciones de DTNB. Empleando el mismo tratamiento de los datos se determinó que el NADP⁺ actuó como inhibidor mixto respecto al DTNB (Fig. 4.1.17), con un K_{ic} de 264 µM y un K_{iu} de 2,25 mM. Los perfiles de inhibición por producto (NADP⁺) no concuerdan estrictamente con el mecanismo de reacción de tipo "ping-pong" observado para los sustratos, ya que los datos bibliográficos reportan un perfil inverso para ese tipo de mecanismo. No obstante, los resultados obtenidos sugieren la existencia de dos sitios en la enzima que son diferentes para la unión/reacción del NADPH y DTNB. Esto concuerda con la posibilidad de que la enzima se encuentre entre dos especies (oxidada y reducida) durante el mecanismo de reacción.

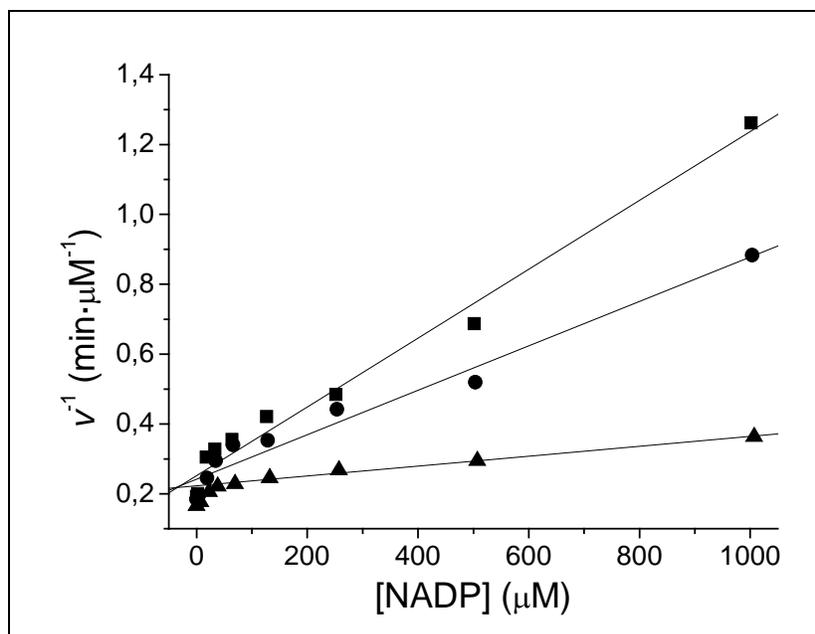


Fig. 4.1.16: Efecto del NADP⁺ sobre la actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR (NADPH variable). El ensayo se realizó a pH 7,0 y 30 °C con DTNB 5 mM y diferentes concentraciones de NADPH: (!) 8,2 μM; (.) 16,4 μM y (7) 32,8 μM.

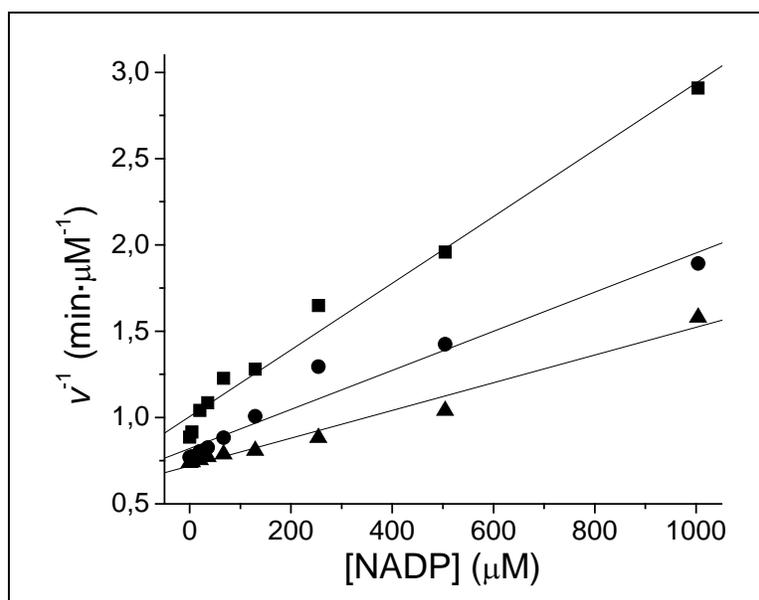


Fig. 4.1.17: Efecto del NADP⁺ sobre la actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR (DTNB variable). El ensayo se realizó a pH 7,0 y 30 °C con NADPH 20 μM y diferentes concentraciones de DTNB: (!) 0,5 mM; (.) 0,75 mM y (7) 1 mM.

4.1.3.4. Estudio de la actividad NADPH oxidasa de *EhTRXR*.

La enzima purificada mostró una actividad de oxidasa importante bajo condiciones aeróbicas, en ausencia de algún sustrato disulfuro. Como se expone en la Fig. 4.1.18, existe un incremento en la velocidad de oxidación de la coenzima a concentraciones crecientes de *EhTRXR*. Adicionalmente, se pudo determinar que en condiciones aerobiosis, *EhTRXR* produce H₂O₂ por reducción parcial del O₂ disuelto en el medio de reacción. Esto se ha verificado mediante valoración del H₂O₂ formado mediante el método de ferritocianato. En la Fig. 4.1.19 se presenta la formación de H₂O₂ por *EhTRXR*. Bajo las condiciones de ensayo (a pH 7,0 y 30 °C) ya sea por medio del seguimiento de la oxidación de NADPH o por la formación de H₂O₂, la enzima presentó una velocidad de recambio de aproximadamente 22 min⁻¹.

Con el fin de investigar si la vía de reducción del oxígeno molecular es dependiente de la vía de reducción de sustratos disulfuros, se realizó un experimento similar al punto anterior en donde se ensayo la actividad NADPH oxidasa en presencia de Cu²⁺ y Zn²⁺. A diferencia de la actividad disulfuro reductasa, la actividad NADPH oxidasa no fue muy sensible a las concentraciones evaluadas de ambos metales pesados, obteniéndose IC₅₀ mayores a 100 μM para los dos metales (ver Fig. 4.1.20). Estos resultados muestran que la actividad NADPH oxidasa formadora de H₂O₂ no requiere, en principio, la participación de los tioles libres reactivos de la enzima.

Un análisis de la dependencia de las actividades enzimáticas de *EhTRXR* (NADPH oxidasa y disulfuro reductasa) en función del pH (ver Fig. 4.1.21) muestra que ambas actividades aumentan hacia pH más alcalinos. Ambas actividades exhibieron perfiles similares, a pesar de las características diferenciales observadas en los mecanismos de reacción.

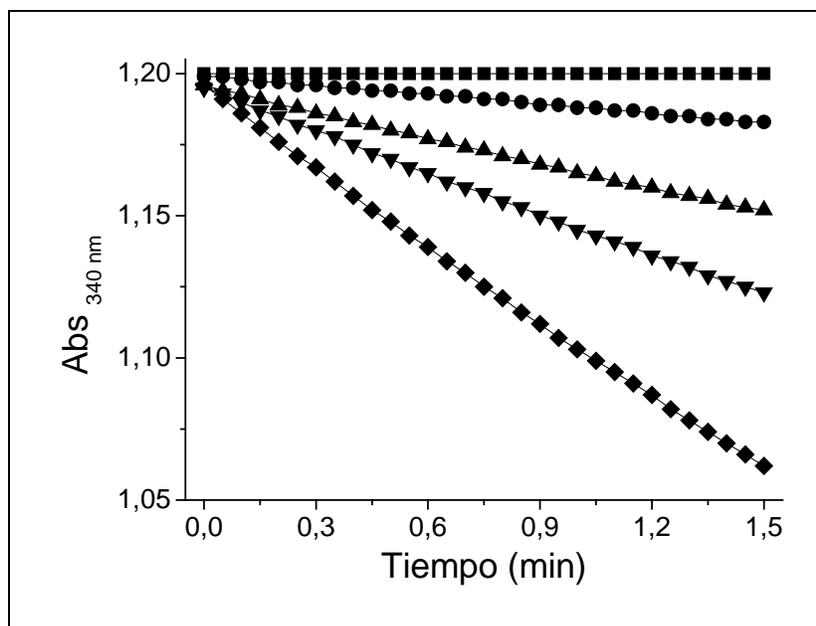


Fig. 4.1.18: Actividad NADPH oxidasa de *EhTRXR*. Las reacciones se realizaron a pH 7,0 y 30 °C en presencia de NADPH 300 μM y diferentes concentraciones de *EhTRXR*: (!) sin *EhTRXR*; (●) *EhTRXR* 0,25 μM; (▲) *EhTRXR* 0,5 μM; (■) *EhTRXR* 1 μM y (▼) *EhTRXR* 2 μM.

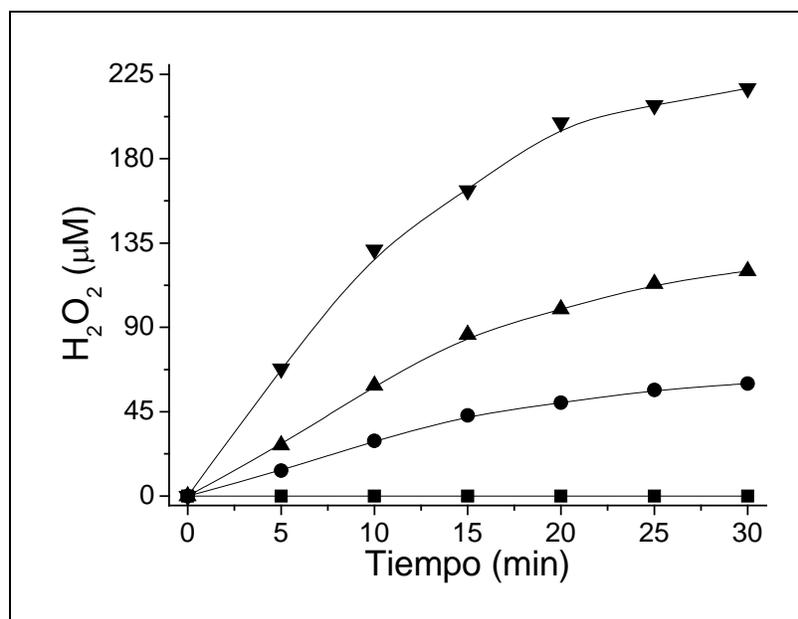


Fig. 4.1.19: Generación de H₂O₂ por *EhTRXR*. Las reacciones se realizaron a pH 7,0 y 30 °C en presencia de NADPH 300 μM y diferentes concentraciones de *EhTRXR*: (!) sin *EhTRXR*; (●) *EhTRXR* 0,5 μM; (▲) *EhTRXR* 1 μM y (▼) *EhTRXR* 2 μM.

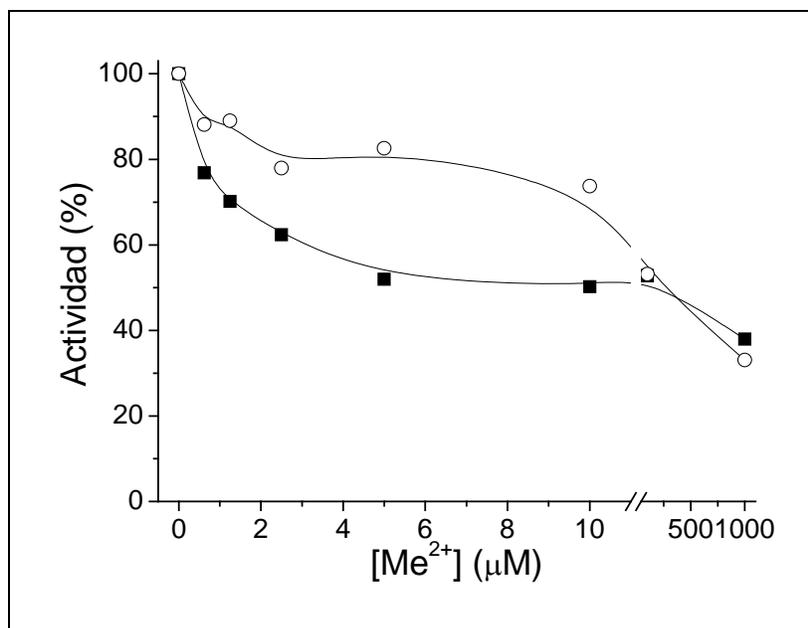


Fig. 4.1.20: Inhibición de actividad NADPH oxidasa por metales pesados. El ensayo se realizó a pH 7,0 y 30 °C en presencia de diferentes concentraciones de Cu²⁺ (!) y Zn²⁺ (-).

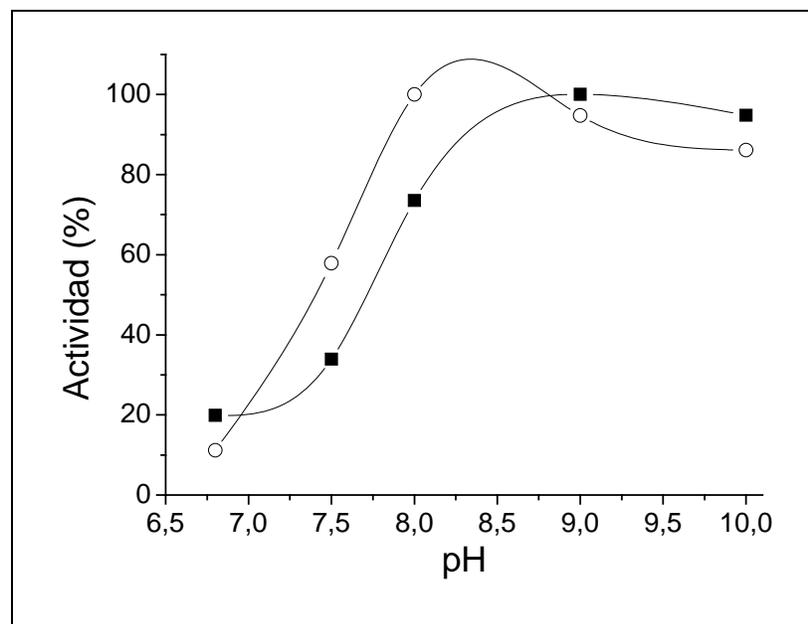


Fig. 4.1.21: Perfil de actividad NADPH oxidasa (!) y DTNB reductasa (-) en función del pH. Las reacciones se llevaron a cabo en TRIS-HCl 100 mM + EDTA 2 mM a 30 °C.

Al estudiar la dependencia de la actividad oxidasa con la concentración de NADPH, se observó una cinética de saturación hiperbólica (ver Fig. 4.1.22), con un K_m de $3,6 \mu\text{M}$ para la coenzima reducida y una k_{cat} de 26 min^{-1} , la eficiencia catalítica ($k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$) de oxidación de NADPH fue de $1,20 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

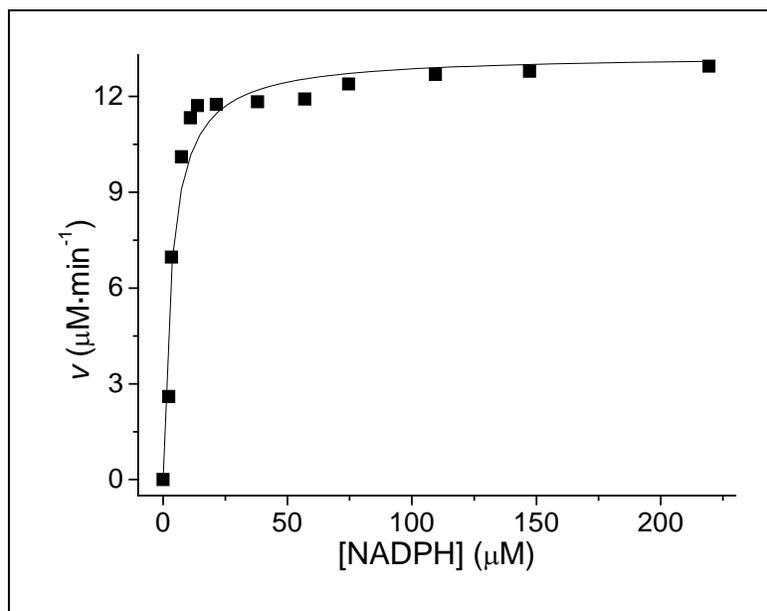
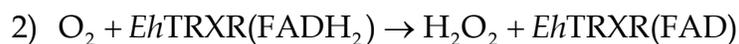


Fig. 4.1.22: Curva de saturación para actividad oxidasa de *Eh*TRXR. Los ensayos se realizaron a pH 7,0 y a 30°C .

Los parámetros cinéticos obtenidos fueron similares a los determinados para la actividad disulfuro reductasa (con DTNB). Esto da soporte a la idea de que la reducción de O_2 por la enzima sigue un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong” independiente al mecanismo de reducción de disulfuros. Este mecanismo puede ser esquematizado por dos etapas de reacciones independientes:



4.1.3.5. La enzima *Eh*TRXR recombinante posee actividad TRXR.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo de tesis es caracterizar el sistema TRX de *E. histolytica*, es por ello que se realizó la caracterización funcional de las proteínas recombinantes *Eh*TRXR y *Eh*TRX como un sistema redox en su conjunto. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió evaluar la capacidad de transferencia de equivalentes de reducción desde el NADPH hacia las TRX mediante la *Eh*TRXR y finalmente a insulina bovina como aceptor final de los equivalentes de reducción. Recordemos que se disponía de tres TRX funcionales del parásito y la TRX de *E. coli* como proteína modelo. Como se muestra en la Fig. 4.1.23, en presencia de NADPH e insulina, en ausencia de TRX sólo se observa la actividad oxidasa intrínseca de *Eh*TRXR, pero en presencia de *Eh*TRX8, *Eh*TRX41 o MBP-*Eh*TRX6 (en iguales concentraciones) se observa un incremento de la velocidad de consumo de NADPH. Para tal incremento, ambos componentes fueron necesarios (TRX e insulina), mientras que la presencia de insulina sola (sin TRX) no produce tal efecto. Estos resultados fueron confirmados por determinación de la reducción de la insulina, mediante el incremento de la turbidez a 630 nm (resultados no expuestos). Efectos similares fueron obtenidos con *Ec*TRX. Estos resultados indican que la reducción de la insulina por alguna de las TRX ensayadas requiere de la reducción previa de la proteína a expensas del NADPH y con catálisis de la *Eh*TRXR. Así, los resultados sugieren que la *Eh*TRXR en conjunto con las *Eh*TRX actúa como un sistema redox funcional.

Estudios cinéticos en estado estacionario revelaron que la reducción de TRX a expensas de NADPH, mediada por *Eh*TRXR, sigue una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten, como se muestra en la Fig.4.1.24, pudiéndose determinar los parámetros cinéticos para cada TRX actuando como sustrato. Los resultados de la Tabla 4.1.3 muestran que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de K_m determinados para las cuatro TRX estudiadas (*Eh*TRX8, *Eh*TRX41, MBP-*Eh*TRX6 y *Ec*TRX). De la misma manera, las eficiencias catalíticas de *Eh*TRX8, *Eh*TRX41 y *Ec*TRX se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, indicando que una TRX heteróloga como *Ec*TRX puede ser un buen sustrato para *Eh*TRXR. No obstante, se pudo diferenciar la eficiencia catalítica determinada para MBP-*Eh*TRX6, la cual fue de un orden de magnitud menor a las determinadas para las otras TRX. Esto se puede asignar a la presencia de la

fusión proteica utilizada para los estudios. Los resultados obtenidos sugieren que en *E. histolytica*, la TRXR podría ser operativa a nivel fisiológico con cualquiera de las TRX.

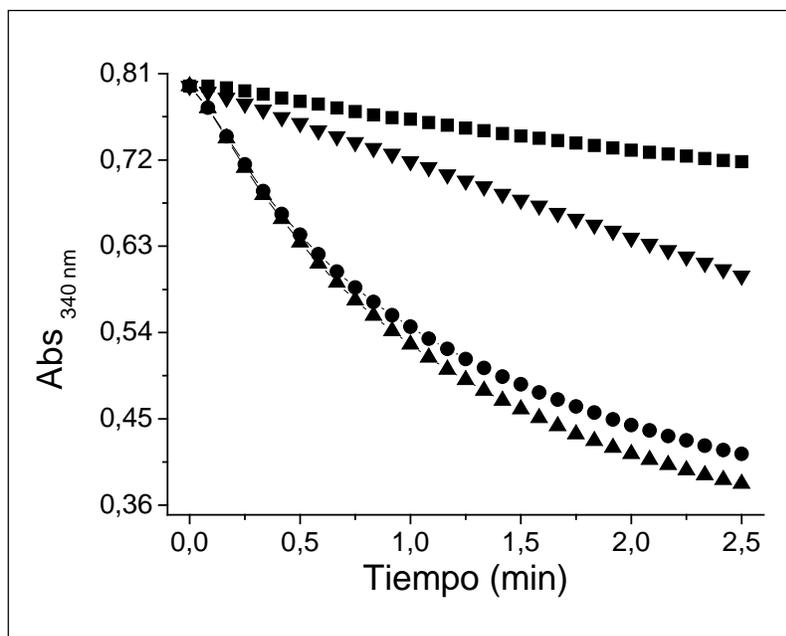


Fig. 4.1.23: Reducción de la insulina bovina por *EhTRX* enzimáticamente reducida por *EhTRXR* a expensas de NADPH. Los ensayos se realizaron a 30 °C a pH 7,0, con *EhTRXR* 0,5 μ M, insulina 0,13 mM y distintos tipos de *EhTRX*: (!) sin *EhTRX*; (.) *EhTRX8* 5 μ M; (7) *EhTRX41* 5 μ M y (B) MBP-*EhTRX6* 5 μ M.

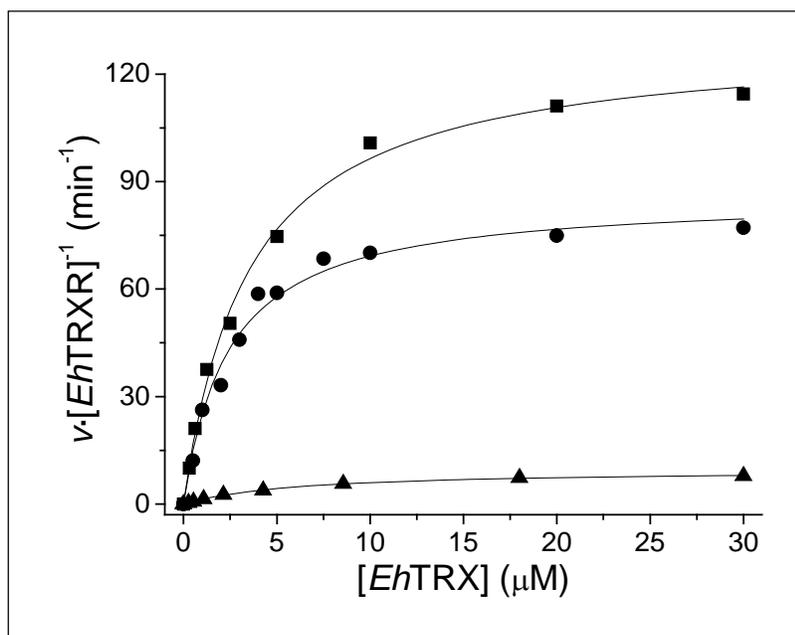


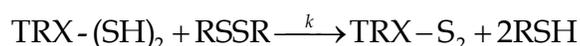
Fig. 4.1.24: Curvas de saturación de *EhTRX* para *EhTRXR*. Los ensayos se realizaron a 30 °C a pH 7,0. (!) *EhTRX41*; (.) *EhTRX8* y (7) MBP-*EhTRX6*.

TRX	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
<i>Eh</i> TRX41	3,6	130	$6,00 \cdot 10^5$
<i>Eh</i> TRX8	2,8	86	$5,10 \cdot 10^5$
MBP- <i>Eh</i> TRX6	5,1	7,3	$2,40 \cdot 10^4$
<i>Ec</i> TRX	4,7	75	$2,65 \cdot 10^5$

Tabla 4.1.3: Parámetros cinéticos para *Eh*TRXR de reducción de TRX, determinados a 30 °C y pH 7,0.

4.1.3.6. Capacidad de reducción de sustratos disulfuros por el sistema TRX.

Como se expuso anteriormente en los puntos 4.1.3.3 y 4.1.3.5, la *Eh*TRXR fue incapaz de reducir sustratos disulfuros de bajo peso molecular u otras proteínas disulfuro diferentes a TRX (en las condiciones ensayadas). Teniendo en cuenta lo anterior, se analizó el sistema TRX de *E. histolytica* (*Eh*TRXR/*Eh*TRX) en su capacidad de reducción de sustratos disulfuros (RSSR), tales como insulina, GSSG, cistina y TS₂. Como se muestra en la Fig. 4.1.25, el sistema *Eh*TRXR/*Eh*TRX transfiere equivalentes de reducción desde el NADPH a los diferentes compuestos disulfuros. El sistema opera mediante la reducción de *Eh*TRX8 (Fig. 4.1.25 - A) o *Eh*TRX41 (Fig. 4.1.25 - B) o MBP-*Eh*TRX6 (no mostrado) catalizada por *Eh*TRXR, seguida por la intercambio redox no enzimático entre la TRX y el respectivo sustrato disulfuro:



La velocidad de esta reacción espontánea es establecida por la siguiente ecuación:

$$v = k \cdot [\text{TRX} - (\text{SH})_2] \cdot [\text{RSSR}]$$

Como era de esperar, la velocidad de reacción fue dependiente tanto de la concentración del respectivo sustrato disulfuro como de la concentración de TRX reducida. A partir de estos ensayos se pudo calcular la constante de velocidad de pseudo-segundo orden para cada par. Esta constante de velocidad refleja la eficiencia, desde el punto de vista cinético, de la reacción entre los dos componentes en estudio, en nuestro caso las

distintas *Eh*TRX frente a diferentes RSSR. En la tabla 4.1.4 se muestran los valores calculados de las constantes de velocidad para cada *Eh*TRX.

