

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“ESTUDIO DE NUEVOS ACTORES EN EL METABOLISMO ANTIOXIDANTE DE PROTOZOOS PATÓGENOS”

Matías Sebastián Cabeza

Director: Dr. Sergio A. Guerrero

Codirector: Dr. Diego. G. Arias

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL)

- 2015 -

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta Tesis:

Al Dr. Sergio Guerrero por confiar en mí, aceptarme bajo su dirección y por su guía durante estos años. Agradezco especialmente su predisposición para escuchar y discutir nuevas ideas, avanzando en el desarrollo de las mismas.

Al Dr. Diego Arias, por aceptar co-dirigir esta Tesis con compromiso y dedicación. Por su participación activa tanto en el marco teórico así como en el trabajo experimental.

Al Dr. Alberto Iglesias por sus aportes científicos y por las discusiones enriquecedoras que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), por otorgarme las becas doctorales que me permitieron llevar a cabo este trabajo de Tesis.

A los organismos que financiaron las distintas etapas del proyecto de investigación del cual forma parte el presente trabajo: a CONICET, a la ANPCyT y a la Universidad Nacional del Litoral.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por aportar el espacio físico e institucional en el que se desarrolló este trabajo de Tesis doctoral.

A todos mis compañeros de laboratorio durante estos años. Con ellos tuve la suerte de vivir innumerables buenos momentos. A muchos seguramente los seguiré frecuentando, con otros las distancias quizás nos separen, pero todos quedaran retenidos en ese rincón de la memoria donde se guardan las alegrías vividas. Espero que todos puedan cumplir sus sueños, se lo merecen.

Finalmente, un eterno agradecimiento a mis afectos más cercanos: Pablo, mis padres, hermana y sobrinas. Quizás algún día logre brindar aunque sea una fracción del amor y apoyo que ustedes me dan. Son lo único verdaderamente irremplazable en mi vida.

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en el Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET) y en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral), bajo la dirección del Dr. Sergio A. Guerrero y la codirección del Dr. Diego G. Arias. Parte de los resultados expuestos fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Publicaciones.

- Arias DG, **Cabeza MS**, Erben ED, Carranza PG, Luján HD, Téllez Iñón MT, Iglesias AA, Guerrero SA (2011) “Functional Characterization of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Trypanosoma* spp.” Free Radical Biology & Medicine 50, 37-46.
- **Cabeza MS**, Guerrero SA, Iglesias AA, Arias DG (2015) “New enzymatic pathways for reactive oxygen species reduction in *Entamoeba histolytica*” Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects 1850, 1233-1244.

Reuniones Científicas.

- “Study of an unusual methionine sulfoxide reductase from *Trypanosoma cruzi*”. **Cabeza MS**, Arias DG, Iglesias AA, Guerrero SA. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Madryn, Argentina, 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2010.
- “Caracterización de un sistema alternativo de detoxificación de especies reactivas del nitrógeno y oxígeno en *Entamoeba histolytica*”. **Cabeza MS**, Arias DG, Iglesias AA, Guerrero SA. IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Mar del Plata, Argentina, 10-12 Noviembre 2011.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Toxicidad del oxígeno.....	2
1.2. Rol del oxígeno durante la evolución de la vida.....	3
1.3. Especies reactivas.....	7
1.3.1. Superóxido.	7
1.3.2. Peróxido de hidrógeno.....	7
1.3.3. Radical hidroxilo.....	8
1.3.4. Óxido nítrico / peroxinitrito.	9
1.4. Blancos de las especies reactivas.....	10
1.4.1. Daño oxidativo a los lípidos.....	10
1.4.2. Daño oxidativo al ADN.	10
1.4.3. Daño oxidativo a las proteínas.....	11
1.5. Antioxidantes.	12
1.6. Visión general sobre el estrés oxidativo.	12
1.7. Defensa antioxidante en organismos aerobios.....	13
1.8. Defensa antioxidante en organismos anaerobios.....	14
1.9. Reparación de moléculas dañadas.....	16
1.9.1. Metionina sulfóxido reductasas.....	17
1.9.1.1. Tipos de metionina sulfóxido reductasas.....	18
1.10. Protistas.....	19
1.11. Parásitos y parasitismo.....	20
1.12. Protozoos parásitos.....	21
1.13. Entamoeba histolytica.....	21
1.13.1. El parásito.....	21
1.13.2. Filogenia.	24
1.13.3. Biología celular.	25
1.13.4. El genoma.....	26
1.13.5. Metabolismo.	26
1.13.6. Fermentación de la glucosa.	28
1.13.7. Rol del oxígeno en los caminos metabólicos y productos finales.....	30
1.13.8. Defensas antioxidantes.	31
1.13.9. Preguntas abiertas e hipótesis de trabajo.....	33