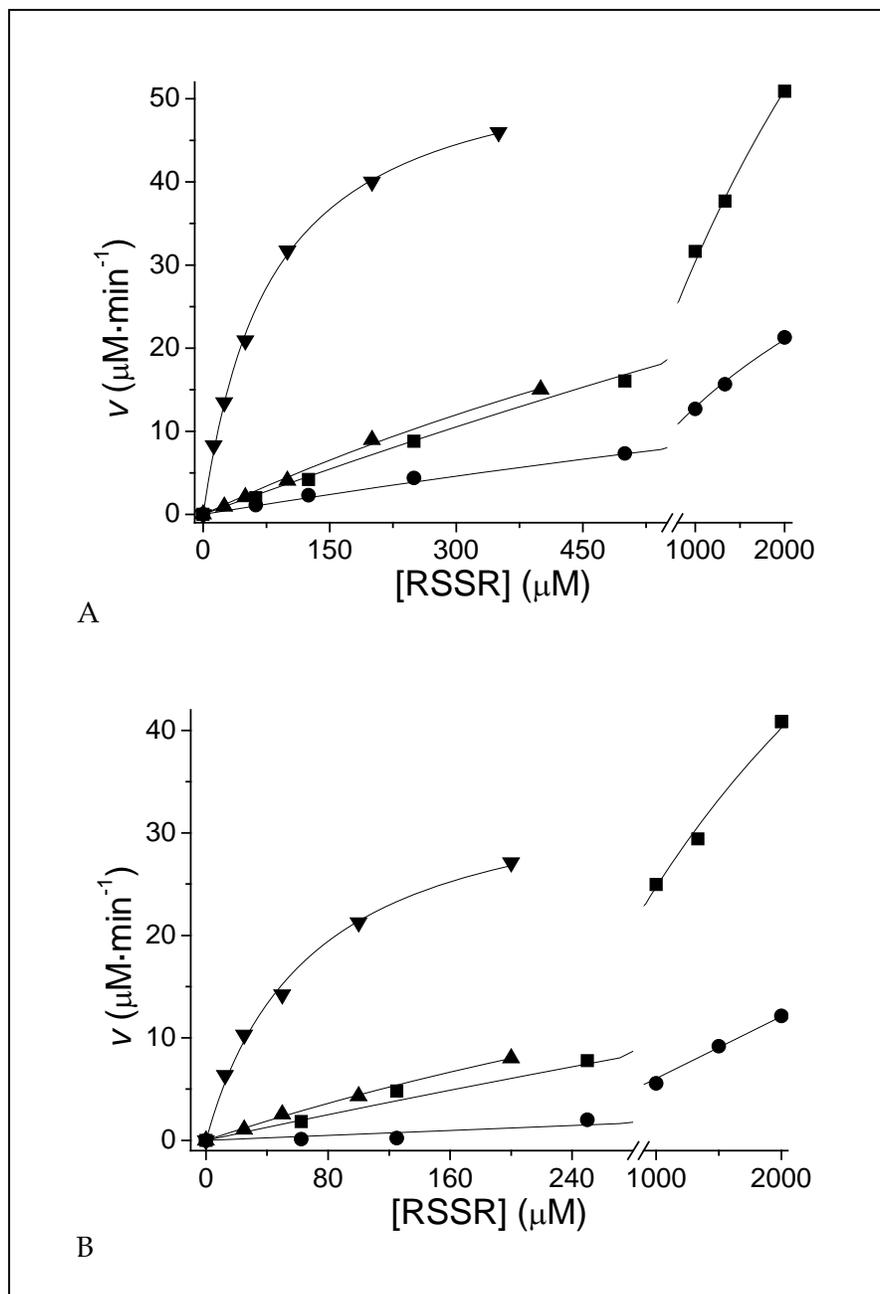


Fig. 4.1.25: Reducción de sustratos disulfuros por *Eh*TRX enzimáticamente reducida. Las reacciones fueron realizadas a 30 °C, pH 7,0, en presencia de A) *Eh*TRX8 5 μM , B) *Eh*TRX41 5 μM , y diferentes concentraciones de disulfuros: (!) cistina; (.) GSSG; (7) TS₂ e (B) insulina bovina.

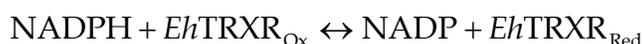
Disulfuro	k ($M^{-1} s^{-1}$)		
	<i>Eh</i> TRX8	<i>Eh</i> TRX41	MBP- <i>Eh</i> TRX6
Insulina	2435	2060	201
Cistina	125	111	30
GSSG	55	24	4
TS₂	119	143	N.D.

Tabla 4.1.4: Constantes de velocidad para la reducción de diferentes disulfuros por *Eh*TRX. Las constantes se determinaron a 30 °C y pH 7,0. N.D. = no determinado.

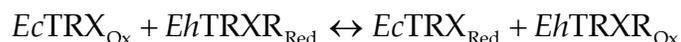
Como se puede observar en la Tabla 4.1.4, no hay diferencias significativas entre las constantes obtenidas para *Eh*TRX8 y *Eh*TRX41. Sin embargo, todos los valores de las constantes calculadas para MBP-*Eh*TRX6 son un orden menor respecto a los obtenidos para las otras *Eh*TRX. Esta diferencia se correlaciona con los parámetros obtenidos para la *Eh*TRXR, en donde la eficiencia catalítica en la reducción de la MBP-*Eh*TRX6 es un orden de magnitud menor a las calculadas para las otras *Eh*TRX. Como ya se mencionó anteriormente, esta diferencia en “reactividad” podría deberse a impedimentos estéricos generados por la fusión (MBP) entre la *Eh*TRX6 y sus respectivos sustratos, especialmente con la *Eh*TRXR, la cual sería la encargada de la regeneración de la TRX al estado reducido.

4.1.3.7. Determinación del potencial redox de *Eh*TRXR.

Como ya se ha mencionado en el punto 3.7.3, acorde a la relaciones de Haldane, el cociente entre las constantes bimoleculares velocidad directa/inversa deriva en la constante de equilibrio de la reacción aparente (K_{eq}^{app}). Para la semirreacción reductiva,



la K_{eq}^{app} puede ser calculada como relación de $k_{cat} \cdot Km^{-1}$ (o $Vm \cdot Km^{-1}$, si la concentración de enzima ensayada es la misma para todos los casos) de la reacción directa respecto al $k_{cat} \cdot Km^{-1}$ de la reacción inversa; en adición, para la semirreacción oxidativa,



la K_{eq}^{app} puede ser calculada de forma similar como relación de $k_{cat} \cdot Km^{-1}$ o $Vm \cdot Km^{-1}$ para la reacción en un sentido de reacción respecto al otro sentido. Es necesario aclarar que se

empleó *Ec*TRX porque es conocido su potencial redox ($E^{\circ} = -283$ mV) y a la vez era aceptada por *Eh*TRXR como sustrato.

Los ensayos realizados demostraron que la reacción de reducción de TRX es reversible, siendo *Eh*TRXR capaz de catalizar ambas direcciones de reacción. En adición, se obtuvo el mismo valor de K_m para *Ec*TRX_{Red} (en el sentido inverso de reacción) que el obtenido para *Ec*TRX_{Ox} (en el sentido directo, ver Tabla 4.1.3), lo que significaría, en principio, que la unión de estas proteínas no estaría influenciada por el estado redox de cada una. Por el contrario, el valor de K_m calculado para NADP⁺ fue de 88 μ M, el que es 44 veces mayor al obtenido para NADPH, demostrando poseer baja afinidad por la coenzima oxidada. A partir de las relaciones $V_m \cdot K_m^{-1}$ derivadas para cada sentido y semirreacción, se ha calculado la K_{eq}^{app} para cada semirreacción, y mediante la ecuación de Nernst se obtuvo el E° de *Eh*TRXR. En la Tabla 4.1.5 se describen los resultados obtenidos.

Semirreacción Reductiva			
$NADPH + EhTRXR_{Ox} \leftrightarrow NADP + EhTRXR_{Red}$			
$V_m \cdot K_m^{-1}$ (min ⁻¹) NADPH	$V_m \cdot K_m^{-1}$ (min ⁻¹) NADP ⁺	K_{eq}^{app}	E°_{EhTRXR} (mV)
2,84	0,30	9,56	-290 \pm 2

Semirreacción Oxidativa			
$EcTRX_{Ox} + EhTRXR_{Red} \leftrightarrow EcTRX_{Red} + EhTRXR_{Ox}$			
$V_m \cdot K_m^{-1}$ (min ⁻¹) <i>Ec</i> TRX _{Ox}	$V_m \cdot K_m^{-1}$ (min ⁻¹) <i>Ec</i> TRX _{Red}	K_{eq}^{app}	E°_{EhTRXR} (mV)
8,83	3,55	2,49	-295 \pm 1

Tabla 4.1.5: Determinación de E° de *Eh*TRXR. Los ensayos se realizaron acorde a lo descrito en el punto 3.7.3. Los valores reportados son promedios de cuatro experimentos independientes.

Los valores de E° para *Eh*TRXR derivados tanto para la semirreacción reductiva como oxidativa, se encuentran dentro del error experimental, pudiéndose tomar un valor promedio de -292 mV.

4.1.3.8. Determinación de potenciales redox de *Eh*TRX.

Para una mejor evaluación de la capacidad redox del sistema TRX de *E. histolytica*, se determinaron los E° para *Eh*TRX8, *Eh*TRX41 y MBP-*Eh*TRX6. Como se muestra en la Fig. 4.1.26, la reacción entre *Eh*TRX oxidada y NADPH catalizada por *Eh*TRXR fue reversible:



Mediante el monitoreo de la reacción con cantidades variables de *Eh*TRX, se pudieron determinar las concentraciones de los reactantes y productos en el equilibrio (ver punto 3.7.4). Con estos datos obtenidos y utilizando la ecuación de Nernst, se estimaron valores de E° de -286 ± 2 mV, -283 ± 3 mV y -277 ± 6 mV para *Eh*TRX8, *Eh*TRX41 y MBP-*Eh*TRX6, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados para TRX citoplasmáticas de diferentes organismos. En adición, los potenciales redox hallados para las proteínas de *E. histolytica* sugieren la participación en un rol importante en el metabolismo redox del parásito, siendo involucradas en el intercambio de equivalentes de reducción con diferentes metabolitos sustratos, tales como disulfuros de bajo peso molecular.

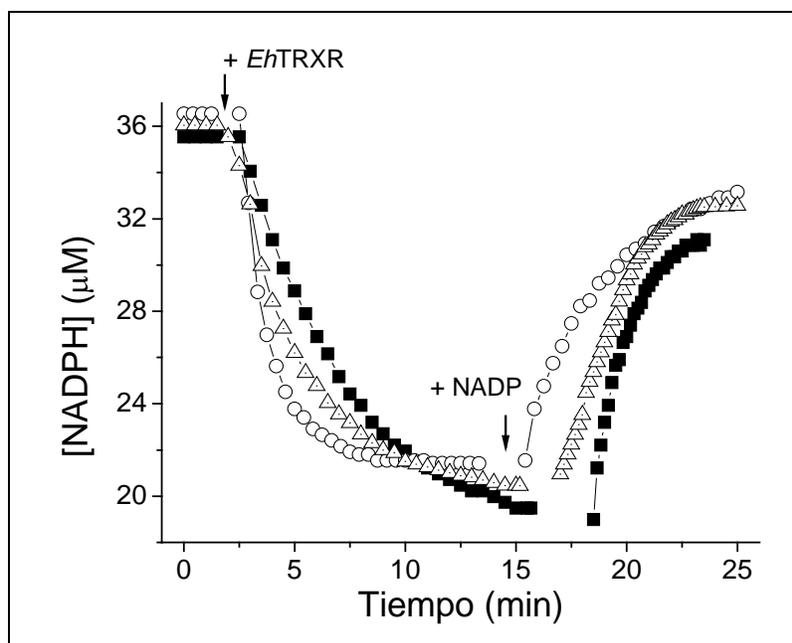


Fig. 4.1.26: Determinación del potencial redox de *Eh*TRX. La reducción de *Eh*TRX41 (!) o *Eh*TRX8 (-), o MBP-*Eh*TRX6 (8), todas 15 µM, fue iniciada por la adición de *Eh*TRXR 1 µM. Alcanzado el equilibrio, NADP⁺ 1,2 mM fue adicionado para generar una nueva condición de equilibrio. La formación de NADP⁺ y NADPH se determinó por disminución e incremento de la absorbancia a 340 nm, respectivamente.

4.1.4. Caracterización funcional de *Eh2CysPrx*.

Como se ha mencionado en el punto 4.1.1, varios reportes caracterizan a esta proteína como una 2CysPrx típica con actividad peroxidasa de gran abundancia en *E. histolytica*. Como parte del trabajo de tesis, se ha complementado su caracterización como un aporte al conocimiento de las vías antioxidantes en este parásito.

4.1.4.1. Propiedades físicas de *Eh2CysPrx*.

El espectro de absorción de la *Eh2CysPrx* no presentó bandas características de grupos prostéticos como hemo o FAD (resultados no mostrados), lo que significa que su funcionalidad provendría de grupos reactivos de la misma proteína. De forma similar a lo realizado para la *EhTRXR*, experimentos de SDS-PAGE no reductor realizados con la *Eh2CysPrx*, mostraron que la proteína, sin ningún tratamiento previo, migraba como una única banda de masa molecular aparente superior a 150 kDa (Fig. 4.1.27 - calle 1). Al realizar preincubaciones de la proteína con DTT 10 mM presentó dos bandas, una intensa de aproximadamente 30 kDa (masa molecular acorde a la predicha a partir de la secuencia de aminoácidos) y la otra de menor intensidad de 60 kDa (posible dímero covalente) (Fig. 4.1.27 - calle 2). Puede concluirse que bajo condiciones no reductoras la proteína se encuentra formando multímeros covalentes mediante puentes disulfuros intercatenarios. En adición, la proteína mostró resistencia a la sobreoxidación de sus residuos de cisteína dado que mantuvo el estado oligomérico luego de ser preincubada con H₂O₂ 1 mM y en paralelo con DTT 10 mM + H₂O₂ 50 mM (Fig. 4.1.27 - calle 3 y 4, respectivamente).

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados con PAGE nativo, demostraron que la *Eh2CysPrx* posee una estructura homodecamérica, posiblemente formados por pentámeros de dímeros, estructura comúnmente reportada para las 2CysPrx típicas. En adición, este tipo de asociación no se vio significativamente afectada por el estado redox del medio, como ocurre para algunos miembros de la familia de 2CysPrx típica. Distintivamente a otras 2CysPrx, en la *Eh2CysPrx* no sólo el dímero (estructura mínima catalítica) se encuentra unido covalentemente; sino que, aparentemente, todas las subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuros, dando lugar a una gran estructura oligomérica covalente. Esto último pudo verificarse por los ensayos de SDS-PAGE no reductores mostrados en la Fig. 4.1.27.

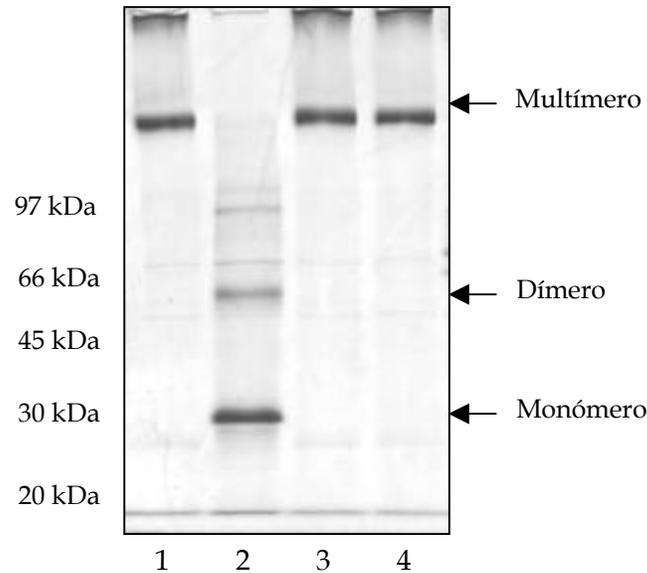


Fig. 4.1.27: SDS-PAGE no reductor al 10 % de *Eh2CysPrx*. 1) Proteína sin tratamiento; 2) Proteína preincubada con DTT 10 mM; 3) Proteína preincubada con H₂O₂ 1 mM y 4) Proteína preincubada con DTT 10 mM + H₂O₂ 50 mM. Las preincubaciones se realizaron por 10 min a 37 °C a pH 7,0.

Para la estimación de la masa molecular nativa de *Eh2CysPrx* se realizaron corridas en PAGE nativos en diferentes condiciones: la proteína sin tratamiento; la proteína preincubada con DTT 10 mM; preincubada con H₂O₂ 10 mM y preincubada con DTT 5 mM + H₂O₂ 10 mM. Mediante el método de Ferguson se realizó la determinación de las masas moleculares, como se describe en el punto 3.7.1. Como se observa en la Fig. 4.1.28-A-B, los resultados obtenidos arrojaron una masa molecular nativa de aproximadamente 300 kDa, encontrándose una leve diferencia en el último tratamiento, en donde la proteína migró con una masa molecular aparente de 270 kDa.

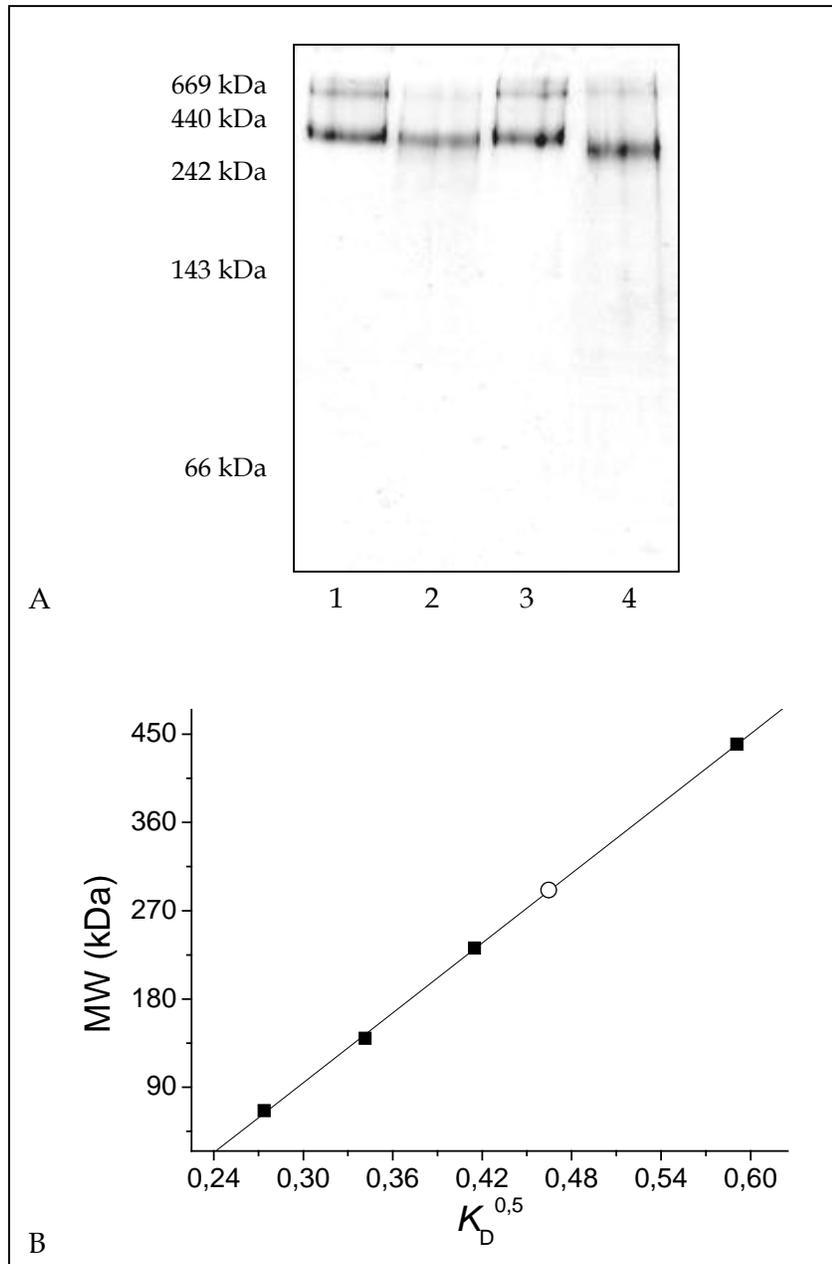


Fig. 4.1.28: Determinación de la masa molecular nativa de *Eh2CysPrx*. A) La proteína fue corrida en PAGE nativo al 8% y teñida con Coomassie blue en distintas condiciones; 1) sin pretratamiento; 2) preincubada con DTT 10 mM; 3) preincubada con H_2O_2 10 mM y 4) preincubada con DTT 5 mM + H_2O_2 10 mM. B) El gráfico de Ferguson fue generado por graficar la raíz cuadrada del coeficiente de retardo en función de la masa molecular de proteínas patrones (!). El coeficiente de retardo calculado de *Eh2CysPrx* fue 0,229 (O), el cual correlacionó con una masa molecular estimada de 300 kDa.

4.1.4.2. Caracterización básica de cascada de óxido-reducción acoplada a *Eh2CysPrx*.

Varios autores han caracterizado a la 2CysPrx en su actividad peroxidasa mediante el uso de DTT o un sistema TRX heterólogo (rata) como agente reductor (Cheng y col., 2000; Cheng y col., 2004). En adición, existe un único reporte en donde proponen a una proteína de la misma fuente, *Ehp34*, como dador de electrones en forma directa sin intervención de ninguna proteína del tipo TRX, siendo un mecanismo similar al AhpF/AhpC de *Salmonella typhimurium* (Bruchhaus y col., 1997). La existencia de genes codificantes para componentes del sistema TRX en *E. histolytica* hizo relevante investigar la funcionalidad de las proteínas recombinantes junto a *Eh2CysPrx* para la reducción de hidroperóxidos, es por ello que se planteó la caracterización de la *Eh2CysPrx* utilizando al sistema TRX del parásito como agente reductor.

En una primera evaluación se reconstituyó el sistema de detoxificación *in vitro*, utilizando las proteínas recombinantes correspondientes y se siguió la oxidación de NADPH mediante el cambio de la absorbancia a 340 nm. Se evaluaron las diferentes TRX amébicas disponibles así como *EcTRX* como TRX modelo. Como peróxido se empleó *t*-bOOH, dado que su reacción con tioles de bajo peso molecular o TRX es mucho más lenta que para H₂O₂, pudiéndose despreciar su reducción en ausencia de *Eh2CysPrx*. Como se muestra en la Fig. 4.1.29-A, la adición de *t*-bOOH a la mezcla de reacción que contenía NADPH, *EhTRXR* y *Eh2CysPrx* no modificó la velocidad de oxidación de NADPH, que bajo las condiciones del ensayo era efectuada por la actividad oxidasa propia de la reductasa. Sólo luego de la adición extra de TRX (*EcTRX* o *EhTRX8* o *EhTRX41*) a la mezcla de reacción, la velocidad de oxidación de NADPH incrementó significativamente (Fig. 4.1.29-B-C-D), indicando que sólo el sistema completo fue capaz de reducir *t*-bOOH a partir del NADPH, siendo funcional para la detoxificación. Opuestamente a lo anterior, la adición de MBP-*EhTRX6* no incrementó la velocidad de oxidación de NADPH (Fig. 4.1.29-E-F), incluso a una concentración mayor a la empleada para las otras TRX. En la Fig. 4.1.29-G se observa que la reacción fue iniciada con la adición de *EhTRXR* y que el NADPH no puede reducir directamente a *EhTRX41*, *Eh2CysPrx* o *t*-bOOH, indicando que la presencia de la reductasa es importante para la funcionalidad de la cascada de oxido-reducción.

Las diferentes variantes analizadas en la Fig. 4.1.29 ilustran que la reducción efectiva de peróxidos fue posible sólo en presencia del sistema completo: NADPH;

EhTRXR; TRX (tanto *EcTRX* como *EhTRX*) y *Eh2CysPrx*. La incapacidad de MBP-*EhTRX6* de reducir a la *Eh2CysPrx* podría deberse, como se ha dicho anteriormente, a un posible impedimento estérico generado por la proteína de fusión (MBP), lo que interferiría en la correcta orientación para la reacción entre las dos proteínas. Esta menor reactividad fue observada al estudiar la interacción entre *EhTRXR*/MBP-*EhTRX6* y al evaluar su capacidad de reducción de sustratos disulfuros. En adición, cabe la posibilidad que la *EhTRX6* en si misma no sea un sustrato eficiente para la *Eh2CysPrx*, con lo cual no se detectaría la reducción del peróxido. Por otro lado, se pudo determinar que la *EhTRXR* no pudo reducir directamente a la *Eh2CysPrx*, necesitando la presencia de TRX para la transferencia de equivalentes de reducción. Esta propiedad marca una gran diferencia con su homóloga *Ehp34*, anteriormente mencionada.

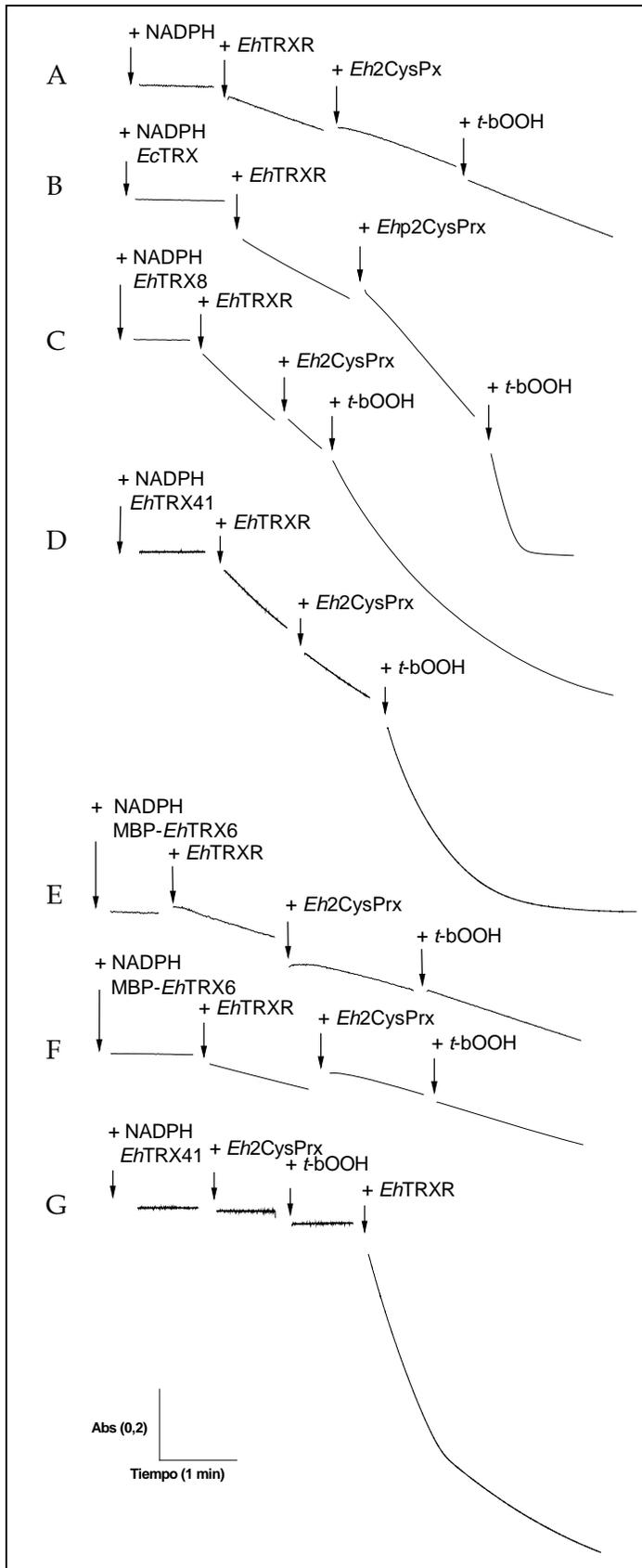


Fig. 4.1.29: Cascadas de óxido-reducción de detoxificación de hidroperóxido: Los ensayos se realizaron a 30 °C a pH 7,0 en presencia de NADPH 200 μ M; *t*-bOOH 100 μ M; *Eh*TRXR 1 μ M; *Eh*2CysPrx 1 μ M y (A) sin TRX; (B) *Ec*TRX 10 μ M; (C) *Eh*TRX8 10 μ M; (D) *Eh*TRX41 10 μ M; (E) MBP-*Eh*TRX6 10 μ M; (F) MBP-*Eh*TRX6 20 μ M. Las reacciones fueron iniciadas por la adición de *t*-bOOH. En (G) la reacción se inició con *Eh*TRXR.

4.1.4.3. Caracterización cinética de *Eh2CysPrx*.

La *Eh2CysPrx* fue evaluada en su capacidad de reducción de hidroperóxidos acoplado al sistema TRX de *E. histolytica*, de forma similar a lo realizado en el punto 4.1.4.2. Para la caracterización de la Prx se empleó *t*-bOOH como sustrato, dadas las conveniencias descritas anteriormente. En todos los ensayos, *EhTRXR* fue agregada en exceso para asegurar que las diferentes concentraciones de *EhTRX8*, *EhTRX41* o *EcTRX* fueran mantenidas en forma reducidas para servir como sustrato reductor en forma conveniente a *Eh2CysPrx*.

Los estudios cinéticos en estado estacionario, mostraron que la Prx amébrica exhibe una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten con relación a los diferentes sustratos: *t*-bOOH, *EhTRX8*, *EhTRX41* y *EcTRX*. Los gráficos de dobles recíprocos de la velocidad inicial a concentraciones variables de *t*-bOOH y diferentes concentraciones fijas de *EhTRX8* (Fig. 4.1.30-A), *EhTRX41* (Fig. 4.1.30-B) o *EcTRX* (Fig. 4.1.30-C) generaron rectas paralelas, lo que indicó que la enzima sigue un mecanismo clásico de tipo “ping-pong”. Los parámetros cinéticos para la *Eh2CysPrx* recombinante son expuestos en la Tabla 4.1.6. La enzima exhibió mayor eficiencia catalítica con respecto a las tres TRX evaluadas ($\approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que para *t*-bOOH ($\approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Asimismo, la enzima demostró poseer una afinidad mayor por los sustratos reductores (TRX) que por el ROOH empleado. Esto indicaría que la etapa lenta del ciclo catalítico de la *Eh2CysPrx* es la reducción del ROOH, antes que su regeneración al estado reducido, acordando esto con lo informado para algunas 2CysPrx que emplean peróxidos orgánicos como sustratos (Hofmann y col., 2002).

Alternativamente, los estudios cinéticos demostraron que la *Eh2CysPrx* fue resistente a altas concentraciones de *t*-bOOH (hasta 500 μM). Esto la distingue de otras Prx eucariotas, a pesar de poseer un motivo equivalente al GGLG, el cual sería responsable de la sensibilidad de las Prx a la sobreoxidación (Wood y col., 2003b). Esta resistencia a la sobreoxidación ya fue observada en los ensayos de SDS-PAGE no reductor, donde la proteína mantenía su estructura oligomérica. Como se dijo anteriormente, esta característica podría deberse a la presencia en el extremo N-terminal de una región rica en residuos Cys, que podrían actuar como un sistema protector a la sobreoxidación de las Cys peroxidáticas. Esto se valida con lo reportado por otros autores, en donde variantes truncas de esta proteína en el extremo N-terminal carecían de actividad peroxidasa (Bruchhaus y col., 1997).

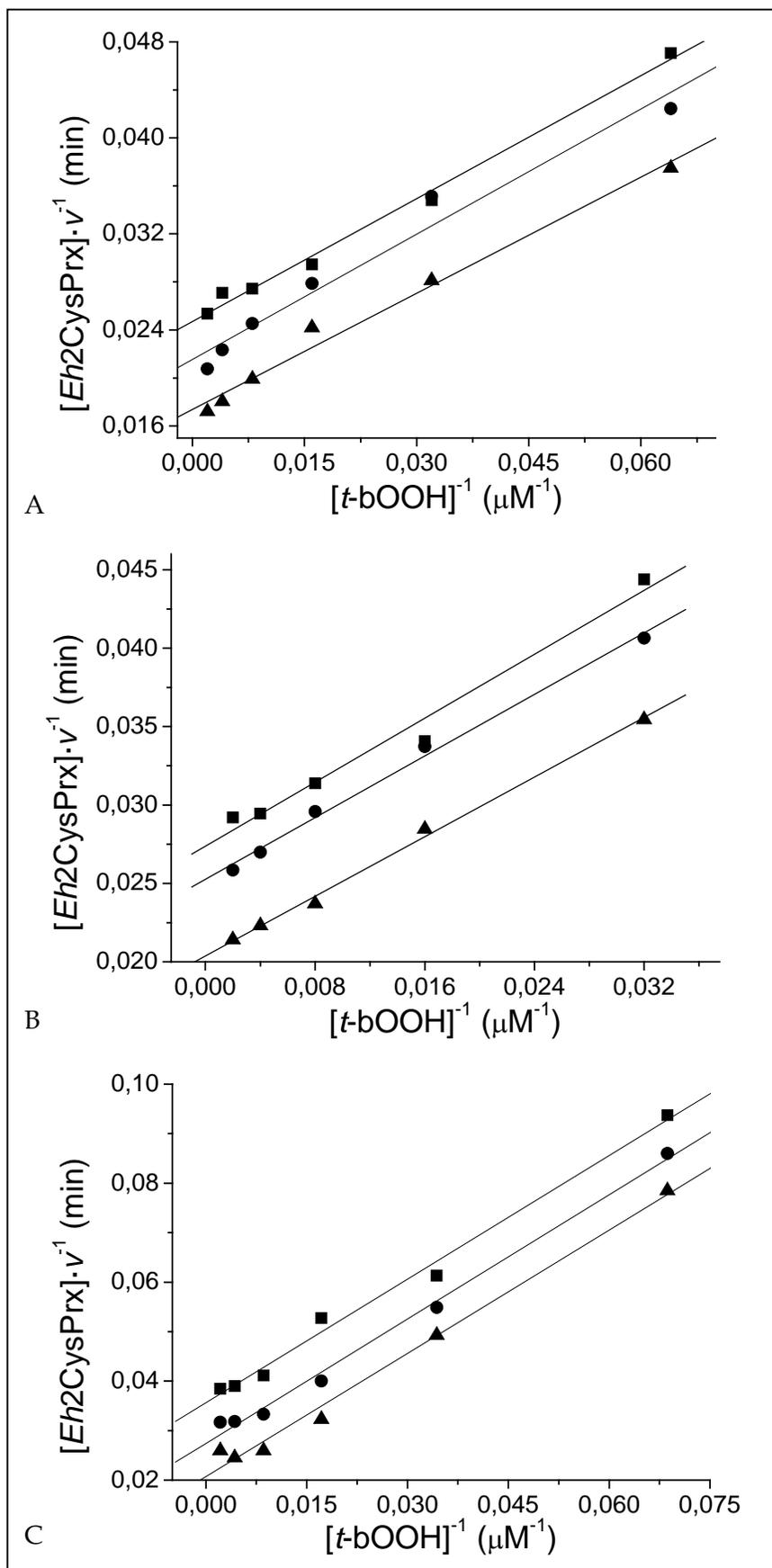


Fig. 4.1.30:
 Análisis cinético de *Eh2CysPrx*. Las reacciones se realizaron a 30 °C y pH 7,0 en presencia de *Eh2CysPrx* 1 μM; *t-bOOH* 0-500 μM; y diferentes concentraciones de *EhTRX8* (A); *EhTRX41* (B) o *EcTRX* (C): (!) 5; (.) 10 y (∇) 20 μM.

ROOH	TRX	k_{cat} (min^{-1})	Km_{ROOH} (μM)	Km_{TRX} (μM)	$k_{cat} \cdot Km_{ROOH}^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$k_{cat} \cdot Km_{TRX}^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
	<i>Eh</i> TRX8	47	34,6	3,8	$2,22 \cdot 10^4$	$2,04 \cdot 10^5$
<i>t</i> -bOOH	<i>Eh</i> TRX41	58	35,6	3,1	$2,70 \cdot 10^4$	$3,10 \cdot 10^5$
	<i>Ec</i> TRX	57	36,7	5,7	$2,60 \cdot 10^4$	$1,67 \cdot 10^5$

Tabla 4.1.6: Parámetros cinéticos para *Eh2CysPrx*, determinados a 30 °C y pH 7,0.

Alternativamente, se decidió evaluar la capacidad de emplear GSH como sustrato reductor para la actividad peroxidasa de *Eh2CysPrx*, para lo cual se reemplazó al sistema TRX por GR/GSH. A partir de ensayos en estado estacionario a concentración fija y saturante de *t*-bOOH se evaluó la velocidad de reacción en función de la concentración de GSH. Como se muestra en la Fig. 4.1.31, la enzima mostró una cinética de saturación hiperbólica para GSH (a 30 °C y pH 7,0), obteniéndose una k_{cat} de 2,83 min^{-1} y un Km para GSH de 7 mM. La eficiencia catalítica para el empleo de GSH como reductor fue de 6,75 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, lo que comparado a los valores obtenidos para TRX (cinco órdenes de magnitud mayor), se concluye que la *Eh2CysPrx* actúa más eficientemente como tiorredoxina peroxidasa. Teniendo en cuenta estos resultados, fisiológicamente deberían ser las TRX las encargadas de regenerar a la Prx y no el GSH ni la cisteína, otorgando relevancia al sistema TRX como posible blanco molecular para el diseño racional de drogas terapéuticas contra la amebiasis.

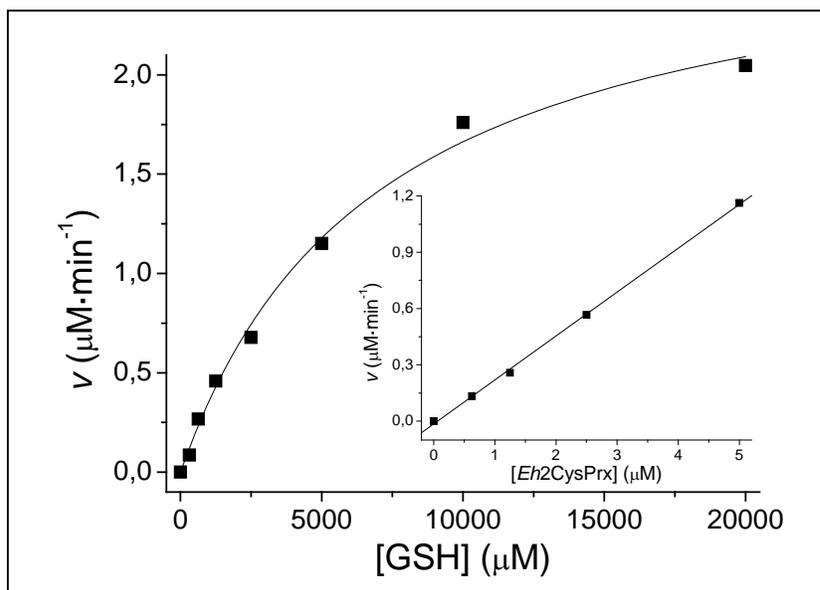


Fig. 4.1.31: Curva de saturación de GSH para *Eh2CysPrx*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0, en presencia de *Eh2CysPrx* 1 μM y *t*-bOOH 500 μM . En el recuadro: actividad GPx de *Eh2CysPrx*. Los ensayos se realizaron en presencia de GSH 3 mM y *t*-bOOH 500 μM .

4.1.4.4. Titulación redox de *Eh2CysPrx*.

Se realizaron titulaciones redox de la *Eh2CysPrx* por incubación de la proteína con diferentes relaciones de GSH/GSSG, seguidas por el análisis por SDS-PAGE no reductor, como se describe en el punto 3.7.5. Mediante densitometría se estimó la abundancia de cada especie, tomando como oxidada la banda de 300 kDa y reducida la banda de 30 kDa. Con estos datos se construyó una gráfica de fracción reducida en función del potencial de reducción (generado para cada combinación de GSH/GSSG a 33 °C y pH 7,5). En la Fig. 4.1.32 se muestra el perfil de titulación, obteniéndose un $E_{m7,5}$ de -240 ± 5 mV. Teniendo en cuenta que esta proteína posee varias cisteínas reactivas y que su estado de asociación covalente depende del grado de reducción de ellas, este valor estimado debe ser tomado como un promedio entre todos los sitios redox activo de la proteína. El potencial redox estimado para la Prx amébrica es coherente respecto a los potenciales de reducción de sus sustratos reductores fisiológicos (*EhTRX*, valor promedio de -280 mV), siendo ésta capaz de aceptar equivalentes de reducción a partir de estos. En adición, el valor estimado se encuentra dentro de los valores reportados para otros miembros de la familia, siendo más positivo que el de Prx cloroplastídicas (de -315 a -288 mV) (Konig y col., 2002; Rouhier y col., 2004) y más negativo al determinado para la Prx citoplasmática, AhpC de *S. typhimurium* (-178 mV) (Parsonage y col., 2008).

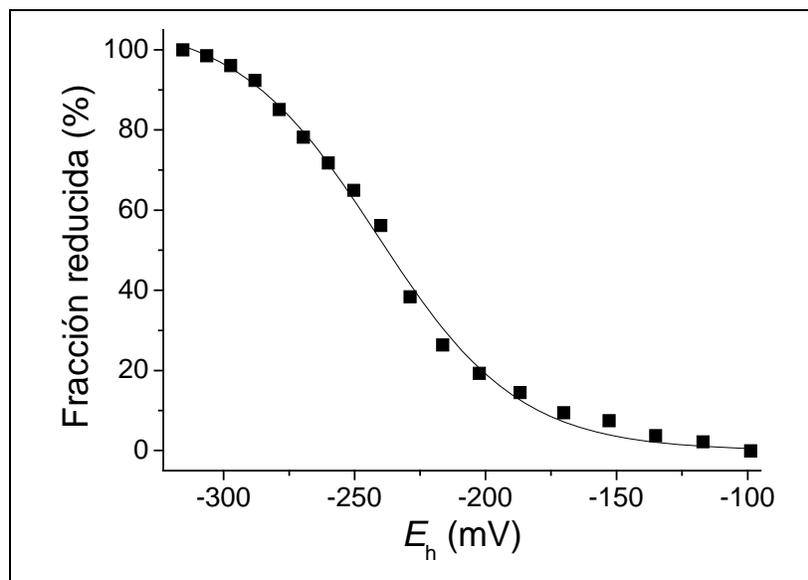


Fig. 4.1.32: Curva de titulación redox de *Eh2CysPrx*. La proteína se incubó con diferentes relaciones de GSH/GSSG a 33 °C a pH 7,5 por 3 h y luego se estimó la fracción reducida al correspondiente E_h por SDS-PAGE no reductor.

4.1.5. Especificidad de sustratos no disulfuros de *Eh*TRXR.

En forma alternativa, la *Eh*TRXR presentó capacidad de reducir compuestos no disulfuros con eficiencias moderadas. Algunos de estos compuestos son de interés por “inhibir” la actividad disulfuro reductasa de esta enzima, esto se describirá a continuación.

4.1.5.1. *Eh*TRXR puede emplear NADH como coenzima reducida.

Distintivamente a lo informado para la mayoría de las TRXR, en donde se observa una alta especificidad para NADPH, la *Eh*TRXR fue capaz de emplear también NADH como dador de electrones, a concentraciones en el orden del μM . Esto fue evaluado mediante el ensayo de reducción de DTNB en donde se reemplazó al NADPH por NADH. En la Fig. 4.1.33, se muestra una curva de saturación de NADH en presencia de una concentración fija de DTNB, pudiéndose determinar un K_m para NADH de $23 \mu\text{M}$ y una k_{cat} de 12 min^{-1} . La eficiencia catalítica obtenida fue de $8,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, casi dos órdenes de magnitud menor a la obtenida para NADPH. Como se puede apreciar, la afinidad por NADH es sólo un orden menor a la de NADPH ($K_m = 1,8 \mu\text{M}$), manteniéndose, aproximadamente, la misma k_{cat} para ambas coenzimas.

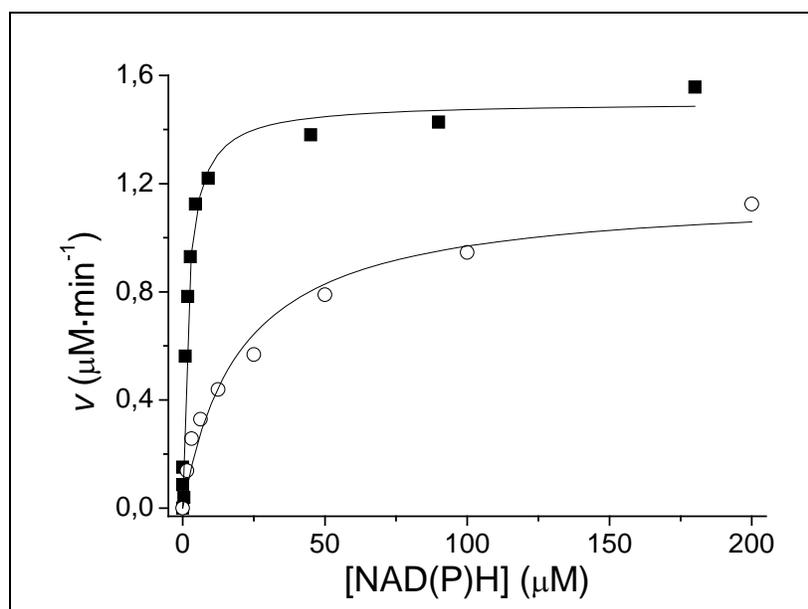


Fig. 4.1.33: Curvas de saturación de coenzimas reducidas para *Eh*TRXR. Los ensayos se realizaron a 30°C y pH 7,0 en presencia de DTNB 5 mM y diferentes concentraciones de (■) NADPH y (○) NADH.

En adición, se investigó la actividad oxidasa con NADH como sustrato, obteniéndose valores de velocidad de recambio similares al obtenido con NADPH. De igual modo, se pudo verificar la producción de H_2O_2 (mediante el método de ferritocianato, ver 3.7.2.3) por parte de la enzima al emplear NADH como dador de electrones. Las velocidades de generación de H_2O_2 obtenidas tanto con NADPH, como con NADH fueron comparables, como se muestra en la Fig. 4.1.34.

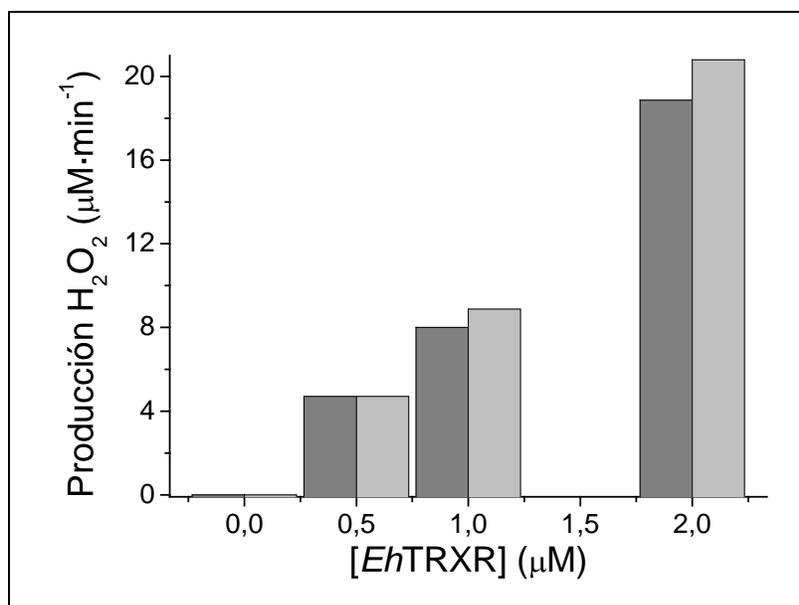


Fig. 4.1.34: Velocidad de generación de H_2O_2 por actividad oxidasa de *EhTRXR*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0, en presencia de NADH 100 µM (barras gris oscuro) o NADPH 100 µM (barras gris claro).

Alternativamente, se evaluaron los parámetros cinéticos de sustratos disulfuros, tales como DTNB, *EcTRX*, *EhTRX8* y *EhTRX41* (como sustratos modelos) utilizando NADH como coenzima reducida, de modo tal de verificar si tales parámetros variaban por el cambio de sustrato reductor. Como se muestra en la Tabla 4.1.7 el cambio de NADPH por NADH no modificó apreciablemente los parámetros cinéticos para DTNB como para *EcTRX*. Estos resultados indicarían que la enzima sigue un mecanismo “ping-pong”, como se mostró en el punto 4.1.3.3. Para este tipo de mecanismo el ciclo catalítico podría componerse de una etapa reductiva [reacción entre la enzima y el NAD(P)H] independiente a la etapa oxidativa (reacción entre la reductasa y el sustrato disulfuro a reducir). Al ser independientes estas etapas, los parámetros obtenidos para un sustrato en estudio deberían ser independientes del cosustrato empleado. Estos resultados

han demostrado que la *Eh*TRXR puede emplear tanto NADPH como NADH como cofactor reducido, indicando ser una excepción a la regla de la especificidad por NADPH presente en las TRXR.

Sustratos disulfuros	NADPH			NADH		
	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
DTNB	15	1100	$2,27 \cdot 10^2$	14	1400	$1,66 \cdot 10^2$
<i>Ec</i> TRX	75	4,7	$2,65 \cdot 10^5$	30	6,2	$7,46 \cdot 10^4$
<i>Eh</i> TRX8	86	2,8	$5,10 \cdot 10^5$	32	2,0	$2,36 \cdot 10^5$
<i>Eh</i> TRX41	130	3,6	$6,00 \cdot 10^5$	42	2,3	$3,04 \cdot 10^5$

Tabla 4.1.7: Comparación de parámetros cinéticos de DTNB, *Ec*TRX, *Eh*TRX8 y *Eh*TRX41 determinados en presencia de NADPH (300 μM) o NADH (400 μM) a pH 7,0 y 30 °C.

También se evaluó si el producto de la oxidación del NADH, el NAD⁺, poseía propiedades inhibitorias similares al NADP⁺ sobre la actividad disulfuro reductasa, empleando DTNB como sustrato. Como se puede observar en la Tabla 4.1.8, el NAD⁺ actuó como un pobre inhibidor competitivo tanto para NADPH como para NADH. En adición, el NADP⁺ actuó como inhibidor competitivo fuerte respecto a NADH, presentado un K_i (7 μM) en el orden del K_m para NADPH (1,8 μM). Estos resultados indicarían, en principio, que el sitio de unión del NADH es el mismo que el del NADPH y que la unión de este último (al igual que su forma oxidada, NADP⁺) estaría fuertemente estabilizada por la interacción de residuos de Arg del sitio de unión de la enzima [en teoría, basado en descripciones de otros autores para otras TRXR (Alkhalfioui y col., 2007)] con el grupo fosfato de la coenzima, lo que explica el bajo K_m para NADPH y los bajos K_i de NADP⁺ para NADH y NADPH.

Inhibidor	Tipo de inhibición	K_i (μM)
NADP ⁺	Competitiva con respecto a NADPH	26
NADP ⁺	Competitiva con respecto a NADH	7
NAD ⁺	Competitiva con respecto a NADPH	1478
NAD ⁺	Competitiva con respecto a NADH	313

Tabla 4.1.8: Constantes de inhibición para NAD⁺ y NADP⁺ para la actividad DTNB reductasa, determinadas a pH 7,0 y 30 °C.