1.14. Tripanosomátidos.....	35
1.15. Características particulares de los tripanosomátidos.	36
1.16. Trypanosoma cruzi.	37
1.16.1. Taxonomía.....	37
1.16.2. Morfología.....	37
1.16.3. El ciclo de vida de Trypanosoma cruzi.....	38
1.16.4. Enfermedad de Chagas.	39
1.16.4.1. Transmisión: el vector.	39
1.16.4.2. Aspectos clínicos.	40
1.16.4.3. Diagnóstico.....	41
1.16.4.4. Tratamiento Actual.	41
1.16.4.5. Posibles blancos terapéuticos actualmente bajo evaluación.	42
1.16.5. Defensas antioxidantes.	43
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.1. Materiales y reactivos químicos.....	49
3.2. Protozoos utilizados y procedimiento de cultivo.....	49
3.2.1. Entamoeba histolytica.....	49
3.2.2. Trypanosoma cruzi.....	49
3.3. Cepas bacterianas y de levaduras, plásmidos y procedimiento de cultivo.....	49
3.3.1. Cepas.....	49
3.3.2. Plásmidos utilizados.	50
3.3.3. Cultivo de Escherichia coli.....	51
3.3.4. Cultivo de Saccharomyces cerevisiae.....	51
3.4. Métodos utilizados en biología molecular.	52
3.4.1. Extracción de material genético.....	52
3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa.	53
3.4.3. Oligonucleótidos.	53
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	54
3.4.5. Purificación de ADN desde geles de agarosa.	54
3.4.6. Precipitación de ADN.	55
3.4.7. Minipreparación de ADN plasmídico.	55
3.4.8. Digestión enzimática de ADN.....	55
3.4.9. Ligación de fragmentos de ADN.....	55

3.4.10. Secuenciación de ADN.....	56
3.4.11. Transformación de E. coli por el método de CaCl ₂	56
3.4.12. Transformación de S. cerevisiae por el método del acetato de litio.	56
3.4.13. Ensayos de complementación en levaduras.	57
3.5. Métodos bioquímicos.....	57
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	57
3.5.2. Preparación de antisueros.	58
3.5.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección.	58
3.5.4. Cuantificación de proteínas totales.	58
3.5.5. Desalado y cambio de buffer.	59
3.5.6. Concentrado de proteínas.....	59
3.5.7. Preparación de S-nitrosotioles.....	59
3.5.8. Permeabilización de células de T. cruzi con digitonina.....	59
3.5.9. Purificación de anticuerpos.....	60
3.5.10. Obtención y purificación de los isómeros R y S de la Met-SO.	60
3.5.11. Ensayos de fosforilación.....	61
3.6. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.	61
3.6.1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes.....	61
3.6.2. Disrupción celular y preparación de extractos crudos.....	62
3.6.3. Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.	62
3.6.4. Cromatografía de afinidad por unión a amilosa.	62
3.6.5. Proteínas accesorias utilizadas.....	63
3.7. Métodos analíticos.....	63
3.7.1. Determinación de la masa molecular.	63
3.7.2. Determinación de flavinas.	63
3.7.3. Determinación de hierro.....	64
3.7.4. Ensayos enzimáticos.....	64
3.7.2.1. Determinación de la actividad Rd reductasa de la EhNROR.	65
3.7.2.2. Determinación de la actividad TRX reductasa de la EhNROR.	65
3.7.2.3. Determinación de la actividad DTNB reductasa de la EhNROR.	65
3.7.2.4. Determinación de la actividad cistina o CysNO reductasa de la EhNROR.	65
3.7.2.5. Determinación de la actividad diaforasa de la EhNROR.	65
3.7.2.6. Determinación de la actividad NaNO ₂ o NH ₂ OH reductasa de la EhNROR.	66
3.7.2.7. Reducción de flavinas libres por la EhNROR.	66