4.1.5.2. Reducción de S-nitrosotioles por *Eh*TRXR.

Los S-nitrosotioles son portadores de NO•, actuando como potenciales oxidantes de tioles esenciales de las proteínas, modificando sus funciones biológicas. En vista de que *Eh*TRXR no fue capaz de reducir en forma directa ni cistina ni GSSG, se investigó su capacidad de reducir s-nitrosotioles, tales como CySNO y GSNO. Cuando a la mezcla de reacción compuesta de NADPH y *Eh*TRXR se le adicionaron diversas cantidades de CySNO o GSNO, la velocidad de oxidación de NADPH se incrementó proporcionalmente, demostrando una oxidación del NADPH dependiente de la concentración de CySNO o GSNO. Al graficar la velocidad inicial de oxidación de NADPH en función de la concentración de CySNO o GSNO, se obtuvieron curvas hiperbólicas del tipo Michaelis-Menten (Fig. 4.1.35). Los parámetros cinéticos para CySNO y GSNO se muestran en la Tabla 4.1.9.

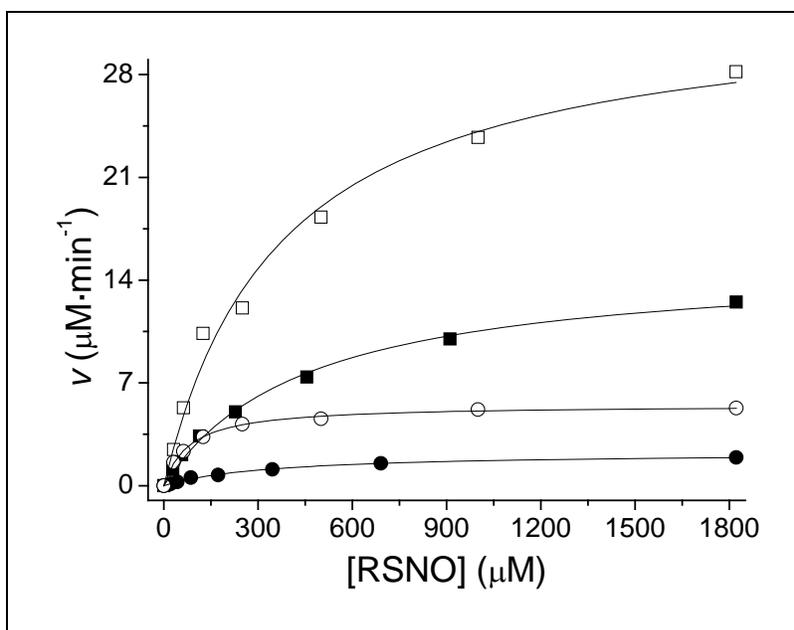


Fig. 4.1.35: Curvas de saturación para la reducción dependiente de NADPH de S-nitrosotioles por *Eh*TRXR. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0 con NADPH 200 μM, distintas concentraciones de CySNO (cuadrados) y GSNO (círculos), en ausencia (cerrados) y en presencia (abiertos) de *Eh*TRX41 5 μM.

La enzima exhibió una mayor eficiencia catalítica para la reducción de CySNO que para GSNO. Los valores obtenidos para la reducción de S-nitrosotioles son comparables con los informados para las TRXR de *P. falciparum* y de timo de ternero, las

cuales poseen eficiencias catalíticas de reducción de GSNO de 10^3 y 10^5 $M^{-1} s^{-1}$, respectivamente (Nikitovic y col., 1996; Kanzok y col., 2000).

S-nitrosotiol	Km	k_{cat}	$k_{cat} \cdot Km^{-1}$	$k_{cat} \cdot Km^{-1} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{cat} \cdot Km^{-1} (M^{-1} s^{-1})$
	(μM)	(min^{-1})	($M^{-1} s^{-1}$)	+ <i>Ec</i> TRX 5 μM	+ <i>Eh</i> TRX41 5 μM
CySNO	452	152	$5,64 \cdot 10^3$	$1,19 \cdot 10^3$	$1,40 \cdot 10^4$
GSNO	342	23	$1,10 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^4$	$1,13 \cdot 10^4$

Tabla 4.1.9: Parámetros cinéticos para la reducción de S-nitrosotioles por *Eh*TRXR.

En adición, se observó un fuerte incremento en la velocidad de oxidación de NADPH cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de TRX (*Ec*TRX o *Eh*TRX41, específicamente), lo que indicó que tanto la TRXR como la TRX contribuyeron a la reducción del S-nitrosotiol. Las eficiencias catalíticas obtenidas en presencia de *Ec*TRX y *Eh*TRX41 se muestran en la Tabla 4.1.9. La Fig. 4.1.36 ilustra sobre las V_m obtenidas para la reducción de S-nitrosotioles en ausencia y presencia de ambas TRX. Un aspecto a resaltar es que el mayor incremento de V_m fue observado para GSNO, aproximadamente 200-300%, el cual mostró ser un sustrato menos eficiente para *Eh*TRXR que CySNO. Para CySNO el aumento en la V_m fue de un 100%, indicando una reducción directa eficiente por parte de *Eh*TRXR, lo cual se correlaciona con la eficiencia catalítica obtenida.

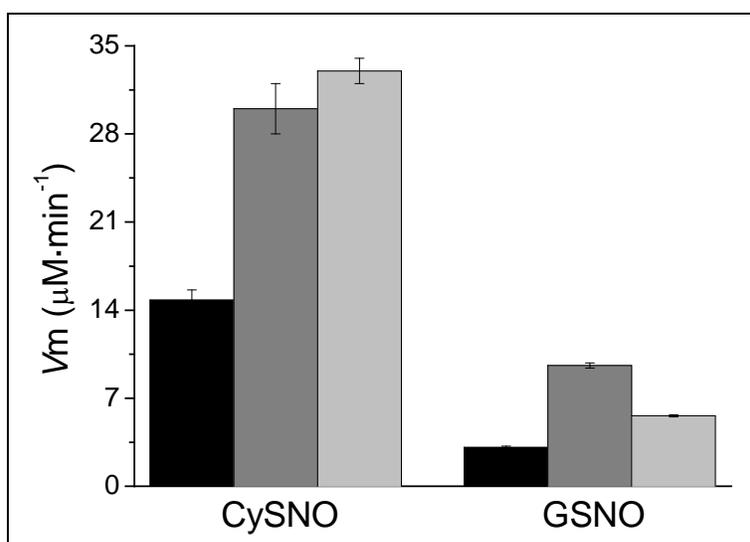


Fig. 4.1.36: Velocidades máximas de reducción de S-nitrosotioles por *Eh*TRXR en ausencia (negro) y en presencia de *Ec*TRX 5 μM (gris oscuro) o de *Eh*TRX41 5 μM (gris claro) a 30 °C y pH 7,0.

4.1.5.3. *Eh*TRXR posee actividad quinona reductasa.

Las quinonas son una clase importante de compuestos aromáticos sustituidos con oxígeno que participan en ciclos redox de transferencia de uno o dos electrones. Se las encuentran como sustancias naturales, o como drogas sintéticas, por ejemplo, para uso clínico como agentes antitumorales y antiparasitarios, o como componentes de la polución ambiental. En vista de la importancia de las quinonas como moléculas redox, se ha examinado la interacción entre la *Eh*TRXR recombinante y dos tipos de quinonas disponibles en el laboratorio: 2-metil-benzoquinona (MBQ) y 2,5-di-*tert*-butilbenzoquinona (DTBBQ).

En una primer ensayo, se evaluó la capacidad de la *Eh*TRXR recombinante de catalizar la oxidación de NADPH en presencia de quinonas. Cuando a la mezcla de reacción compuesta de NADPH y *Eh*TRXR se le adicionó MBQ o DTBBQ, se advirtió un marcado incremento en la oxidación de NADPH, observándose una proporcionalidad entre la velocidad de oxidación de NADPH y la concentración de *Eh*TRXR en presencia de una concentración fija de quinona (Fig. 4.1.37). Esta observación indica que, efectivamente, la enzima es capaz de reducir a estos compuestos a expensas del NADPH.

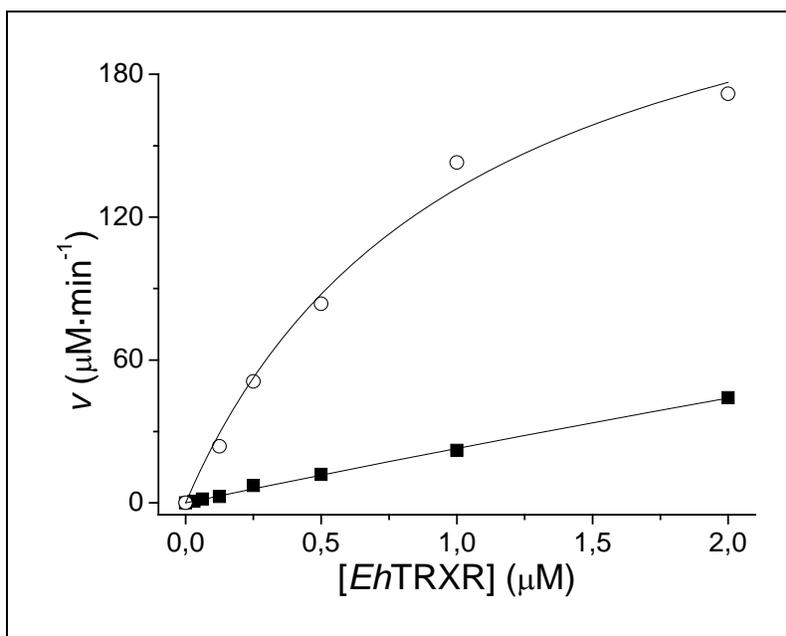


Fig. 4.1.37: Velocidad de oxidación de NADPH catalizada por *Eh*TRXR en ausencia (!) y en presencia de MBQ 500 μM (-). Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0.

Estudios cinéticos en estado estacionario demostraron que *EhTRXR* siguió una cinética de saturación hiperbólica tipo Michaelis-Menten para ambas quinonas (Fig. 4.1.38 y Fig. 4.1.39). En adición, la reducción de quinonas a expensas del NADPH por la *EhTRXR* siguió un mecanismo de tipo “ping-pong”, demostrando poseer una alta eficiencia catalítica para la reducción de estos compuestos, similar a lo observado en la reducción de TRX. Los parámetros cinéticos para MBQ y DTBBQ se detallan en la Tabla 4.1.10. La enzima mostró poseer mayor afinidad por la quinona más sustituida, DTBBQ, que por MBQ, no obstante, se obtuvo una mayor k_{cat} para la segunda, probablemente debido al alto potencial de reducción que presenta MBQ [210 mV (Cenas y col., 2004)].

Quinona	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
MBQ	92	568	$1,03 \cdot 10^5$
DTBBQ	7	57	$1,37 \cdot 10^5$

Tabla 4.1.10: Parámetros cinéticos para la reducción de quinonas por *EhTRXR*.

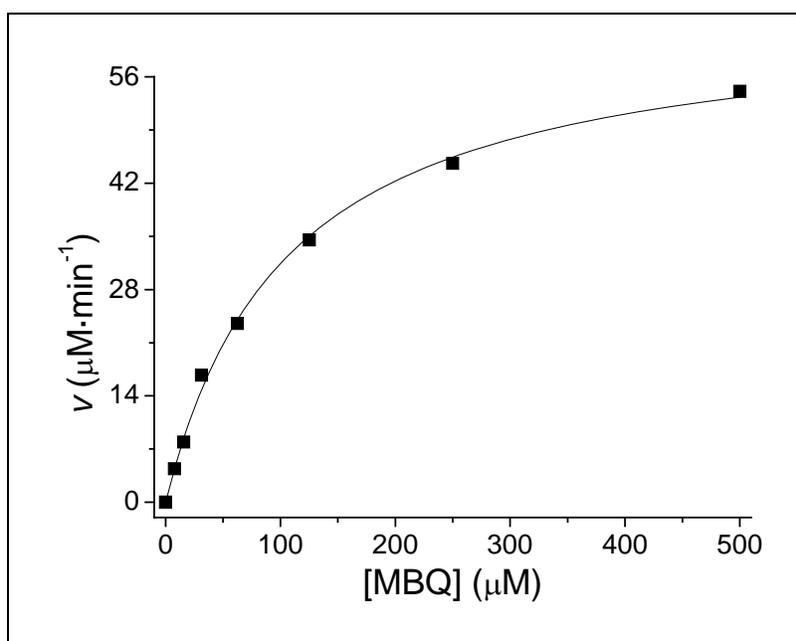


Fig. 4.1.38: Curvas de saturación de MBQ para *EhTRXR*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0 con una concentración fija y saturante de NADPH (300 μM) y concentraciones variables de MBQ.

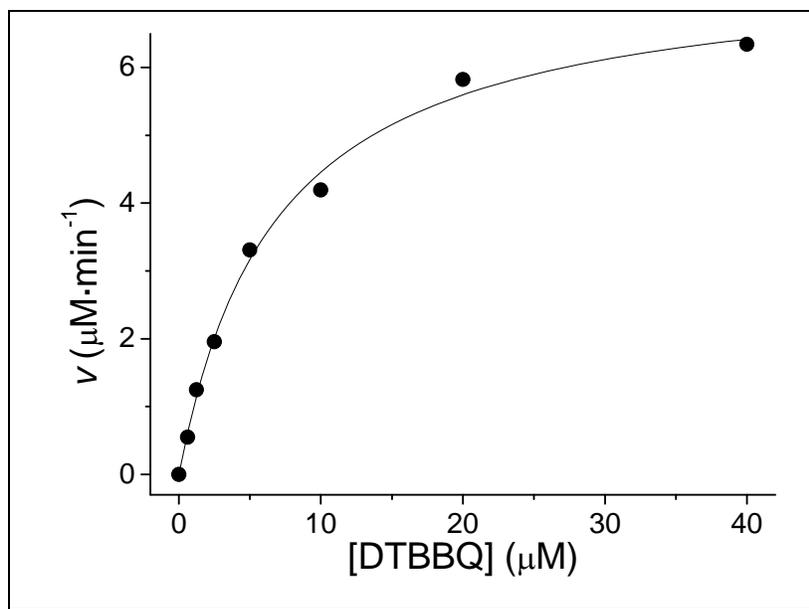


Fig. 4.1.39: Curvas de saturación de DTBBQ para *EhTRXR*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0 con una concentración fija y saturante de NADPH (300 μM) y concentraciones variables de DTBBQ.

Un fenómeno muy interesante fue el observado en relación a la capacidad de estas quinonas de inhibir la actividad disulfuro reductasa de la enzima. Se evaluó la reducción de DTNB en presencia de diferentes concentraciones de MBQ o DTBBQ. A concentración fija y saturante de NADPH, y variables de DTNB, MBQ actuó como un inhibidor mixto respecto a DTNB con un K_{ic} de 2,5 μM y un K_{iu} de 3,7 μM (Fig. 4.1.40). Esto indicaría que el mecanismo de reducción de esta quinona sería independiente al de reducción de disulfuros (probablemente en forma directa vía FADH_2 , similar al O_2). Esto se corroboró mediante el mecanismo de inhibición del producto de reacción NADP^+ , el cual a concentración fija y saturante de NADPH y concentraciones variables de MBQ, actuó como un inhibidor competitivo respecto a MBQ, con un K_i de 550 μM . En adición, la actividad quinona reductasa con MBQ fue insensible a la inactivación por metales pesados, Cu^{2+} y Zn^{2+} , presentando IC_{50} superiores a 200 μM para ambos metales (Fig. 4.1.41). Por otro lado, DTBBQ mostró un perfil diferente, actuando como inhibidor competitivo respecto a DTNB, con un K_i de 105 μM . El producto de reacción NADP^+ actuó como un inhibidor mixto respecto a DTBBQ (K_i no determinados). La reducción de esta quinona fue sensible a inactivación por Cu^{2+} y Zn^{2+} , exhibiendo IC_{50} de aproximadamente 2,6 μM para ambos metales (Fig.4.1.41).

Estos ensayos demostraron que *Eh*TRXR podría reducir quinonas sustituidas con un mecanismo análogo a la reducción de sustratos disulfuros. No se ha observado inactivación de la enzima durante la reducción de ambas quinonas, alcanzándose en todos los casos una oxidación estequiométrica de NADPH respecto a la cantidad de quinona presente en el medio de reacción. Los hallazgos obtenidos son comparables a lo reportado para las TRXR de *A. thaliana* y de mamífero, así como en el caso de aquellas pertenecientes a otros miembros de la familia piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasas como por ejemplo, lipoamida dehidrogenasa, glutatión reductasa y tripanotión reductasa (Bironaite y col., 1998; Cenas y col., 2004).

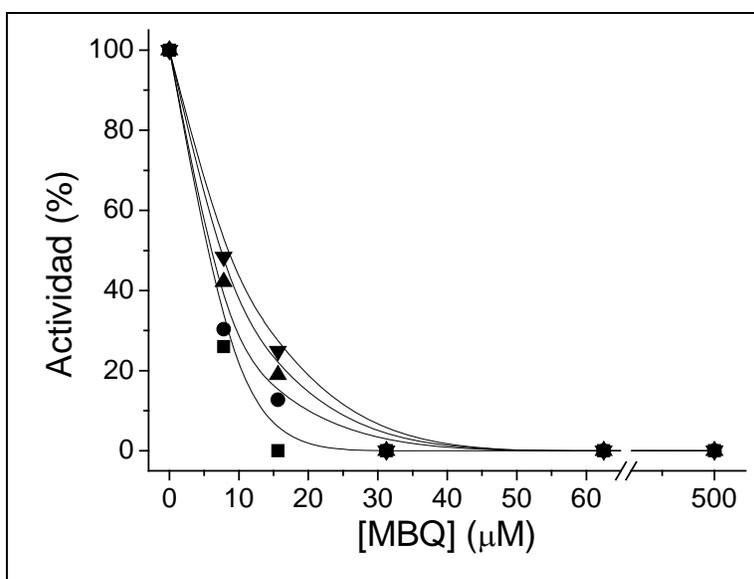


Fig. 4.1.40: Inhibición de la actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR por MBQ. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0 en presencia de concentraciones fijas de NADPH (300µM) y DTNB (!) 0,5; (.) 0,75; (7) 1; y (B) 5 mM y concentraciones variables de MBQ.

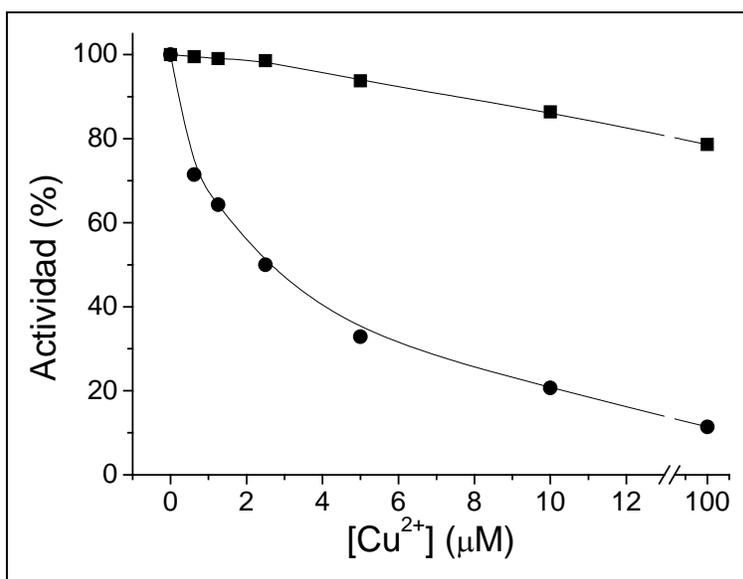


Fig. 4.1.41: Inhibición de la actividad quinona reductasa de *Eh*TRXR por Cu^{2+} . Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0 en presencia de NADPH 300 µM; (!) MBQ 500 µM o (.) DTBBQ 30 µM; y concentraciones variables de Cu^{2+} .

4.1.5.4. Estudio de la actividad diaforasa de *Eh*TRXR.

El azul de metileno (MB) y la eosina B (EB) son compuestos tricíclicos sintéticos con importante acción antiparasitaria, actuando sobre organismos tales como *P. falciparum*, *T. brucei* y *Toxoplasma gondii* (Massimine y col., 2006; Buchholz y col., 2008a; Buchholz y col., 2008b). Se ha demostrado la acción antimalárica en humanos del MB combinada a la quimioterapia convencional. Los mecanismos de acción de estos compuestos varían pero todos se caracterizan por relacionarse a vías pro-oxidantes, interaccionando con enzimas claves en el metabolismo antioxidante: TRXR y GR en *P. falciparum*, TR en *T. brucei* y dihidrofolato reductasa en *T. gondii* (Massimine y col., 2006; Buchholz y col., 2008a; Buchholz y col., 2008b). En vista de estos antecedentes se ha estudiado la interacción entre la reductasa amébrica y el MB ó la EB. En una primera aproximación, se investigó la potencialidad de estos compuestos como sustratos de *Eh*TRXR, para lo cual se evaluó la oxidación de NADPH a 340 nm en presencia de EB o MB. Como se muestra en la Fig. 4.1.42, no hubo incremento de la velocidad de oxidación de NADPH en presencia de EB (30 μ M), ni aún a concentraciones mayores (500 μ M) de este compuesto, observándose únicamente la actividad oxidasa intrínseca de la enzima. Por otro lado, se observó un aumento en el consumo de NADPH cuando a la mezcla de reacción se le adicionó MB (30 μ M). En ausencia de la enzima se pudo apreciar que el MB reacciona directamente con el NADPH, pero a menor velocidad. Esto demostró que únicamente el MB actuó como un sustrato aceptor de electrones para la enzima.

La reducción de MB [$E^{\circ}_{\text{MB/leucoMB}}$ de 11 mV (Buchholz y col., 2008b)] por la *Eh*TRXR siguió una cinética de saturación del tipo Michaelis-Menten (Fig. 4.1.43), estimándose un K_m para MB de 20 μ M y una k_{cat} de 210 min^{-1} , la eficiencia catalítica calculada fue de $1,75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Los parámetros cinéticos estimados para MB son similares a los reportados para otras flavoenzimas, como GR de *P. falciparum* y TR de *T. brucei* (Buchholz y col., 2008a; Buchholz y col., 2008b). La eficiencia catalítica para la reducción de MB por *Eh*TRXR indicó que este compuesto es un excelente sustrato para esta enzima, ya que cataliza 100000 veces la reacción espontánea entre NADPH y MB [$k = 3,6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Buchholz y col., 2008b)]. La presencia de *Ec*TRX (5 μ M) aumentó levemente la eficiencia catalítica de reducción de MB ($2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lo que sugiere que esta última podría ceder equivalentes de reducción a este compuesto en forma conjunta con *Eh*TRXR.

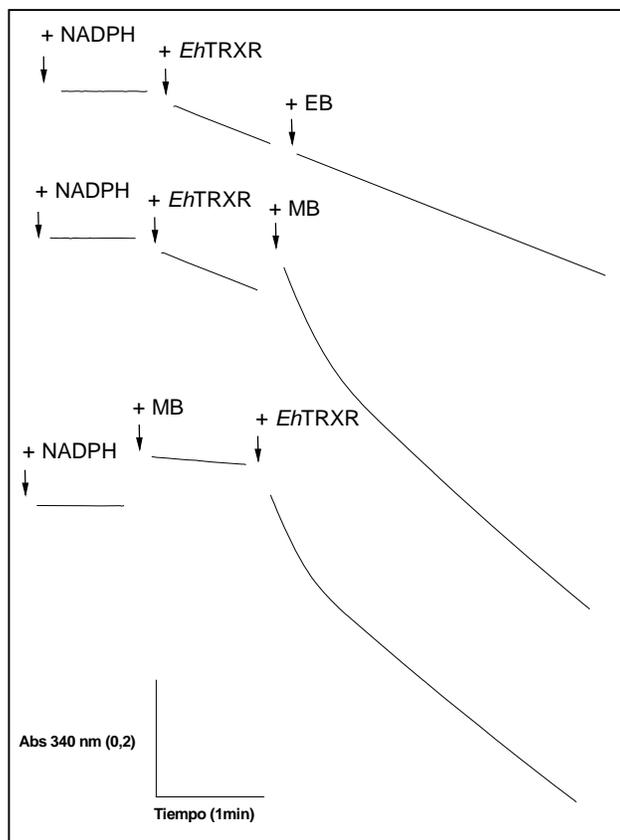


Fig. 4.1.42: Actividad diaforasa de *EhTRXR*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0, en presencia de *EhTRXR* 0,2 μM ; NADPH 200 μM y EB o MB 30 μM .

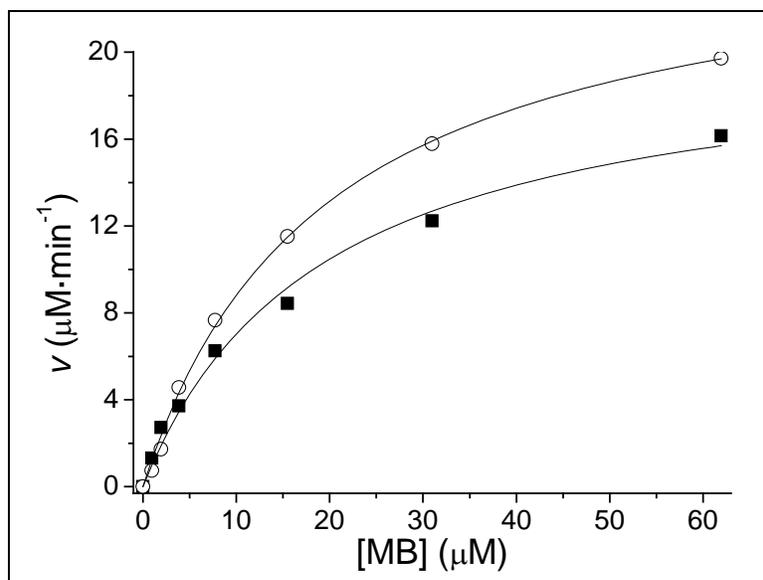


Fig. 4.1.43: Cinética de reducción de MB por *EhTRXR*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0 en presencia de NADPH 200 μM , en ausencia (!) y presencia (-) de *EcTRX* 5 μM y diferentes concentraciones de MB.

El MB es reducido a leucoMB, el cual en condiciones aeróbicas es oxidado de nuevo a MB, generando peróxido de hidrógeno como producto de la reacción (Buchholz y col., 2008a). Esto fue verificado en un ensayo espectrofotométrico siguiendo la oxidación/reducción de MB a 630 nm. Cuando a las mezclas de reacción que contenía MB y NADPH se le adicionaron diferentes concentraciones de *Eh*TRXR, se observó que a bajas concentraciones de ésta, la variación en la absorbancia a 630 nm no era significativa, aún cuando el consumo de NADPH continuaba su curso. Ésto indicó que la velocidad de autooxidación de leucoMB era suficientemente alta en relación a la de reducción enzimática como para mantener “constante” la concentración de MB. Por el contrario, a altas concentraciones de la enzima la reducción de MB se mantuvo “forzada” observándose una caída de la absorbancia hasta cero (reducción completa de MB a leucoMB), hasta consumo completo del NADPH, luego de esto se observó el incremento en la absorbancia hasta volver a los valores de partida (Fig. 4.1.44). Esto demostró que, en forma continua, el leucoMB es oxidado por el O₂ a MB, siendo la enzima la encargada de reforzar su reducción a expensas de la coenzima reducida. El efecto observado dependerá del balance entre la velocidad de reducción de MB catalizada por la enzima y la velocidad de autooxidación de leucoMB.

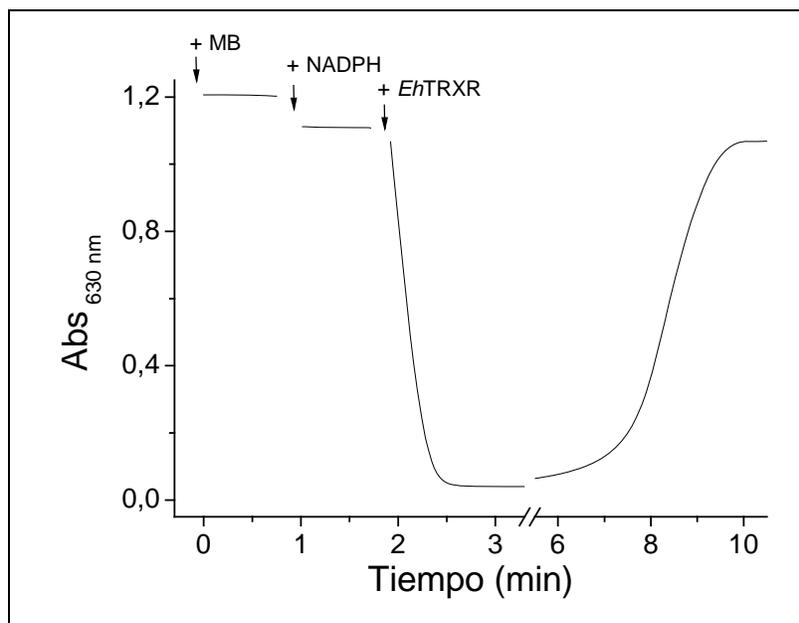


Fig. 4.1.44: Cinética de reducción/oxidación de MB. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7,0, en presencia de NADPH 200 μ M; MB 30 μ M y *Eh*TRXR 0,3 μ M.

De forma equivalente a lo realizado para las quinonas, se evaluó si EB y MB poseían capacidades de inhibir de la actividad disulfuro reductasa, utilizando DTNB como sustrato. A concentración fija y saturante de NADPH, y variables de DTNB, MB actuó como un inhibidor mixto con respecto a DTNB, exhibiendo un fuerte componente competitivo. Los valores de las constantes de inhibición calculadas fueron: K_{ic} de $3 \mu\text{M}$ y K_{iu} de $106 \mu\text{M}$ (Fig. 4.1.45). Estos resultados indicaron que el mecanismo de reducción de este compuesto estaría más relacionado a la vía de reducción de disulfuros en los cuales intervienen los tioles reactivos de la enzima. Esto último sería consistente con un mecanismo de adición-desplazamiento, descrito para compuestos tioles como GSH o ditiolos como $\text{T}(\text{SH})_2$, o proteínas ditiolos como TRX y TXN (Buchholz y col., 2008a). Esto se corroboró mediante el mecanismo de inhibición del producto de reacción NADP^+ ; el cual, a concentración fija y saturante de NADPH y concentraciones variables de MB, actuó como un inhibidor mixto respecto a MB, con una K_{ic} de $2,85 \text{ mM}$ y una K_{iu} de $5,91 \text{ mM}$. Por otro lado, la EB no ejerció ningún tipo de inhibición sobre la actividad reductasa de la enzima en el rango de concentraciones evaluado ($7\text{-}1000 \mu\text{M}$).

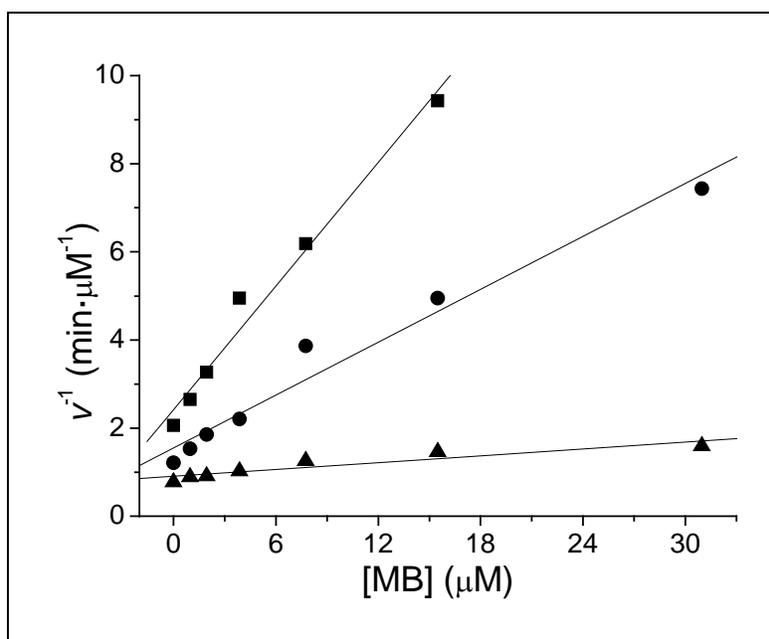


Fig. 4.1.45: Gráfico de Dixon para inhibición de la actividad disulfuro reductasa de *EhTRXR* por MB. Los ensayos se realizaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 7,0 en presencia de concentraciones de fijax de NADPH ($200 \mu\text{M}$); DTNB (!) 0,5; (.) 1; y (7) 5 mM y concentraciones variables de MB.

4.1.5.5. Inhibición de *Eh*TRXR por aceites esenciales.

Los aceites esenciales vegetales (AE) son mezclas complejas de sustancias químicas que pueden ser utilizados en forma alternativa o adjunta a la terapia antiparasitaria convencional. Existen AE con actividades antiparasitarias de amplio espectro, siendo algunos inmunomoduladores de la interacción huésped-parásito, por estimulación de las defensas del huésped. La emergencia de parásitos resistentes a la quimioterapia convencional destaca la importancia de los AE como una opción terapéutica que se suma al conjunto de agentes antiparasitarios (Cowan, 1999; Anthony y col., 2005).

Para la realización del estudio se extrajo AE de peperina (*Minthostachys mollis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) mediante destilación por arrastre con vapor. Inicialmente, se evaluó la potencialidad de los AE para inhibir la actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR, para ello se monitoreó la reducción de DTNB a 405 nm en presencia de diferentes cantidades de AE. Las diluciones de los AE se realizaron en DMSO, manteniendo la misma proporción del solvente en todos los ensayos [no mayor a 1% (v/v)]. Como se muestra en la Fig. 4.1.46, el AE de tomillo mostró un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima (IC_{50} de 18 y 28 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en ausencia y en presencia de *Ec*TRX, respectivamente), mientras que el AE de peperina no afectó la actividad en las cantidades evaluadas.

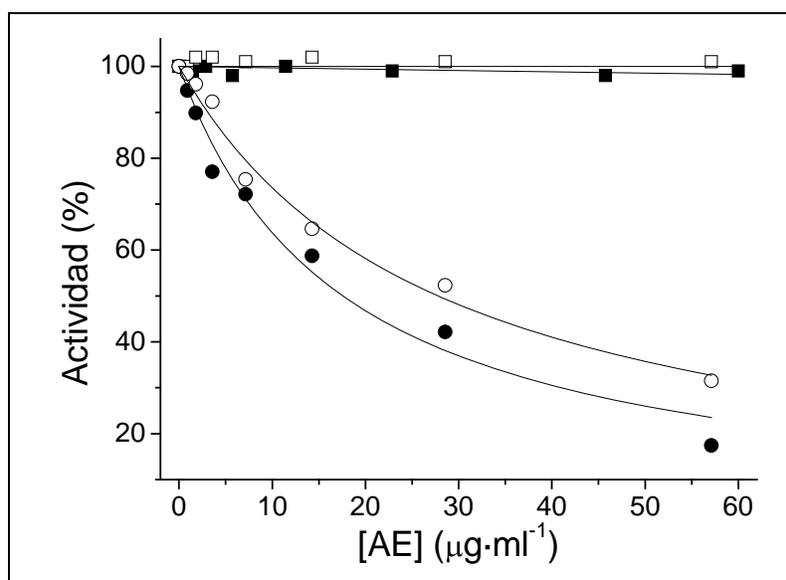


Fig. 4.1.46: Inhibición de actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR por AE. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0, en presencias de DTNB 5 mM; en presencia (abierto) y ausencia (cerrado) de *Ec*TRX 5 μM y diferentes cantidades de AE de tomillo (cuadrado) y peperina (círculo).

Para elucidar si la inhibición de la actividad disulfuro reductasa ocurría por inactivación de la enzima, se preincubó a la *Eh*TRXR con la cantidad máxima de AE empleada en el ensayo anterior ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de NADPH (para mantener a la enzima en estado reducido), por un período de 20 min. En paralelo se realizó un control de estabilidad de la enzima en iguales condiciones pero omitiendo al AE. De estos ensayos se pudo observar una leve inactivación de la enzima realizada por el AE de tomillo (Fig. 4.1.47), manteniéndose el entre el 60-70% de la actividad, mientras que el AE de peperina no mostró efecto alguno sobre ésta (Fig. 4.1.47). Los resultados de este experimento, sumado a los obtenidos anteriormente, permiten concluir que el efecto inhibitorio se debería, *a priori*, a que algunos componentes del AE de tomillo actuaron principalmente como inhibidores reversibles, sin inactivarla en forma significativa.

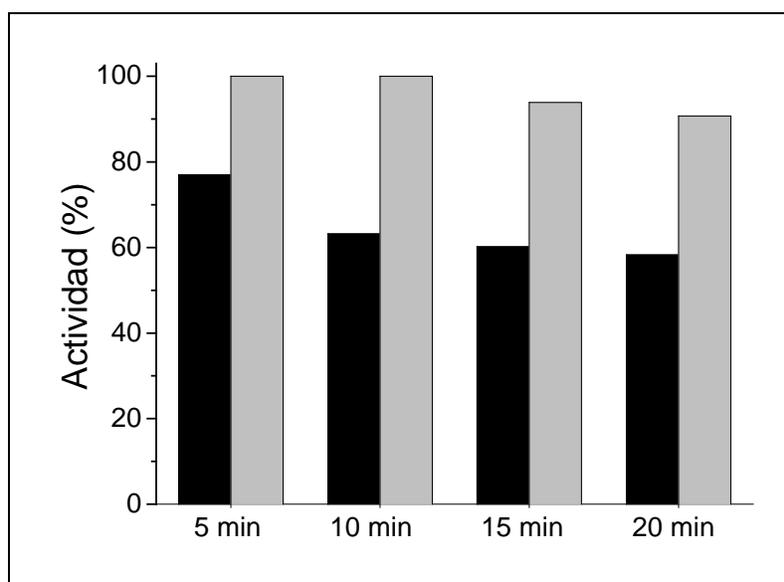


Fig. 4.1.47: Efecto de los AE sobre la estabilidad de *Eh*TRXR. Los ensayos se realizaron a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH 7,0, preincubando *Eh*TRXR $0,1 \mu\text{M}$ con AE de tomillo (negro) o de peperina (gris) a concentración final de $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ en presencia de NADPH $300 \mu\text{M}$ por 5, 10, 15 y 20 min. Luego se evaluó la actividad disulfuro reductasa con DTNB 5 mM , calculándose el porcentaje de actividad remanente respecto al control sin AE.

De forma equivalente, se investigó si los AE eran capaces de inhibir la actividad NADPH oxidasa de la enzima. Para tal fin se monitoreó la oxidación de NADPH a 340 nm en presencia de diferentes cantidades de los AE. Contrariamente a lo esperado, el AE de tomillo estimuló la actividad oxidasa de *Eh*TRXR, aproximadamente 700% en presencia de AE a una concentración de $60 \mu\text{g ml}^{-1}$. El AE de peperina no afectó la actividad en el rango

de cantidades ensayadas (ver Fig. 4.1.48). Para verificar que esta estimulación en la oxidación del NADPH provenga de la actividad oxidasa de la enzima y no de la reacción espontánea entre el NADPH y componentes del AE, se evaluó la oxidación del NADPH en presencia de una cantidad fija de AE de tomillo ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$) y concentraciones variables de la enzima. Como se puede observar en la Fig. 4.1.49, la oxidación del NADPH estimulada por el AE es proporcional a la cantidad de *Eh*TRXR presente en el medio de reacción, obteniéndose una velocidad de recambio de 230 min^{-1} , casi diez veces superior la obtenida en ausencia de AE (punto 4.1.3.4). Estos resultados revelaron que ciertos componentes del AE de tomillo actuarían como sustratos de la enzima, captando los electrones provenientes del NADPH e impidiendo que la enzima lleve a cabo la reducción de sustratos disulfuros. Estas propiedades inhibitorias de la actividad disulfuro reductasa del AE de tomillo fueron similares a las observadas para quinonas (MBQ y DTBBQ) y para el MB.

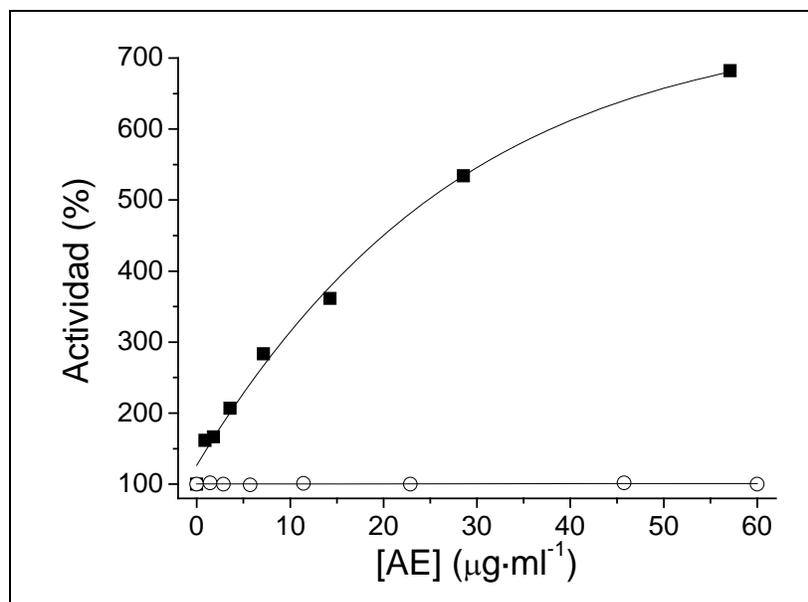


Fig. 4.1.48: Efecto de los AE sobre la actividad NADPH oxidasa de *Eh*TRXR. Los ensayos se realizaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 7,0, en presencias de NADPH $300 \mu\text{M}$ y diferentes cantidades de AE de tomillo (!) y peperina (-).

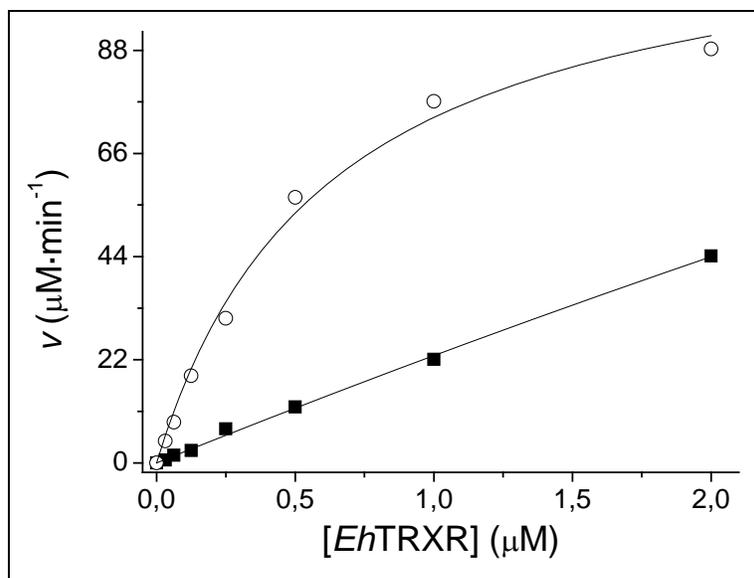


Fig. 4.1.49: Estimulación de la oxidación de NADPH mediada *EhTRXR* por el AE. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,0, con NADPH 300 μM; en ausencia (!) y en presencia (-) de AE de tomillo en concentración final de 60 μg ml⁻¹ a diferentes cantidades de *EhTRXR*.

4.1.6. Inmunolocalización celular del sistema TRX en *E. histolytica*.

Con el objetivo de validar la expresión del sistema TRX en el parásito, se prosiguió a su detección empleando anticuerpos policlonales preparados a partir de *EhTRXR* y *EhTRX41* recombinantes purificadas a homogeneidad. Previo al ensayo de inmunolocalización, se realizó un experimento de *western blot* utilizando los anticuerpos producidos contra un extracto total de trofozoitos de *E. histolytica*. Como se puede apreciar en la Fig. 4.1.50, los anticuerpos contra *EhTRX41* y *EhTRXR* detectaron bandas de proteínas de masa molecular, aproximadamente, 12 y 33 kDa, respectivamente. Estos tamaños correlacionan con las masas moleculares de las bandas de las proteínas recombinantes. Alternativamente, el anticuerpo anti-*EhTRX41* reconoció en forma cruzada a *EhTRX6* y *EhTRX8* recombinantes (resultado no mostrado). Esta reactividad cruzada entre las TRX es coherente con la identidad del 39,8%, entre *EhTRX6* y *EhTRX41* y del 46,2%, entre *EhTRX8* y *EhTRX41* derivada a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos.

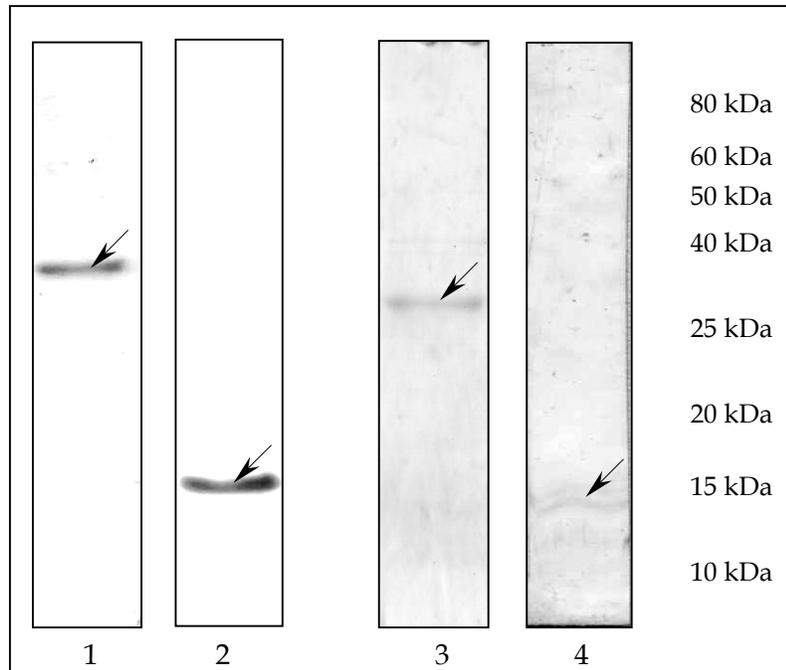


Fig. 4.1.50: Ensayo de *western blot*. 1) *EhTRXR* recombinante (1 μ g) revelada con anti-*EhTRXR* policlonal de conejo; 2) *EhTRX41* recombinante (1 μ g) revelada con anti-*EhTRX41* policlonal de conejo; 3) extracto crudo proveniente de $5 \cdot 10^5$ células revelado con anti-*EhTRXR* policlonal de conejo; y 4) extracto crudo proveniente de $5 \cdot 10^5$ células revelado con anti-*EhTRX41* policlonal de conejo. Como anticuerpo secundario se empleó anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa.

Los resultados del experimento de *western blot* demostraron la expresión de *EhTRXR* y *EhTRX41* en trofozoitos del parásito. Dada la reactividad cruzada que posee el anticuerpo anti-*EhTRX41* contra las otras TRX del parásito, se podría especular que la expresión de estas TRX ocurre como *EhTRX41*. Por otro lado, los anticuerpos policlonales producidos mostraron poseer una especificidad aceptable para realizar los ensayos de localización.

Los ensayos de inmunolocalización utilizando microscopía de epifluorescencia (Fig. 4.1.51), revelaron señales de reconocimiento en toda la célula, lo que indicaría, en principio, una ubicación a nivel del citoplasma del parásito para ambas proteínas. Estos resultados de la localización celular del sistema TRX sería el esperado, teniendo en cuenta los reportes previos sobre la ubicación celular de este sistema en otros organismos (Mustacich y col., 2000; Forman y col., 2004; Smirnoff, 2005). No obstante, de forma tal de poder realizar una localización celular del sistema TRX de manera más específica, se llevó a cabo la inmunolocalización de las proteínas empleando microscopía confocal. A pesar de que ni la secuencia de aminoácidos de *EhTRXR* ni la de *EhTRX41*

incluyen regiones codificantes para péptidos señales o dominios de transmembranas, las señales de reconocimiento demostraron una ubicación subyacente a la membrana plasmática para ambas proteínas. Como se muestra en las Fig. 4.1.52 y 4.1.53, un puntillado fluorescente fue observado en la vista superior e inferior de la célula. Este perfil se transforma en anillos fluorescentes en el interior y en la periferia celular, cuando se tomaron vistas a diferentes profundidades de la estructura celular. La ausencia de señal en el interior de la célula apoya la idea de una única y particular localización del sistema TRX sobre la periferia de la membrana plasmática. Imágenes similares fueron obtenidas para ambas proteínas.

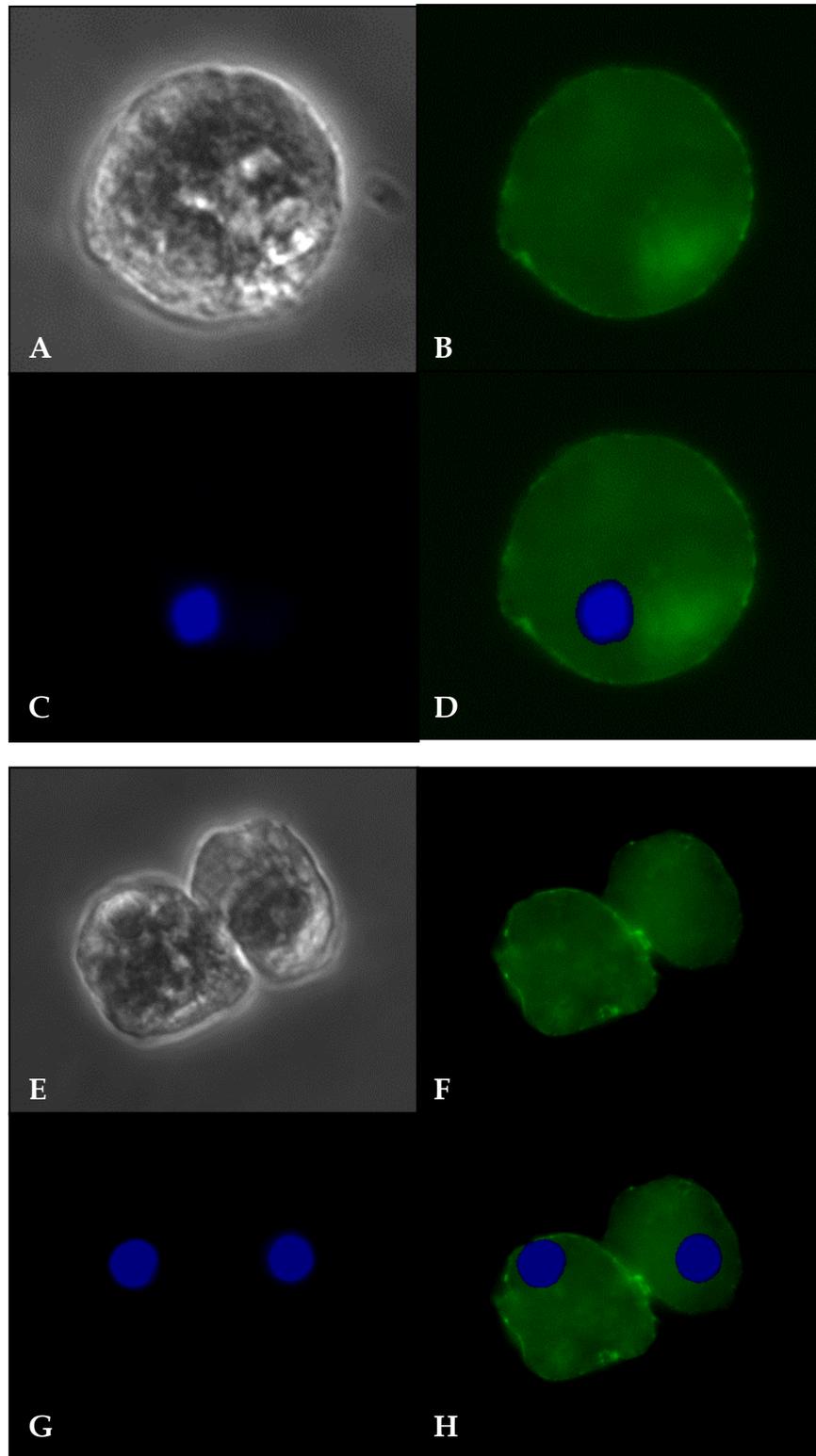


Fig. 4.1.51: Microscopía de epifluorescencia de células de *E. histolytica* utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-*Eh*TRXR (A-D) y anti-*Eh*TRX41 (E-H). (A) y (E) microscopía directa; (B) y (F) tinción fluorescente utilizando anticuerpos primarios y secundario conjugado a FITC; (C) y (G) tinción nuclear fluorescente utilizando DAPI; y (D) y (H) FITC + DAPI.