3.7.2.8. Determinación de la actividad nitroreductasa de la EhNROR.....	66
3.7.2.9. Determinación de la actividad NAD(P)H oxidasa de la EhNROR.	66
3.7.2.10. Reducción de la rubreritina (EhRr).	67
3.7.2.11. Reducción de la proteína flavodiférrica 1 (EhFDP1).....	67
3.7.2.12. Determinación de la actividad Met-SO reductasa.	67
3.7.5. Determinación del potencial de reducción estándar.....	68
3.7.6. Espectroscopia UV-visible.	68
3.8. Microscopía confocal.	68
3.9. Modelado por homología.....	69
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
4.1. CAPÍTULO 1: Entamoeba histolytica.....	71
4.1.1. Análisis de la secuencia primaria de la EhNROR.	71
4.1.2. Clonado y expresión de la EhNROR.....	73
4.1.3. Análisis de las características bioquímicas de la EhNROR.....	75
4.1.4. Estudio de la capacidad NAD(P)H oxidasa de la EhNROR.	76
4.1.5. Estudio de la capacidad de la EhNROR de reducir compuestos de bajo peso molecular.....	80
4.1.6. Estudio de la capacidad redoxina reductasa de la EhNROR.....	82
4.1.7. Expresión y estudios bioquímicos de la EhRr.	84
4.1.8. Análisis de la actividad peroxidasa de la EhRr.....	88
4.1.9. Antecedentes y análisis de la secuencia primaria de la EhFDPs.	90
4.1.10. Expresión y estudios bioquímicos de la EhFDP1.	93
4.1.11. Análisis de las capacidades catalíticas de la EhFDP1.....	96
4.1.12. Análisis de secuencia y expresión de ferredoxinas amebianas.....	98
4.1.13. Susceptibilidad de EhFd1 y EhFd2 a especies reactivas.	102
4.1.14. Estudio de la capacidad de la EhNROR de reducir a la EhRr y EhFDP1.	104
4.1.15. Profundización del estudio del efecto inhibitorio de las coenzimas oxidadas sobre la actividad oxidasa de la EhNROR.	107
4.1.16. Estudio de expresión in vivo.....	110
4.1.17. Estudio de localización subcelular.....	112
4.1.18. Discusión	114
4.1.18.1. La EhNROR y la EhRr constituyen un sistema eficaz de detoxificación de H ₂ O ₂ dentro del mitosoma.....	115
4.1.18.2. Las ferredoxinas son reoxidadas, por acción directa de las FDPs, durante el proceso de “respiración”	118

4.1.18.3. Las EhFDPs y las ferredoxinas podrían contribuir a la defensa contra especies reactivas del nitrógeno en el parásito.....	123
4.2. CAPÍTULO 2: Trypanosoma cruzi	125
4.2.1. Antecedentes y análisis de la secuencia primaria de las fRMsr.....	125
4.2.2. Ensayos de complementación en levadura.....	129
4.2.3. Detección de la TcfRMsr en extractos del parásito.....	132
4.2.3. Localización subcelular de la TcfRMsr.....	135
4.2.4. Fosforilación de la TcfRMsrP.....	136
4.2.5. Obtención de distintas versiones de TcfRMsr recombinante.....	139
4.2.6. Ensayos de especificidad in vitro.....	141
4.2.7. Ensayos cinéticos.....	143
4.2.8. Titulación redox de la TcfRMsr.....	146
4.2.9. Modelado por homología de la TcfRMsr(G).....	148
4.2.10. Discusión	152
5. CONCLUSIONES	157
6. BIBLIOGRAFÍA.....	161

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

[γ - ³² P]ATP	adenosín trifosfato marcado en el fosfato gamma con ³² P
μ l	microlitro
μ M	micromolar
μ m	micrometro
μ mol	micromol
2 β ME	2-mercaptoetanol
AcCoAS	acetil-CoA sintasa
ADH	alcohol deshidrogenasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AdoMet	adenosilmetionina
AdoMetDC	adenosilmetionina decarboxilasa
ADP	adenosín difosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CAT	catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
cm	centímetro
CoA	coenzima A
cpm	cuentas por minuto
CTE	cadena transportadora mitocondrial
Cys	cisteína
CySNO	S-nitroso-cisteína
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNDi	Iniciativa de Drogas para Enfermedades Olvidadas
DNICs	complejos de dinitrosil-hierro
dNTP	desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
e ⁻	electrón
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
E _h	potencial de reducción estándar
EROs	especies reactivas del oxígeno
FAD	flavín adenín dinucleótido
FADPNR	Piridín Nucleótido Reductasas Dependientes de FAD
Fd	ferredoxina
FDP	proteína flavodiférrica
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Fid	flavodoxina
FMN	flavin mononucleótido