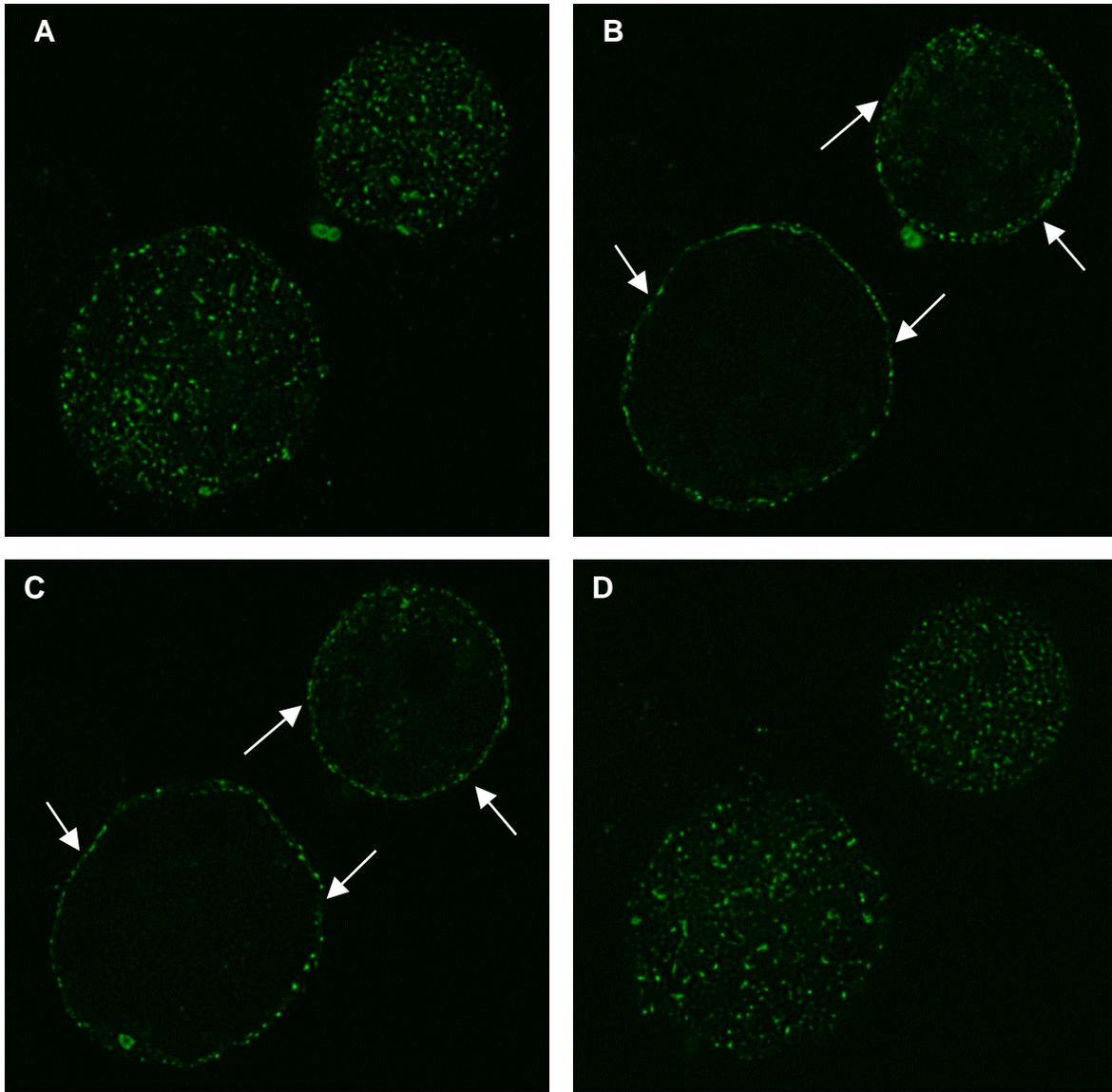


Fig. 4.1.52: Microscopía confocal de barrido por láser (CLSM) de células de *E. histolytica* utilizando anticuerpo policlonal anti-*EhTRXR*. Las imágenes de la localización celular de *EhTRXR* en trofozoitos de *E. histolytica* HM1-1MSS muestran una marca intensa sobre la membrana plasmática (flechas) a diferentes secciones, desde la superficie. (A) 0-4 μm; (B) 4-8 μm; (C) 8-12 μm y (D) 12-16 μm. Los controles negativos se realizaron utilizando el conjugado solo, sin visualizarse tinción (no mostrado).

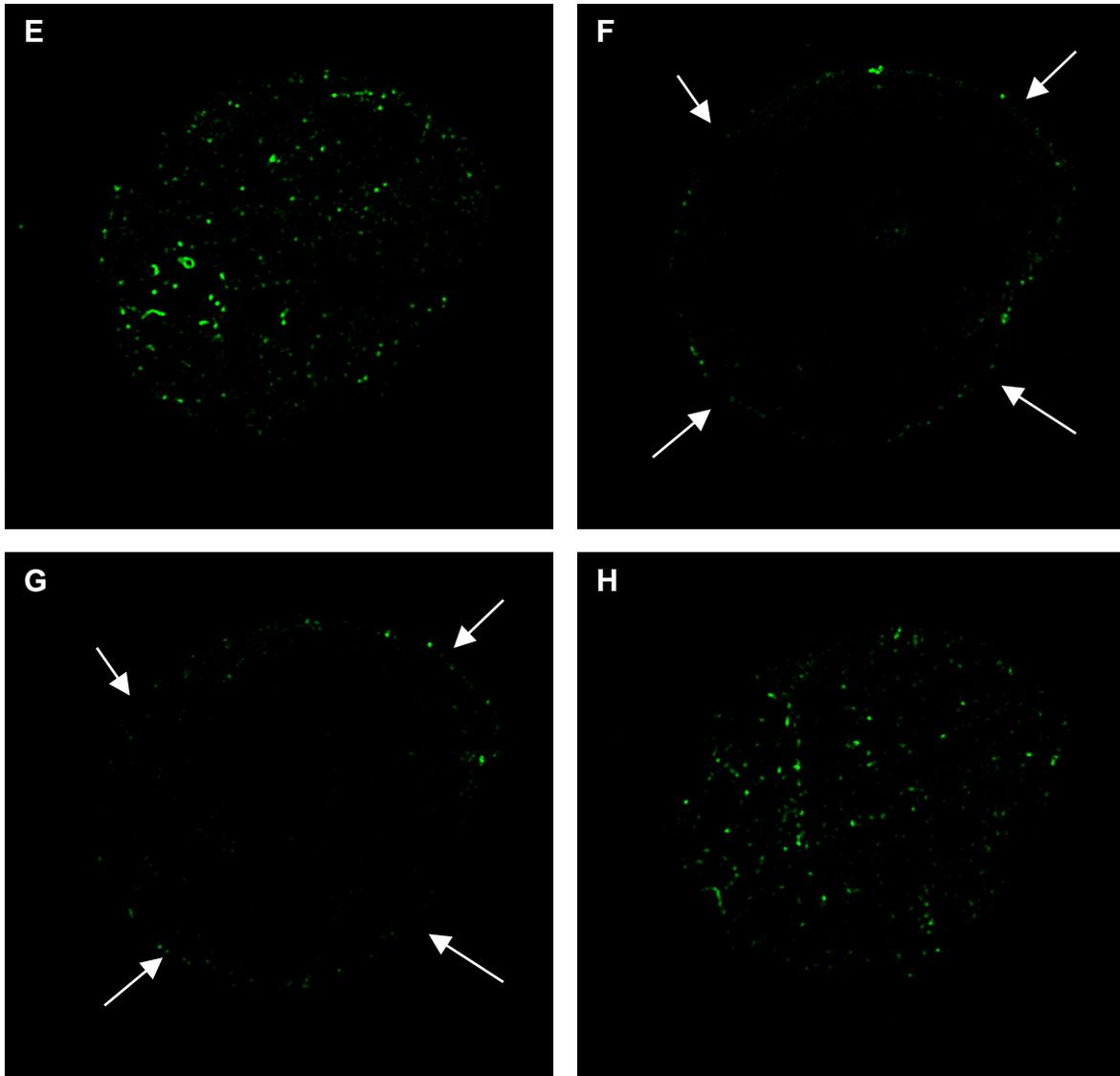


Fig. 4.1.53: Microscopía confocal de barrido por láser (CLSM) de células de *E. histolytica* utilizando anticuerpo policlonal anti-*EhTRX41*. Las imágenes de la localización celular de *EhTRX41* en trofozoitos de *E. histolytica* HM1-1MSS muestran una marca intensa sobre la membrana plasmática (flechas) a diferentes secciones desde la superficie. (E) 0-3 μm ; (F) 3-6 μm ; (G) 6-9 μm y (H) 9-12 μm . Los controles negativos se realizaron utilizando el conjugado solo, sin visualizarse tinción (no mostrado).

4.1.7. Discusión.

El parásito entérico unicelular, *E. histolytica*, es el agente causal de la amebiasis, una enfermedad de distribución mundial que es superada sólo por la malaria (Akbar y col., 2004) si se comparan los datos de morbilidad y mortalidad en cada caso. El parásito normalmente reside en el intestino grueso y ocasionalmente penetra la mucosa intestinal, diseminándose a otros órganos. Un factor de virulencia crítico de este organismo es la capacidad de tolerar condiciones de incremento en la presión de oxígeno y de altas concentraciones de ERO (Akbar y col., 2004; Loftus y col., 2005). El análisis inicial de los datos mostró que el sistema TRX, ampliamente distribuido en muchos organismos, no había sido descrito aún en este patógeno humano.

La secuenciación del genoma de *E. histolytica* es aún incompleta, siendo su terminación una prioridad (Loftus y col., 2005), como ya se describió en la introducción. El análisis inicial de los datos mostró que el sistema TRX, ampliamente distribuido en muchos organismos, no había sido descrito aún en este patógeno humano. La información actual disponible (The Wellcome Trust, Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit) no concuerda completamente con los reportes previos que describían distintos componentes moleculares de las vías metabólicas redox y de detoxificación de ERO en el parásito. Así, la base de datos reporta secuencias correspondientes a genes codificantes a rubreritrina (131.m00144), FeSOD (384.m0041), *Ehp29* o *Eh2CysPrx* (298.m00058) y cuatro isoformas de flavoproteína A (secuencias 6.m00467; 65.m00171; 155.m00084 y 146.m00121). Sin embargo, las secuencias correspondientes a tripanotión reductasa y *Ehp34* no están registradas. Curiosamente, en el proyecto genoma vigente se identificaron seis secuencias putativas asignadas a proteínas de la familia de TRX, dos secuencias correspondientes a un gen duplicado que codifica para TRXR (secuencias 386.m00036 y 23.m00296) y secuencias codificantes para cuatro isoformas de TRX (41.m00230; 8.m00422; 111.m00121 y 6.m00418). Este análisis puso de manifiesto que los componentes moleculares asignados al metabolismo redox en *E. histolytica* debían ser revisados.

Para establecer la funcionalidad de la información disponible en el proyecto genoma de *E. histolytica* en relación a la presencia del sistema TRX, se llevó a cabo el clonado molecular de los genes codificantes para la *EhTRXR*, para las cuatro isoformas de la *EhTRX* y para la *Eh2CysPrx*. Los seis genes fueron expresados en sistemas procariotas

adecuados, las proteínas recombinantes fueron obtenidas como fusión a una cola de poli-His o como fusión a MBP (*EhTRX6*), purificadas y evaluadas en su capacidad de actuar como mediadores redox.

Todas las TRX amébicas obtenidas presentan el motivo clásico WCGPC en su sitio activo, así como residuos aminoácidos conservados relevantes para su correcto plegamiento y actividad biológica, como ya se describió en resultados. Tanto la *EhTRX8* como la *EhTRX41* poseen el tamaño molecular característico de las TRX citoplasmáticas, no detectándose, mediante el uso de herramientas informáticas, ningún péptido señal o dominios de transmembrana en sus secuencias de aminoácidos. Alternativamente, la *EhTRX6* presentó una pequeña secuencia de 11 aminoácidos N-terminal no conservada en ninguna de las otras tres TRX restantes. Esta secuencia presentó características anfipáticas. No se encontró función alguna para esta secuencia peptídica (por ejemplo vehiculización intracelular o anclaje a membranas) utilizando distintos servidores informáticos específicos. Probablemente, esta corta secuencia sea responsable de la inestabilidad de la proteína luego de ser purificada, como proteína de fusión a poli-His, por lo que fue necesario expresarla fusionada a MBP para aumentar su estabilidad en solución.

Por otra parte, las observaciones *in silico* muestran que la *EhTRX111* presenta un dominio de transmembrana de 38 aminoácidos en el extremo C-terminal, pudiendo actuar como un sistema de anclaje a algún sistema de membranas. Esta característica es extraña en moléculas como TRX, presentándose un antecedente de una TRX con dominio de transmembrana que se localiza a nivel de retículo endoplasmático en células de adenocarcinoma humano (Matsuo y col., 2001; Haugstetter y col., 2005). Frecuentemente, los dominios de transmembrana están presentes en proteínas redox encargadas de la formación de puentes disulfuros a nivel de retículo endoplasmático o en periplasma, tales como PDI (proteína disulfuro isomerasa) presentes en células eucariotas o en componentes del sistema Dsb en bacterias, respectivamente (Banerjee, 2008). Posiblemente, la *EhTRX111* participe como componente de algún sistema equivalente en la formación de puentes disulfuro localizado sobre retículo endoplasmático del parásito, o alternativamente, como parte de un sistema encargado de la protección contra el ataque oxidativo a nivel de la membrana plasmática, distribuyendo equivalentes de reducción a proteínas antioxidantes tales como *Eh2CysPrx*. El claro entendimiento de la función fisiológica de la *EhTRX111* en el parásito será motivo de continuidad de los estudios.

Una característica interesante es que las TRX de *E. histolytica* presentan otras cisteínas adicionales a las presentes en el sitio redox activo: *EhTRX8* y *EhTRX111* poseen sólo un residuo extra; mientras que *EhTRX6* presenta dos residuos más y *EhTRX41* tiene cuatro cisteínas adicionales. Probablemente estos residuos estén encargados de modular la actividad de estas proteínas, mediante la formación de agregados diméricos o superiores, vía puentes disulfuro, como es el caso de la TRX humana (Weichsel y col., 1996; Hashemy y col., 2008). La formación de asociaciones covalentes de estas proteínas fue percibida experimentalmente, cuando se almacenaron a 4 °C en ausencia de agentes reductores, observándose la formación de agregados covalentes insolubles. Alternativamente, las estructuras tridimensionales de las *EhTRX6*, *EhTRX8* y *EhTRX41*, generadas por modelado por homología (Fig. 4.1.54), presentan a estos residuos de cisteína adicionales expuestos al solvente, sobre la superficie de la molécula, orientadas en forma opuestas a las cisteínas que participan del sitio activo. Las TRX recombinantes obtenidas (*MBP-EhTRX6*, *EhTRX8* y *EhTRX41*) exhibieron actividad biológica, siendo capaces de actuar como mediadores redox en el ensayo de reducción de insulina.

La expresión del gen *ehtrxr* (secuencia 23.m00296) dio origen a una proteína cuya secuencia aminoacídica concuerda con miembros de la familia de TRXR de bajo peso molecular. La proteína presentó un espectro de absorción característico de las flavoproteínas, determinándose la presencia de una molécula de FAD unida no covalentemente a cada subunidad. Los resultados de los experimentos de SDS-PAGE no reductor y PAGE nativos, revelaron que *EhTRXR* posee una estructura nativa homodimérica, en donde las subunidades están entrecruzadas por puentes disulfuros. Los resultados obtenidos exhibieron que los residuos de cisteína que formarían estos puentes disulfuros entre las subunidades no serían los mismos que intervienen en la función catalítica de la enzima, dada la falta de reducción observada de los puentes disulfuros que entrecruzan a las subunidades cuando se incubó a la enzima en presencia de NADPH (reductor fisiológico específico). Por otro lado, se observó la reducción completa de todos los puentes disulfuros al incubar a *EhTRXR* en presencia de DTT (reductor no específico). Estas características estructurales son conservadas por otras TRXR de otras fuentes (Hirt y col., 2002). Por otro lado, existen pocos informes de TRXR en donde las subunidades se encuentren unidas por puentes disulfuro; como es el caso de la enzima de leguminosas, especialmente de *Medicago truncatula*, en donde los autores atribuyen a una cisteína en el

C-terminal de la proteína la responsabilidad de la unión covalente entre subunidades (Alkhalfioui y col., 2007). Esta cisteína C-terminal está conservada en *Eh*TRXR (Cys³⁰¹), con lo cual podría estar ocurriendo un caso similar al de la enzima vegetal (ver Fig. 4.1.55).

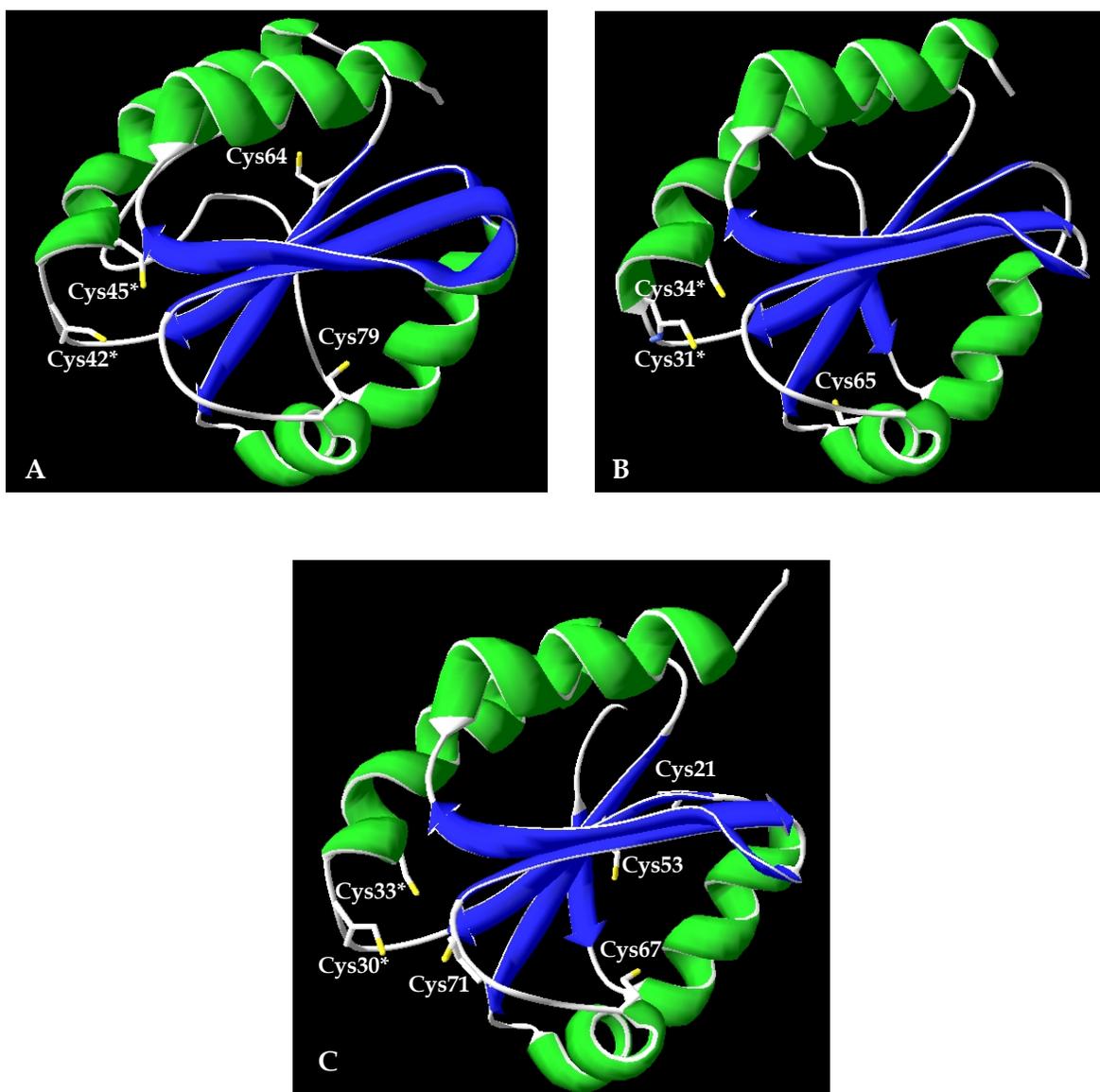


Fig. 4.1.54: Representación de cintas de modelo tridimensional de *Eh*TRX reducidas: A) *Eh*TRX6; B) *Eh*TRX8 y C) *Eh*TRX41. Los modelos tridimensionales fue generado mediante el programa Modeller v9.4. (*) Indica los residuos de Cys que forman parte del motivo redox activo WCGPC.

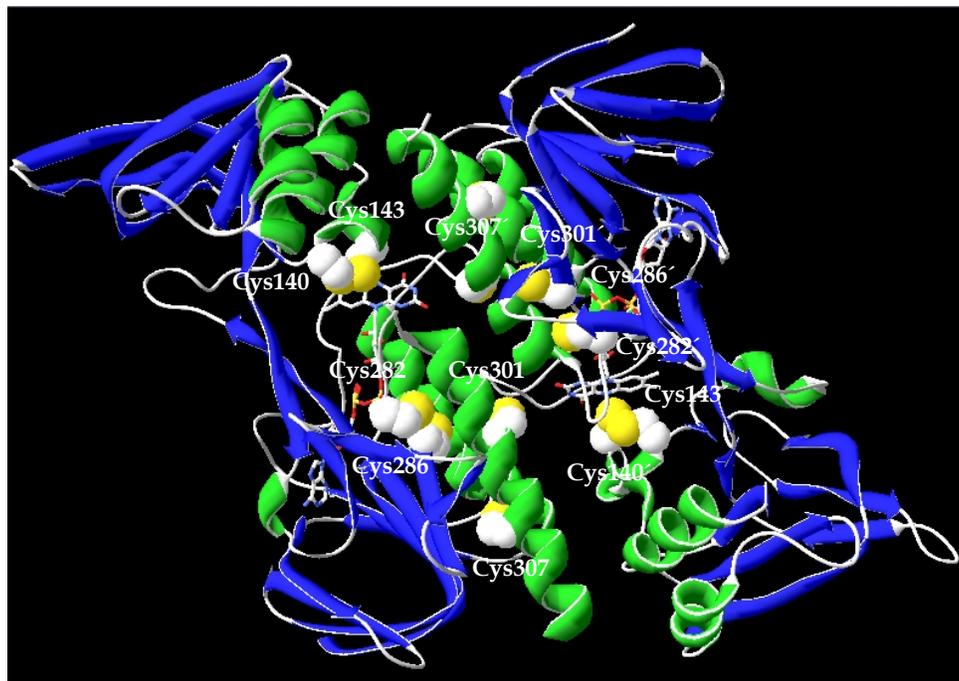


Fig. 4.1.55: Representación de cintas de modelo tridimensional de especie oxidada de *Eh*TRXR. El modelo fue generado mediante el programa Modeller v9.4. Se representa en forma de esferas de Van der Waals los residuos de cisteína que presenta el homodímero.

La *Eh*TRXR recombinante presentó actividad disulfuro reductasa dependiente de NADPH, capaz de reducir en forma directa al DTNB. En base a los resultados de los ensayos cinéticos en estado estacionario, la enzima siguió un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong híbrido” con cinética de saturación para ambos sustratos. En concordancia con este tipo de mecanismo, se observó una inhibición competitiva del NADP^+ respecto al NADPH y una inhibición mixta respecto al sustrato disulfuro (DTNB). Estos resultados dan soporte a la idea de que el NADP(H) y el DTNB (o TRX) interaccionan con dominios separados en la TRXR (ver Fig. 4.1.56), de forma similar a otras piridina nucleótido disulfuro reductasas, como GR (Cenas y col., 2004). En adición, la actividad disulfuro reductasa mostró gran sensibilidad a la inhibición por metales pesados, pudiéndose verificar la participación de los tioles reactivos de la enzima en la reacción de reducción de sustratos disulfuros (DTNB).