FNR	ferredoxina NADP ⁺ reductasa
fRMs _r	metionina sulfóxido reductasa de tipo libre
g	gramo
Glc	glucosa
GOD	glucosa oxidasa
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación
GSNO	S-nitrosoglutación
GSSG	glutación disulfuro
h	hora
HEDS	<i>hydroxyethylsulfide</i>
IAA	iodoacetamida
IC ₅₀	concentración inhibitoria al 50%
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosido
K _{av}	coeficiente de distribución
kb	kilobases
k _{cat}	constante catalítica
kDa	kilo Dalton
K _i	constante de inhibición
K _m	constante de Michaelis-Menten
l	litro
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Leu	leucina
LiOAC	acetato de litio
LIT	<i>Liver Infusion Broth</i>
M	molar
mA	miliAmper
MAT	AdoMet sintetasa
MB	azul de metileno
MBP	proteína de unión a maltosa
MBQ	2-metil-benzoquinona
MCF	familia de transportadores mitocondriales
Met-R-SO	metionina R sulfóxido
MetSO	metionina sulfóxido (racémica)
Met-S-SO	metionina S sulfóxido
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milimetro
mM	milimolar
MM	masa molecular
mmoles	milimoles
Mpb	mega pares de bases

MsrA	metionina sulfóxido reductasa de tipo A
MsrB	metionina sulfóxido reductasa de tipo B
MV	metil viologeno
NAD ⁺	nicotiamida-adenina dinucleotido
NADH	nicotiamida-adenina dinucleotido reducido
NADP ⁺	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato reducido
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
nm	nanometro
NROR	rubredoxina oxido reductasa
°C	grados centígrados
ODC	ornitina decarboxilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco abierto de lectura
Ori	origen de replicación
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEP	fosfoenolpiruvato
PFOR	piruvato ferredoxina oxido reductasa
Pi	fosfato inorgánico
pI	punto isoeléctrico
pmol	picomol
PPi	pirofosfato
PRX	peroxirredoxina
Rd	rubredoxina
rpm	revoluciones por minuto
Rr	rubreritina
s	segundo
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SNP	nitroprusiato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
SOR	superóxido reductasa
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T(SH) ₂	tripanotión reducido
TAE	tampón Tris acetato EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	ácido tricloroacético
THG	transferencia horizontal de genes
TLC	cromatografía en capa delgada
T _m	temperatura de <i>melting</i>

TR	tripanotión reductasa
TRITC	isotiocianato de tetrametilrodamina
TRX	tiorredoxina
TS	tripanotión sintetasa
TS ₂	tripanotión oxidado
TXN	triparredoxina
TXNP _x	triparredoxina peroxidasa
U	unidad enzimática
UV	ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen en volumen
µg	microgramo

RESUMEN

RESUMEN

A pesar de que las reacciones biosintéticas dependientes de oxígeno y la respiración aeróbica tienen ventajas significativas, el uso de O_2 en estos procesos biológicos constituye sin duda un riesgo a nivel celular. Las especies reactivas (EROs) generadas como subproductos del metabolismo del O_2 tienen el potencial de dañar las macromoléculas celulares. Para hacer frente a estos riesgos los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse frente a la toxicidad de las EROs. Los organismos anaerobios, por el contrario, no utilizan O_2 para producir energía. Si bien habitan usualmente ecosistemas anóxicos, no pueden evitar estar expuestos eventualmente al O_2 . Los caminos metabólicos presentes en los organismos anaerobios, especialmente los dependientes de flavoenzimas, tienden a transferir electrones al O_2 generando de esta forma EROs. En general, los organismos anaerobios carecen de los mecanismos de defensa clásicos encontrados en los organismos aerobios y en su lugar han desarrollado otras innovaciones.