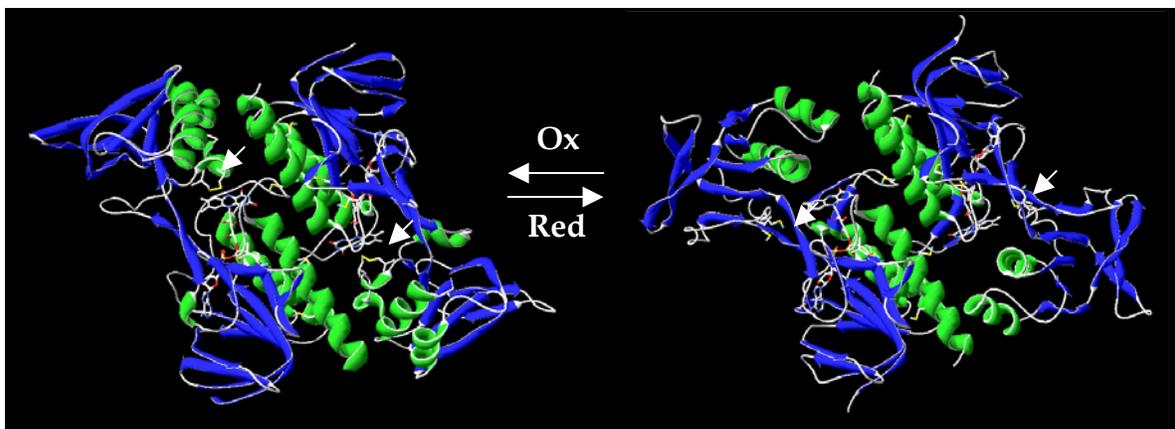


Fig. 4.1.56: Representación de cintas de modelos tridimensionales de especies oxidadas y reducidas de *Eh*TRXR. Los modelos fueron generados utilizando el programa Modeller v9.4. Como se puede observar el disulfuro reactivo (flecha) se encuentra orientado hacia el FAD en la especie oxidada. Por el contrario, en la especie reducida, los tioles reactivos (flecha) se exponen hacia el solvente (para poder interactuar con los sustratos oxidantes) mediante la rotación del dominio de unión a NAD(P)H.

Es de resaltar que la *Eh*TRXR puede emplear al NADH como dador de electrones con eficiencia comparable a la del NADPH en la reducción de DTNB. El motivo de unión a coenzimas GXGXXG/A es común a muchas enzimas dependientes de NAD(P)H, siendo determinante para la especificidad entre NADH y NADPH la presencia de residuos ácidos (Glu o Asp) o básicos (Arg y Lys), respectivamente, en el dominio de unión a la coenzima (Reynolds y col., 2002). La presencia de residuos ácidos, produce una especificidad por NADH, dado que la carga negativa de los residuos produce una repulsión electrostática sobre la coenzima fosforilada. Este es el caso de AhpF, donde en el dominio de unión a la coenzima existe la presencia de residuos Asp. Por otro lado, la presencia de residuos básicos estimula la especificidad por el NADPH, dado que estos residuos interaccionan de forma electrostática con el grupo fosfato de la coenzima (Fig. 4.1.57). No obstante, la presencia de residuos básicos en el dominio de unión no excluiría la posibilidad de emplear NADH como sustrato. La mayoría de las TRXR pueden emplear NADH como sustrato pero con muy baja afinidad, con concentraciones en el rango de mM (Serrato y col., 2002; Cheng y col., 2007), existiendo pocos casos de enzimas que emplean NADH con eficiencias comparables a la de NADPH (Reynolds y col., 2002; Alkhalfioui y col., 2007). La *Eh*TRXR posee un motivo de unión de la coenzima reducida conservado en todas las

TRXR: GGGGDAA, más la presencia de los residuos Arg¹⁸³ y Arg¹⁸⁴, los cuales interaccionarían con el grupo fosfato del NADPH (Fig. 4.1.58).

Los resultados obtenidos han demostrado que *Eh*TRXR puede emplear tanto NADPH como NADH como cofactor reducido, indicando no seguir una de regla de las TRXR en forma estricta: una alta especificidad por NADPH como sustrato reductor. No obstante, resulta interesante la siguiente pregunta: ¿cuál sería la ventaja fisiológica de poder emplear ambas coenzimas reducidas por la reductasa amébrica? Posiblemente, la capacidad de utilizar NADPH o NADH como dadores de electrones sería una propiedad importante, ya que aumentaría el espectro de obtención de equivalentes de reducción bajo condiciones adversas; por ejemplo, en condiciones de estrés oxidativo. Por otro lado, la utilización de ambas coenzimas podría ser consecuencia del metabolismo intrínseco del parásito. Como se mencionó anteriormente, este organismo carece de un ciclo de Krebs activo, obteniendo poder reductor principalmente de la vía glicolítica. (McLaughlin y col., 1985; Loftus y col., 2005). Esta vía metabólica genera NADH como coenzima reducida, la cual podría actuar en como dador de electrones para la transhidrogenación del NADP⁺, mediante la acción de una transhidrogenasa ubicada a nivel de membrana plasmática (Weston y col., 2001). Otra posible vía de regeneración de NAD(P)H es la oxidación de alcoholes y aldehídos, mediante la acción de alcohol deshidrogenasas y aldehído deshidrogenasa, respectivamente. En este parásito se han descrito la existencia de estas enzimas [siendo el caso más estudiado la alcohol deshidrogenasa 2 (Shimon y col., 2006)], las cuales son capaces de regenerar al estado reducido ambas coenzimas (Kumar y col., 1992; Bruchhaus y col., 1994b). Estudios sobre cultivos de *E. histolytica* han demostrado que este tipo de enzimas son esenciales para la supervivencia de este parásito (Espinosa y col., 2004). Adicionalmente, este parásito podría obtener poder reductor a través de la fagocitosis de bacterias de la flora normal o enterocitos durante la infección intestinal. Esta idea es soportada por informes que describen la capacidad de suplementar componentes metabólicos esenciales para el parásito mediante predación de otros organismos unicelulares (Orozco y col., 1983). Estas formas de obtención de poder reductor podrían ser de importancia para la generación de NADPH, dado que este parásito posee una vía pentosa fosfato incompleta, careciendo de las enzimas generadoras de NADPH por la descarboxilación oxidativa de la glucosa-6P a ribulosa-5P (McLaughlin y col., 1985; Loftus y col., 2005).

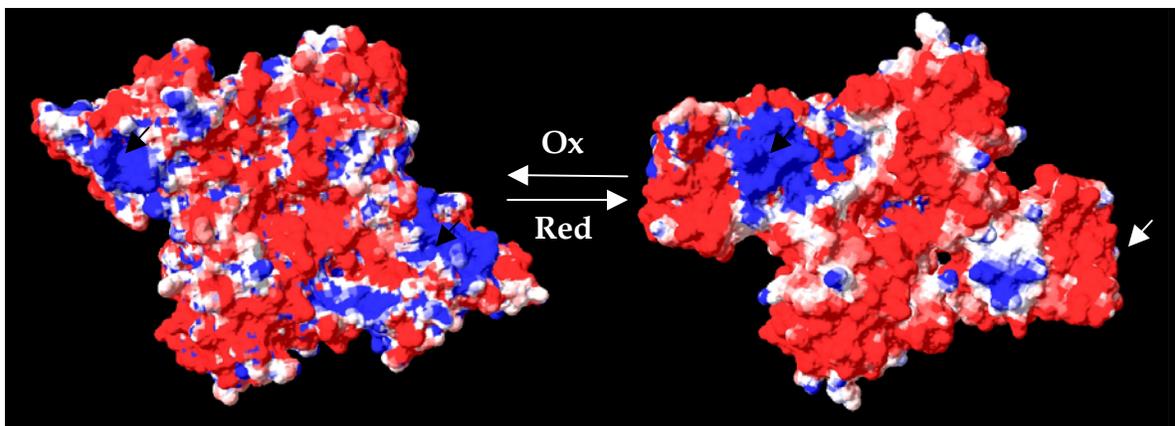


Fig. 4.1.57: Potencial electrostático de *EhTRXR* oxidada y reducida. El potencial electrostático ajustado sobre la superficie molecular fue calculado utilizando la ecuación de Poisson-Boltzmann mediante el programa Swiss-pdb viewer v4.0, utilizando una constante dieléctrica del medio, de 80, la constante dieléctrica de las proteínas de 4 y una fuerza iónica de 0,0 mol l⁻¹. Las cargas positivas son representadas en azul y las negativas son representadas en rojo. Las flechas indican el sitio de unión a NADPH.

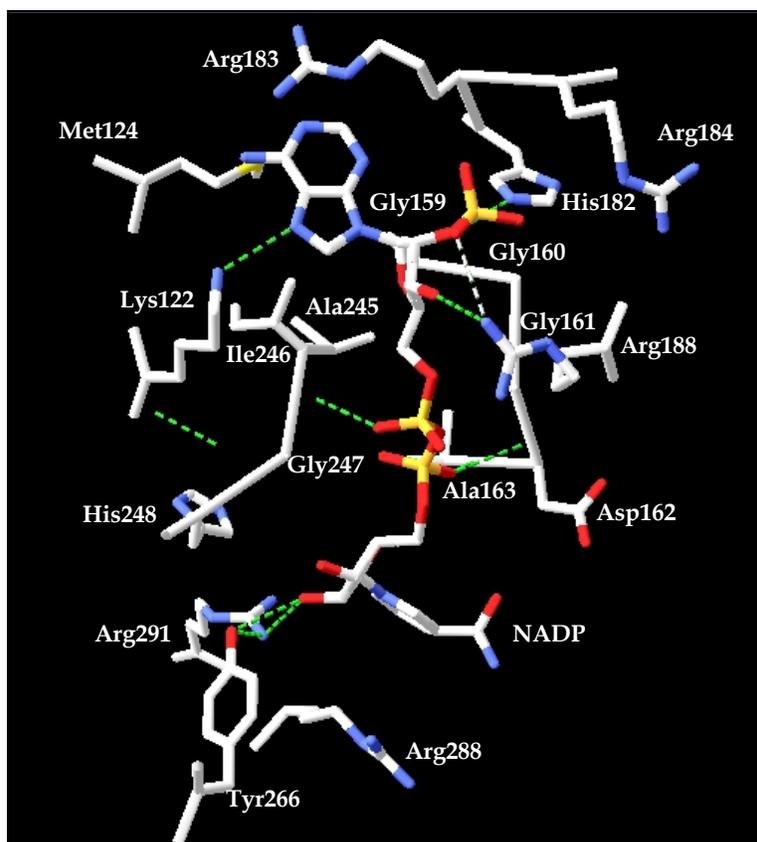


Fig. 4.1.58: Representación esquemática del sitio de unión de NADPH de *EhTRXR* en complejo con NADP⁺. El modelo fue generado con el programa Modeller v9.4. En la imagen se presentan los residuos aminoacídicos que interaccionan con la coenzima a una distancia máxima de 4 Å. Se puede apreciar la orientación de los residuos His¹⁸², Arg¹⁸³ y Arg¹⁸⁴ sobre el grupo fosfato del NADP⁺, los que contribuyen a la estabilización de la unión por interacciones electrostáticas y puentes de hidrógenos.

Los resultados obtenidos exhibieron que *EhTRXR* posee una importante actividad NAD(P)H oxidasa generadora de H_2O_2 , a partir de la reducción directa del O_2 . Se comprobó que la vía de reducción de O_2 es independiente de la de reducción de disulfuros, esto fue comprobado por ensayos de inhibición por metales pesados, observándose que la actividad oxidasa fue cien veces menos sensible a éstos respecto a la actividad disulfuro reductasa. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado para diferentes flavoenzima (incluyendo a otras disulfuros reductasas y oxidasas), en donde se propone que la reducción del O_2 ocurre por reacción directa de éste con $FADH_2$ (grupo prostético de la enzima en forma reducida), sin intervención de ningún tiol reactivo contenido en la enzima (Bruchhaus y col., 1998; Fang y col., 2005). Para este organismo anaerobio fermentador, fisiológicamente, la actividad oxidasa actuaría como primera etapa en una vía de eliminación del oxígeno molecular, mediante su reducción parcial a H_2O_2 . Esta actividad, por otro lado, estimula la generación de una especie reactiva, la cual deberá ser neutralizada (por reducción a H_2O), mediante sistemas antioxidantes (por ejemplo por *Eh2CysPrx* o cisteína) para evitar daños celulares. Casos similares fueron descritos para otros protozoos anaeróbicos como *T. vaginalis* (Coombs y col., 2004). Es de resaltar que esta actividad oxidasa podría ser utilizada como principio para el diseño y generación de nuevas drogas terapéuticas que “conviertan” a una enzima antioxidante en un sistema prooxidante, impidiendo que la enzima efectúe su actividad disulfuro reductasa, estimulando la generación de H_2O_2 , actividad potencialmente letal para el parásito.

La *EhTRXR* recombinante fue activa con las tres TRX amébicas y también, con la TRX de origen bacteriano, *EcTRX*, siendo capaz de catalizar la reducción de estos sustratos disulfuros. Los parámetros cinéticos derivados, muestran que *EhTRXR* posee una alta afinidad por las TRX amébicas, incluso por una TRX heteróloga como la de *E. coli*, siendo los valores de K_m similares entre si. Esta alta afinidad por la *EcTRX*, no es común en L-TRXR, teniendo en algunos casos K_m de uno o dos órdenes superiores a los K_m para las TRX homólogas (Jacquot y col., 1994; Coombs y col., 2004). En adición, la enzima mostró eficiencias catalíticas similares para TRX a las obtenidas para otras TRXR de otras fuentes (Akif y col., 2008). Las eficiencias catalíticas calculadas para la reducción de *EhTRX8*, *EhTRX41* y *EcTRX* presentaron el mismo orden de magnitud, lo que indicó que las tres TRX podrían ser sustratos equivalentes para la reductasa amébica. No ocurrió lo mismo en el caso de MBP-*EhTRX6*, donde la *EhTRXR* presentó una menor eficiencia catalítica para su

reducción (un orden de magnitud menor respecto a la otras TRX). Esta diferencia puede deberse a posibles impedimentos estéricos producidos por la proteína de fusión unida a la *Eh*TRX6 (MBP), lo que modificaría su capacidad de reacción pero no, aparentemente, su capacidad de unión (K_m similares a las otras TRX) a la enzima. Algo similar se observó en los ensayos de actividad biológica de las TRX (ensayo de reducción de insulina), en donde MBP-*Eh*TRX6 demostró menor actividad biológica que las otras TRX, requiriendo más tiempo para llevar a cabo la reducción de la insulina.

Los resultados obtenidos han demostrado que la *Eh*TRXR y las *Eh*TRX actuaron como un sistema redox funcional, siendo capaz de catalizar la reducción de sustratos disulfuros fisiológicos tales como GSSG, cistina y TS_2 . En forma general, se puede detectar una tendencia respecto a la eficiencia catalítica de reducción cuando se analizan los diferentes sustratos disulfuros. Se obtuvo la mayor capacidad para la reducción de insulina (modelo de proteína sustrato disulfuro), seguido por las eficiencias de reducción de cistina y TS_2 (las cuales se encuentran en el mismo orden) y por último, la menor capacidad calculada fue para la reducción de GSSG. Es de resaltar que las constantes de velocidad calculadas para la reducción de cistina (aproximadamente $10^2 M^{-1} s^{-1}$) se corresponden a las reportadas para la reducción de GSSG por *Ec*TRX, *Pf*TRX1 (TRX1 de *Plasmodium falciparum*) y *Dm*TRX1 (TRX1 de *Drosophila melanogaster*) (Kanzok y col., 2001; Schmidt y col., 2003). En adición, las constantes de reducción para TS_2 y GSSG aquí calculadas son comparables con las constantes de reducción de TS_2 y GSSG por *Tb*TRX (10^2 y $23 M^{-1} s^{-1}$, respectivamente) (Schmidt y col., 2003). En el caso de la MBP-*Eh*TRX6, en donde las constantes de velocidad son un orden de magnitud menor a las otras *Eh*TRX, se observa la misma tendencia, en donde la reducción de cistina es más eficiente que la reducción de GSSG.

En concordancia con los informes existentes, los resultados obtenidos han demostrado que la *Eh*TRXR cataliza la transferencia reversible de equivalentes de reducción desde el NADPH hacia TRX- S_2 (*Eh*TRX y *Ec*TRX). Esta propiedad fue aprovechada para determinar parámetros termodinámicos de los componentes del sistema TRX del parásito, como los potenciales de reducción. El potencial de reducción macroscópico de la *Eh*TRXR fue determinado en -292 mV. Este valor se encuentra próximo a los potenciales de reducción informados para TRXR de rata y TRXR de *Drosophila melanogaster*, -294 mV y -293 mV, respectivamente (Cenas y col., 2004; Cheng y col., 2007).

Los potenciales de reducción estimados para *Eh*TRX8, *Eh*TRX41 y MBP-*Eh*TRX6 fueron de -286 mV, -283 mV y -277 mV, respectivamente, los cuales están acorde con los valores determinados para este tipo de proteínas en otras fuentes (Schmidt y col., 2003; Forman y col., 2004). Los potenciales de reducción estimados son más negativos que los correspondientes a disulfuros de bajo peso molecular [-220 mV para el par cistina/cisteína, -240 mV para el par GSSG/GSH y -242 mV para el par TS₂/T(SH)₂ (Schmidt y col., 2003)] considerados metabolitos redox claves.

Los resultados obtenidos poseen una relevancia fisiológica, teniendo en cuenta el papel de los tioles de bajo peso molecular, regenerados por el sistema TRX. En primer lugar, en *E. histolytica*, la cisteína fue caracterizada como un componente importante de la defensa antioxidante (Tekwani y col., 1999; Muller y col., 2003) y como el tiol intracelular más importante, cuya síntesis puede ser realizada de *novoo* a partir de sulfato (Nozaki y col., 2005; Krishna y col., 2007). Tres secuencias nucleotídicas codificantes para posibles cisteína sintasas pueden ser encontradas en el proyecto genoma de este parásito (secuencias 3.m99156; 93.m00149 y 328.m00057). No obstante, no existen evidencias sobre la existencia de cistina reductasas en esta ameba, lo que da valor adicional a la capacidad redox del sistema TRX de ser el responsable de la regeneración de cisteína a partir de la cistina. En segundo lugar, el tripanotión, inicialmente descrito en tripanosomátidos (Krauth-Siegel y col., 1987; Muller y col., 2003; Jaeger y col., 2006), es otro tiol intracelular que podría estar disponible en *E. histolytica* (Ondarza y col., 1997; Ondarza y col., 1999a; Ondarza y col., 1999b; Ondarza y col., 2005). Esto último fue duramente cuestionado (Ariyanayagam y col., 1999), lo que concuerda con que ningún gen que codifique una reductasa del disulfuro es encontrado en el proyecto genoma. Más allá de esta controversia, si el tripanotión estuviera presente en *E. histolytica*, su reducción debería estar asociada al sistema TRX. Adicionalmente, el glutatión, que se encuentra en muy bajos niveles en el parásito (Ariyanayagam y col., 1999), es un sustrato necesario para la síntesis de tripanotión. La ausencia de una glutatión reductasa en *E. histolytica* (Sen y col., 2007), sugiere que, de forma similar a los otros tioles intracelulares, el sistema TRX podría estar involucrado funcionalmente en el mantenimiento del glutatión en su estado reducido en el parásito.

El óxido nítrico (NO·) es una importante molécula de defensa, producido por células del epitelio intestinal y macrófagos frente al ataque de un amplio espectro de

patógenos (Nathan y col., 2000; Siman-Tov y col., 2003). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el $\text{NO}\cdot$ juega un rol importante en la muerte de células de *E. histolytica* mediada por macrófagos (Siman-Tov y col., 2003). Como parte de la cascada de reacciones, a nivel intracelular, el $\text{NO}\cdot$ puede combinarse con tioles de bajo peso molecular para formar S-nitrosotioles, tales como S-nitrosoglutatión (GSNO) y S-nitrosocisteína (CySNO). Si bien estos compuestos actúan como reguladores en los niveles de $\text{NO}\cdot$, en condiciones de estrés oxidativos, pueden actuar como agentes oxidantes, atacando a tioles de cisteínas esenciales en las proteínas y modificar sus funciones biológicas (Al-Sa'doni y col., 2000; Bindoli y col., 2008). En estudios previos se demostró el efecto inhibitorio del GSNO sobre la actividad proteolítica de cisteína proteasas, enzimas consideradas como factores de virulencia importantes para la citopatogenicidad de este parásito (Siman-Tov y col., 2003). Adicionalmente, en este mismo trabajo se informó el mismo efecto inhibitorio del GSNO sobre la alcohol dehidrogenasa 2, enzima importante para la supervivencia de este organismo (Siman-Tov y col., 2003).

En el presente trabajo se logró demostrar la capacidad de la *Eh*TRXR de catalizar en forma directa la reducción dependiente de NADPH de GSNO y CySNO. La enzima no mostró diferencias significativas sobre la afinidad por estos compuestos; no obstante, presentó menor actividad con GSNO que con CySNO (aproximadamente siete veces menos respecto CySNO). Estas diferencias de reactividad podrían deberse a una especificidad de la enzima por CySNO como parte de un sistema contra el estrés generado por ERN. Posiblemente, la cisteína presente en el parásito reaccionaría con el $\text{NO}\cdot$ exógeno, generando CySNO, la que podría ser regenerada a cisteína y HNO (nitrosilo, el cual puede reaccionar con O_2 para generar $\text{NO}_2\cdot$) por reacción con la *Eh*TRXR. Mecanismos similares son propuestos para GSNO en *P. falciparum* y en mamíferos (Nikitovic y col., 1996; Rahlfs y col., 2002). Este mecanismo podría ser similar con GSNO, pero teniendo en cuenta que los niveles de GSH en el parásito son escasos, sería mas probable que la cisteína tenga un papel importante en la formación de S-nitrosotioles *in vivo*. Las eficiencias catalíticas calculadas para GSNO son similares a las obtenidas para otras TRXR (Nikitovic y col., 1996; Rahlfs y col., 2002), no existiendo reportes sobre la reducción de CySNO por TRXR. En adición, la presencia de TRX incrementó la eficiencias catalíticas, principalmente con GSNO (lográndose equiparar a la de reducción de CySNO), demostrando actuar en forma

sinérgica junto a la *EhTRXR* en la reducción de *S*-nitrosotioles. Lo expuesto aquí da soporte a la idea de que la *EhTRXR*, y alternativamente la *TRX*, actuaría como un mecanismo importante en la regulación de los niveles de *S*-nitrosotioles intracelulares, principalmente *CySNO*, en *E. histolytica*, cuando el parásito se encuentra bajo el ataque de las defensas oxidativas del huésped.

Como se ha descrito para otros organismos, el sistema *TRX* podría estar involucrado en diferentes procesos fisiológicos en *E. histolytica*, tales como la regulación de la síntesis de ADN, la transcripción, el crecimiento celular y la apoptosis. Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que el sistema *TRX* fue también capaz de catalizar, como un sistema redox acoplado a la *Eh2CysPrx* (un miembro de la familia de las peroxirredoxinas), la reducción dependiente de NADPH de hidroperóxidos, particularmente *t*-bOOH. Este sistema redox podría ser funcional en el parásito, utilizando el poder reductor del NAD(P)H para la eliminación de ERO en un mecanismo que involucra a las *EhTRX* que, luego de ser reducidas en una reacción catalizada por *EhTRXR*, reducen a *Eh2CysPrx*, la cual finalmente transforma al peróxido en una molécula de agua y, alternativamente, compuestos orgánicos no tóxicos. Esta idea es apoyada por un informe reciente, donde se ha comprobado un rol destacado de esta peroxirredoxina para la supervivencia de los trofozoitos bajo condiciones de estrés oxidativo, así como en la patogénesis de la amebiasis (Ramos-Martinez y col., 2008; Tazreiter y col., 2008).

Los ensayos cinéticos en estado estacionario determinaron que la reducción de hidroperóxidos por *Eh2CysPrx*, asociada a *EhTRXR* y *EhTRX*, exhibió una cinética de saturación hiperbólica para ambos sustratos, *EhTRX* reducida y *t*-bOOH. La reacción enzimática siguió un mecanismo de tipo "ping-pong", acorde con los mecanismos reportados para otras peroxirredoxinas de otras fuentes. La *Eh2CysPrx* mostró una baja eficiencia catalítica en su actividad peroxidasa ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con *t*-bOOH), comparada a la selenoenzima glutatión peroxidasa [$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Wood y col., 2003b)] o a catalasa [$10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Wood y col., 2003b)]. Esta baja eficiencia en la reducción de hidroperóxidos podría ser compensada por la gran abundancia de esta proteína en el parásito, la que ha sido descrita por varios autores (Bruchhaus y col., 1997). Ocho copias funcionales del gen codificante para esta proteína están registradas en el proyecto genoma. La enzima posee una insignificante actividad glutatión peroxidasa, comparada a la actividad con *TRX*, exhibiendo un *K_m* para GSH de 7 mM y una eficiencia catalítica de reducción por GSH de

6,75 M⁻¹ s⁻¹, casi cinco órdenes de magnitud menor a la eficiencia obtenida para TRX. El hecho de que las TRX sean mejores sustratos reductores que el GSH para *Eh2CysPrx*, podría justificarse termodinámicamente. Las TRX poseen un potencial más reductor (valor promedio de -280 mV), necesitando menores concentraciones para realizar la transferencia de electrones hacia la *Eh2CysPrx* (-240 mV). Por otro lado, el GSH (-240 mV) posee un potencial redox similar al de la Prx por lo que necesitará una mayor concentración para poder desplazar el equilibrio hacia la reducción de la proteína amébrica.

De manera de evaluar la estructura molecular nativa de la *Eh2CysPrx* se realizaron ensayos de SDS-PAGE no reductor y PAGE nativos, los que revelaron que esta proteína posee una estructura nativa homodecamérica (más probablemente homopentadimérica como la mayoría de las 2CysPrx), de masa molecular aproximada 300 kDa, en donde las subunidades se encontraban entrecruzadas por puentes disulfuros. Esta es una característica no descrita anteriormente para otros miembros de la familia Prx. Es de resaltar la presencia de un extremo N-terminal rico en residuos de Cys, no conservado en otras 2CysPrx. Posiblemente éste sería responsable de la capacidad de entrecruzamiento entre las distintas subunidades mediante puentes disulfuro. En adición, esta gran estructura oligomérica covalente fue insensible a la sobreoxidación con H₂O₂ o *t*-bOOH (observado en los ensayos de PAGE y de actividad enzimática). Teniendo en cuenta lo anterior, se podría especular que este extremo N-terminal actúe como *buffer* redox intramolecular protegiendo a las Cys peroxidáticas de la sobreoxidación. Probablemente, esto sea un mecanismo natural de defensa contra la sobreoxidación de la enzima para el mantenimiento de su actividad biológica; más aún si se tiene en cuenta que en el proyecto genoma de *E. histolytica* no se han hallado genes codificantes para sulfirredoxinas (Loftus y col., 2005), proteínas encargadas de revertir la sobreoxidación de las Prx.

Resultó interesante el dato de que *EcTRX* es un sustrato eficiente tanto para *EhTRXR* como para *Eh2CysPrx* (con eficiencia similares a las TRX homólogas). De esta manera, resulta factible hipotetizar en relación a la posibilidad de *EcTRX* (o TRX provenientes de otros organismos de la flora intestinal humana) de ser funcional en la maquinaria antioxidante del parásito. Esto se basa en el argumento de trabajos previos en los cuales la virulencia de *E. histolytica* fue asociada con la habilidad del parásito de fagocitar bacterias entéricas, siendo *E. coli* uno de los habitantes mas abundantes identificados en el intestino humano (Orozco y col., 1983). Un soporte adicional para este

punto de vista está dado por reportes que demostraron que *EcTRX* es una proteína muy abundante y muy estable y que ciertas proteínas de bacterias podrían ser funcionalmente incorporadas dentro del parásito luego de la fagocitosis (Holmgren y col., 1978; Gleason, 1992).

La expresión de *EhTRXR* y *EhTRX41* (y posiblemente *EhTRX6* y *EhTRX8*) en *E. histolytica* fue confirmada por ensayos de *western blot* de homogenatos totales del parásito, utilizando anticuerpos policlonales específicos. Con el fin de realizar una mejor comprensión de la incidencia de estas proteínas *in vivo*, se efectuó su inmunolocalización celular utilizando los mismos anticuerpos policlonales. El sistema TRX aparece marcadamente debajo de la membrana plasmática de *E. histolytica*, como fue ilustrado por microscopía confocal. Esta localización refuerza la funcionalidad potencial del sistema para la detoxificación de ERO *in vivo*, especialmente considerando que la *Eh2CysPrx* fue previamente identificada también como una enzima con acumulación ectoplasmática (Hughes y col., 2000; Hughes y col., 2003), la cual puede aparecer sobre la superficie celular como una proteína asociada a una lectina de unión a N-acetilgalactosamina (Hughes y col., 2000; Hughes y col., 2003; Sen y col., 2007). Bajo condiciones de estrés oxidativo, la lectina puede “reclutar” a la peroxirredoxina para una protección antioxidante (Sen y col., 2007).

La presencia de *EhTRXR* y *EhTRX41* (también de *EhTRX6* y *EhTRX8*) junto con la *Eh2CysPrx* puede ser asociado a un sistema antioxidante funcionalmente activo como se ilustra en la Fig. 4.1.59. El mecanismo esquematizado en la Fig. 4.1.59 es de algún modo similar al revisado cuando el genoma de *E. histolytica* estuvo disponible (Loftus y col., 2005). Sin embargo, en el presente esquema se proponen la participación de proteínas del parásito que han sido previamente ignoradas y que en este trabajo se ha determinado su potencial relevancia luego de la identificación de sus respectivos genes en el proyecto genoma. De este modo, la vía metabólica representada en la Fig. 4.1.59 podría ser complementada por la contribución de otros componentes tales como FeSOD, rubreritina, flavoproteína A, *Ehp34* o TR. Algunas de estas moléculas fueron caracterizadas en forma previa a la secuenciación del genoma del parásito, mientras que otras requieren de una revisión integral del proyecto genoma.

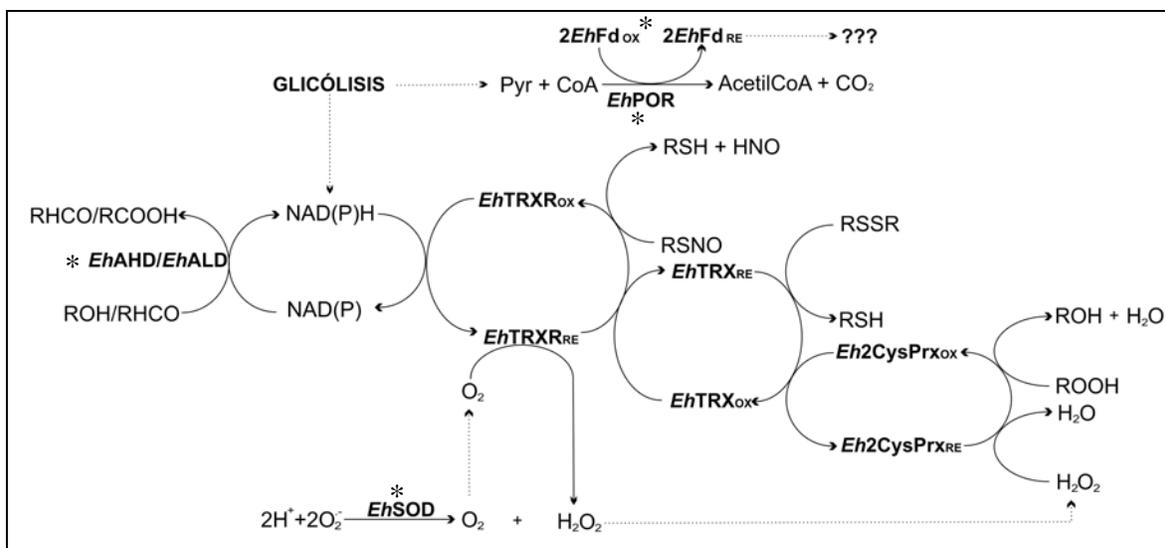


Fig. 4.1.59: Representación esquemática de la vía de detoxificación de ERO y ERN dependiente del sistema TRX en *E. histolytica*. (*) Enzimas caracterizadas previamente al proyecto genoma de *E. histolytica*. AHD: aldehído deshidrogenasa, ALD: alcohol deshidrogenasa, Fd: ferredoxina, POR: piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, SOD: superóxido dismutasa.

Los resultados obtenidos han demostrado que compuestos no fisiológicos, como quinonas y colorantes redox, son buenos sustratos para la EhTRXR, exhibiendo eficiencias catalíticas similares a las obtenidas para sus sustratos fisiológicos (TRX). Los ensayos de inhibición por producto (NADP⁺), así como los perfiles de inhibición de estos compuestos respecto a la actividad disulfuro reductasa (utilizando DTNB), indicaron que el mecanismo de reducción de éstos puede involucrar tanto la vía dependiente de tioles (vía de reducción de disulfuros) como por reducción directa vía flavina (FADH₂) sin intervención de los residuos de Cys reactivos de la enzima. En el caso de la quinona menos sustituida, MBQ, que mostró ser un inhibidor mixto muy eficiente para DTNB ($K_{ic} \approx K_{iu} \approx 2,5 \mu\text{M}$), podría reducirse por interacción con el grupo prostético (FADH₂) sin intervención de los tioles reactivos de la enzima; posiblemente interceptando el flujo de equivalentes de reducción que va desde el FADH₂ hacia el motivo CXXC dentro de la misma enzima.

En el caso de DTBBQ y MB, el mecanismo de reducción determinado involucraría la participación de los tioles reactivos de la enzima, exhibiendo ambos compuestos una fuerte inhibición de tipo competitiva para DTNB (K_i de 105 y 3 μM , respectivamente). Este resultado concuerda con lo reportado para la interacción de quinonas muy sustituidas o completamente sustituidas con TRXR de otras fuentes como de mamífero y de *A. thaliana*,

en donde, además, se ha descrito una inactivación de éstas enzimas por alquilación de sus sulfidrilos reactivos (Bironaite y col., 1998; Cenas y col., 2004). Como se describió en resultados, la *Eh*TRXR no exhibió inactivación por DTBBQ, observándose una oxidación de NADPH en proporciones estequiométricas a la cantidad de esta quinona presente en el medio de reacción. Por otro lado, el tipo de inhibición competitiva de MB observado para la reductasa de *E. histolytica*, no se correlaciona con los resultados obtenidos por otros autores para la GR de humano y de *P. falciparum* o para la TR de *T. brucei* y TRXR de *P. falciparum*, donde el MB se caracterizó como un inhibidor de tipo no competitivo (Buchholz y col., 2008a; Buchholz y col., 2008b). Varios autores han realizados estudios con mutantes de estas proteínas en las cisteínas reactivas, revelando la existencia de una interacción directa entre el grupo prostético reducido de estas flavoenzimas (FADH₂) y el MB. Estos autores describen como responsable de la reducción de MB a la flavina reducida, así como de la actividad diaforasa en general de las disulfuro reductasas (Buchholz y col., 2008b). No obstante, no se debería descartar la posibilidad de que la *Eh*TRXR pueda reducir al MB por un mecanismo independiente a los tioles reactivos (vía flavina reducida), dado que a nivel molecular pueden estar ocurriendo ambos mecanismos y que por los ensayos cinéticos realizados se detecte el más predominante. Esto deberá ser complementado con ensayos realizados con variantes mutantes de la enzima en sus cisteínas esenciales, así como por evaluación de las variaciones en los espectros de absorción de la enzima durante el ciclo catalítico.

Independientemente de las vías de reducción de quinonas o MB por la *Eh*TRXR, estos compuestos mostraron ser inhibidores eficientes de la actividad disulfuro reductasa, presentando bajos valores de K_i . Principalmente el MB demostró actuar como un sustrato subversivo, ya que no sólo fue capaz de captar el flujo de electrones de la enzima impidiendo que ésta pueda cumplir con sus funciones fisiológicas, sino que también actuó como un generador de especies oxidantes (H₂O₂) al reoxidarse en presencia de O₂. Esta acción, fisiológicamente, generaría un ciclo redox en el cual se vea comprometido el balance de oxido reducción, dado que se consumen los equivalentes de reducción en pos de generar especies reactivas oxidantes, como se representa en la Fig. 4.1.60. Si bien todavía restan por realizar pruebas en cultivos de *E. histolytica*, todas las propiedades aquí descritas hacen a las quinonas y al MB modelos de interés para el diseño de nuevos agentes antiparasitarios.

Adicionalmente, existe una razón importante para considerar al MB como un compuesto antiparasitario y es el hecho que cumple con el criterio de droga *BONARIA* (Buchholz y col., 2008b). El acrónimo inglés *BONARIA* deriva de las características: seguro, de eficacia, asequible, certificado y de accesibilidad internacional (Buchholz y col., 2008b). El MB es una droga certificada que ha sido utilizada en trabajos clínicos por muchas décadas, principalmente en clínicas pediátricas como quimioterapia contra metahemoglobinemia congénita y adquirida (Buchholz y col., 2008a; Buchholz y col., 2008b). Estudios *in vitro* y pruebas clínicas han demostrado que este compuesto posee propiedades antimaláricas y antitripanosomales (Buchholz y col., 2008a; Buchholz y col., 2008b). Por lo tanto, el MB es un compuesto importante para ser evaluado, solo o en combinación con otras drogas, contra los casos emergentes de amebiasis resistentes a la quimioterapia convencional.

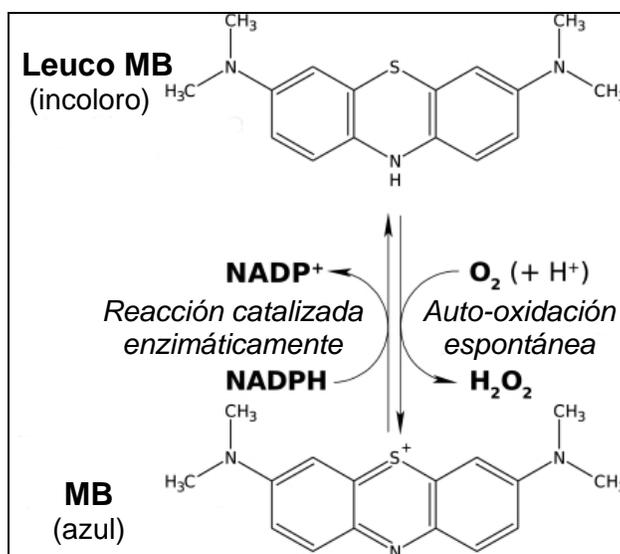


Fig. 4.1.60: MB como sustrato subversivo de *Eh*TRXR. La enzima cataliza la reducción de MB a expensas del NADPH. El leucoMB generado es oxidado por O₂, promovándose un consumo de NADPH y O₂ y la producción de ERO, predominantemente H₂O₂. Imagen adaptada de Buchholz, 2008^a.

Con el fin de encontrar posibles inhibidores de la *Eh*TRXR de origen natural, se evaluaron los efectos de aceites esenciales vegetales (AE) sobre la funcionalidad de *Eh*TRXR. Los ensayos realizados con el AE de tomillo, revelaron que los componentes de este aceite fueron sustratos eficientes para la *Eh*TRXR, incrementando la actividad NADPH oxidasa diez veces respecto a la basal (230 min⁻¹). En adición, este aceite demostró

un potencial inhibitorio sobre la actividad disulfuro reductasa de *EhTRXR*; pero, contrariamente a lo esperado, no por bloqueo de los tioles reactivos e inactivación de la enzima, sino por “competencia” con los sustratos disulfuros por los equivalentes de reducción provenientes del NADPH. Este desvío de los equivalentes de reducción, evitaría que la enzima realice su funciones fisiológicas, “gastando” las fuentes poder reductor, de forma similar a lo observado para quinonas y MB, como se describió anteriormente. Reportes previos han descrito la acción antiparasitaria (contra tripanosomas y leishmania) del AE de tomillo, así como un comprobado efecto pediculicida (Cowan, 1999). Se ha demostrado que la alicina, es un compuesto derivado del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) inhibe el crecimiento de trofozoitos de *E. histolytica* a concentraciones de 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que a menores concentraciones, éste compuesto mostró un efecto inhibitorio *in vitro* de la actividad biológica de cisteína proteasas y alcoholes deshidrogenasas, cercanos al 90% (Cowan, 1999; Anthony y col., 2005). En una prueba realizada en humanos adultos con emulsiones de AE de ajo y orégano (*Origanum vulgare*), suministrados oralmente por seis semanas, redujo la excreción en materia fecal de *Blastocystis hominis*, *E. hartmanni* y *Endolimax nana* por debajo del límite de detección (Cowan, 1999). Los estudios previos y los resultados aquí expuestos apoyan fuertemente la potencialidad de los aceites esenciales como importantes agentes antiparasitarios. Así, la evaluación del potencial antiparasitario del AE de tomillo sobre cultivos del *E. histolytica* como así, el aislamiento y caracterización de los componentes activos abrirá nuevas líneas de trabajo para futuras investigaciones.

Luego de todo lo desarrollado anteriormente, enfatizando el estudio de inhibidores “exclusivos” para la *EhTRXR*, se podría realizar la siguiente pregunta: ¿por qué sería tan importante inhibir a esta enzima? Una respuesta posible sería que si el sistema TRX en *E. histolytica* operase de forma similar a lo esquematizado en la Fig. 4.1.54, una inhibición de la reductasa (primer componente) traería aparejado un desacople en la cascada de óxido-reducción. Esta disfuncionalidad del sistema enzimático, acarrearía la acumulación de *EhTRX-S₂*, y por ende, un aumento en la concentración de RSSR y S-nitrosotioles, los cuales pueden oxidar cisteínas esenciales para la actividad biológicas de ciertas enzimas. En adición, la falta de regeneración de *EhTRX-S₂* al estado reducido impediría la reducción de proteínas sustratos, cuya actividad funcional depende de encontrarse en estado reducido. La disfunción del sistema TRX llevaría a un desabastecimiento de equivalentes

de reducción necesarios para la detoxificación de hidroperóxidos, mediada por *Eh2CysPrx*, produciendo una acumulación de ERO.

Más aún, si el inhibidor de la actividad fisiológica es un sustrato subversivo, podría desviar el flujo de equivalente de reducción hacia el O_2 , generando especies más reactivas (como el H_2O_2 u $O_2^{\cdot-}$), potenciando el efecto desacoplante. Este efecto transformaría a una disulfuro reductasa antioxidante en una enzima prooxidante, lo que generaría un ciclo fútil que contribuiría a la acumulación de ERO a expensas del poder reductor provenientes de las coenzimas, estimulando su consumo y agotamiento. En este escenario se produciría un desbalance en la homeostasis redox de la ameba, el cual podría comprometer seriamente la viabilidad de este parásito. Es por ello que el estudio y validación de *EhTRXR* como posible blanco molecular podría ser de importancia para el diseño de nuevas drogas terapéuticas contra la amebiasis. Esta idea ha sido recientemente respaldada por un trabajo que muestra como el metroimidazol (una droga usualmente utilizada en el tratamiento de la amebiasis) puede unirse a las cisteínas reactivas de *EhTRXR* y *EhTRX* (entre otras proteínas tiol), formando aductos inactivos, lo que trajo una mayor sensibilidad de las células de *E. histolytica* al oxígeno debido su reducida capacidad de detoxificar ERO (Leitsch y col., 2007).

Como conclusión final, este trabajo busca aumentar el conocimiento relacionado a las reacciones que, en *E. histolytica*, están dirigiendo el flujo de equivalentes de reducción, los cuales constituyen un mecanismo metabólico crítico para la supervivencia y virulencia del parásito. El sistema TRX aparece como una herramienta importante no sólo para la detoxificación de hidroperóxidos, sino también para el mantenimiento de otros compuestos en estado reducido. Este funcionamiento más versátil soporta un punto de vista donde el sistema dependiente de TRX juega un rol relevante en la defensa del parásito contra la toxicidad del oxígeno durante la fase extraintestinal oxidante en la infección amebiana.

4.2. CAPÍTULO 2: Caracterización del metabolismo redox dependiente de tioles en *Phaeodactylum tricornutum*.

4.2.1. Evaluación de actividades disulfuro reductasa en extractos crudos de *P. tricornutum*.

Para una primera aproximación en la identificación de posibles enzimas involucradas en el metabolismo redox en este organismo, se realizaron determinaciones de diferentes actividades disulfuro reductasas en extractos crudos de la diatomea crecida en forma fotoautotrófica. Para este fin se evaluó la capacidad de oxidación de NADPH/NADH (según corresponda) en presencia de diversos sustratos disulfuros. Previo a la determinación de la actividad, fue necesario eliminar los pigmentos (interferentes de la medida espectrofotométrica) en el extracto crudo, mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20% de saturación. Como se puede apreciar en la Fig. 4.2.1, sólo se pudo detectar actividad significativa de GR y dihidrolipoamida deshidrogenasa. Por el contrario, no se observó actividad TRXR (en presencia de *Ec*TRX 30 μM), no obstante se pudo detectar una leve actividad DTNB reductasa, la cual, según la bibliografía (Gromer y col., 2002), podría ser atribuida a alguna enzima del tipo TRXR, la que podría utilizar a este compuesto como sustrato alternativo. Esta última observación no contradice el hecho de no detectar actividad TRXR en presencia de una TRX heteróloga (*Ec*TRX), dado que existen un amplio número de informes (Jacquot y col., 1994) que demuestran la falta de reacción entre TRXR de origen vegetal con TRX bacterianas o de otras fuentes. En adición, no se ha detectado actividad cistina reductasa o TR en los extractos crudos del alga.

Como complemento de los experimentos anteriores, se realizaron ensayos de *western blot* contra extractos crudos del alga (preparados de forma similar a la arriba mencionada) utilizando anticuerpos policlonales contra proteínas homólogas (de otras fuentes) relacionadas con el metabolismo redox. En la Fig. 4.2.2 se puede observar que el anticuerpo anti-*Eh*TRXR reconoció dos bandas entre 55 y 65 kDa, coincidentes con los tamaños moleculares de TRXR de alto peso molecular (Mustacich y col., 2000). Esto sustenta la comprobación de la actividad DTNB reductasa (con NADPH) detectada en el extracto. Además, los anticuerpos anti-*Eh*TRX41 y anti-*Tc*PMSR10 (ver Capítulo 3)

reconocieron bandas de tamaños característicos a TRX [10-12 kDa (Banerjee, 2008)] y metionina sulfóxido reductasa A [20 kDa (Boschi-Muller y col., 2008)], respectivamente. Los resultados obtenidos sugirieron la presencia de los metabolismos redox dependientes de TRX y del GSH, así como del sistema multienzimático mitocondrial, piruvato deshidrogenasa, el cual forma parte la enzima dihidrolipoamida deshidrogenasa (Serrano, 1992) en *P. tricornutum*. En adición, el ensayo de *western blot* dio indicios de la existencia de sistemas reparadores del daño oxidativo en proteínas, de los cuales su principal exponentes son las Msr (Banerjee, 2008). A pesar de no haberse detectado actividad TR en los extractos crudos, el anticuerpo anti-*TcTR* reconoció una banda de 55 kDa, coincidente con la masa molecular promedio de las TR (Krauth-Siegel y col., 1987), lo que indicaría, en principio la posible existencia de una TR ó proteína relacionada a éstas, como por ejemplo la GR [TR y GR contienen secuencias aminoacídicas con regiones altamente conservadas (Muller y col., 2003)]. Esto último es avalado por la presencia de una gran actividad GR en los extractos crudos de la diatomea.

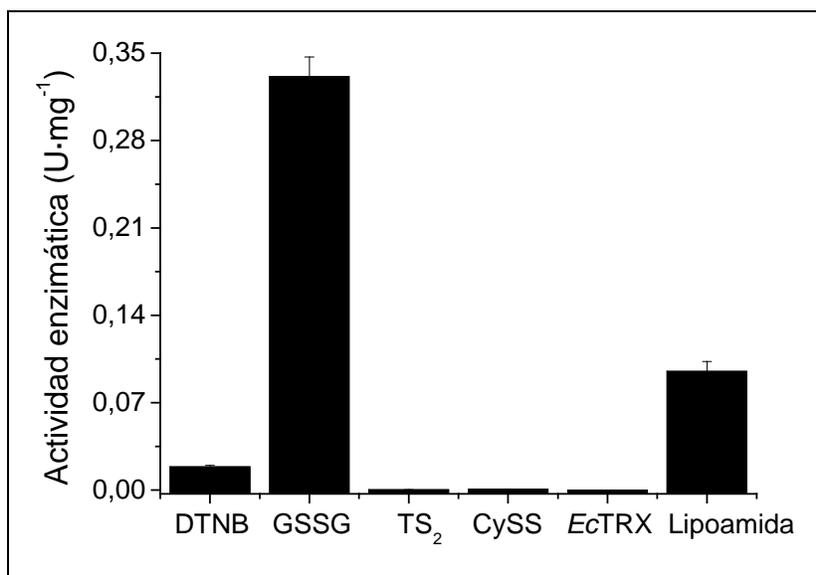


Fig. 4.2.1: Evaluación de la actividades disulfuro reductasa en extractos crudos de *P. tricornutum*. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,5.

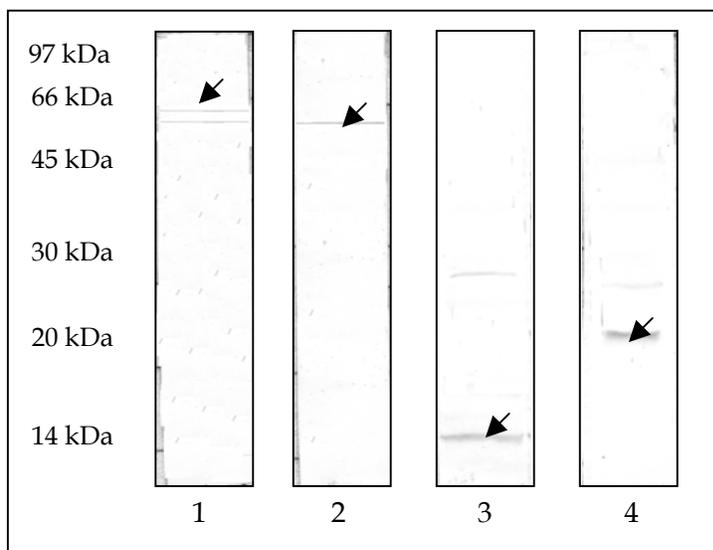


Fig. 4.2.2: Ensayos de *western blot* contra extractos crudos de *P. tricornutum* (70 μ g por calle) utilizando anticuerpos (1/500) contra proteínas homólogas: 1) anti-*Eh*TRXR; 2) anti-*Tc*TR; 3) anti-*Eh*TRX41 y 4) anti-*Tc*PMSR10. Para el revelado se empleó anticuerpo secundario anti-*rabbit* conjugado con peroxidasa.

4.2.2. Purificación de GR a partir de extractos crudos de *P. tricornutum*.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se realizó la purificación de una enzima con actividad GR, para lo cual se partió de 36 g (base húmeda) de células de *P. tricornutum* crecidas en condiciones fotoautotróficas. El procedimiento consistió en cuatro pasos de purificación detallados en la Tabla 4.2.1. Como se mencionó anteriormente, se necesitó la eliminación de los pigmentos por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para poder determinar la actividad inicial de partida. Este extracto crudo previamente tratado es lo que se consideró como muestra original (MO). Inicialmente se realizó una cromatografía de intercambio iónico utilizando una matriz de DEAE-Sepharosa, obteniéndose un factor de purificación de 1,8 veces y una recuperación del 71% de la proteína con actividad GR (eluida con NaCl 0,25 M). El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía de pseudoafinidad, sobre Blue-A Sepharosa, en la cual la proteína se purificó 32 veces con una recuperación del 42% de la actividad GR, la que se eluyó con NaCl 0,25 M. El último paso cromatográfico radicó en una cromatografía de afinidad, mediante una matriz de 2',5'-ADP-Agarosa, obteniéndose una purificación de 161 veces y una recuperación de la actividad GR del 3,1%, que pudo ser eluída con NaCl 0,0625 M.