Esta Tesis se centra en el estudio de diferentes sistemas antioxidantes presentes en dos parásitos patógenos humanos. Uno de estos organismos presenta un metabolismo anaerobio (*Entamoeba histolytica*) mientras que el otro tiene un estilo de vida aerobio (*Trypanosoma cruzi*). Estos patógenos no solo tienen que lidiar con las EROs producidas de forma endógena, sino también con las derivadas de la respuesta inmune del huésped parasitado.

Entamoeba histolytica, un parásito intestinal que es el agente causal de la amebiosis humana, está expuesto a concentraciones elevadas de EROs durante la invasión de tejidos.

La primera parte de esta tesis comprende los estudios bioquímicos realizados con el objetivo de alcanzar un mejor entendimiento de las propiedades cinéticas y estructurales de una rubredoxina reductasa (*EhNROR*), una proteína flavodiférrica (*EhFDP1*), una rubreritina (*EhRr*) y dos ferredoxinas (*EhFd1-2*) de *E. histolytica*.

Se completó la caracterización de dos rutas metabólicas diferentes, dedicadas a la detoxificación de O_2 y H_2O_2 en *E. histolytica*. También se caracterizó una nueva proteína con actividad rubredoxina reductasa (*EhNROR*) que es capaz de catalizar la reducción NAD(P)H dependiente de rubredoxinas (Rd) heterólogas, *EhRr* y *EhFDP1* pero no así de las *EhFd1-2*. Así mismo, la *EhNROR* exhibió actividad NAD(P)H oxidasa, la cual genera H_2O_2 utilizando O_2 como sustrato. Además se dejó en evidencia que diferentes ferredoxinas son capaces de reducir eficientemente tanto a la *EhFDP1* como a la *EhRr*.

En conclusión, los sistemas enzimáticos caracterizados podrían contribuir *in vivo* a la detoxificación de O₂ y H₂O₂, cumpliendo una función importante en la defensa del parásito contra las EROs.

Los tripanosomátidos parasitan una amplia variedad de vertebrados e invertebrados. Se han realizado muchos esfuerzos para comprender los mecanismos mediante los cuales estos organismos son capaces de neutralizar las EROs, pero mucho menos se conoce acerca de las proteínas responsables de reparar el daño causado por estas especies reactivas.

La metionina es un aminoácido susceptible de ser oxidado a metionina sulfóxido (MetSO). La reducción de MetSO a metionina es catalizada por una metionina sulfóxido reductasa (Msr), una enzima presente en casi todos los organismos. Las MsrA y las MsrB son los dos tipos de Msr más estudiadas y reparan metionina –S-sulfóxido (Met-S-SO) y metionina-R-sulfóxido (Met-R-SO), respectivamente. Recientemente se ha descrito una Msr en *Escherichia coli* (EcfRMsr), específica para Met-R-SO no peptídica. Esta enzima se encuentra presente en algunos procariotas y eucariotas unicelulares.

La segunda parte de esta Tesis comprende la caracterización de dos TcfRMsr alélicas presentes en el genoma diploide de *Trypanosoma cruzi*. En comparación con sus homólogos presentes en organismos no tripanosomátidos, estas enzimas poseen un dominio C-terminal extra que posiblemente esté involucrado en eventos de transducción de señales.

En este trabajo se llevó a cabo el clonado, la purificación y la caracterización de los dominios catalíticos (N-terminal) de ambos alelos de la TcfRMsr. Estos fueron capaces de reducir Met-R-SO utilizando triparredoxina como dador de electrones. La eficiencia catalítica entre ambos alelos difirió en un orden de magnitud. Esta discrepancia podría ser explicada en base a diferencias en sus estructuras cuaternarias. Así mismo, la TcfRMsr fue capaz de complementar el fenotipo de una cepa de levadura mutante en todas sus Msr endógenas, confirmando de esta forma la funcionalidad de la enzima *in vivo*.

La TcfRMsr aparenta sufrir distintas modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo, un corte proteolítico entre sus dos dominios constituyentes. Este proceso parece estar regulado, sin embargo la señal que lo desencadena se desconoce. En este sentido, la función fisiológica de las modificaciones que enfrenta la enzima aún debe ser dilucidada.

ABSTRACT

ABSTRACT

Although O₂-dependent biosynthetic reactions and aerobic respiration have significant advantages in cell biology, the use of O₂ in several biological processes represents a double-edged sword. The generation of ROS, as a by-product of the O₂ metabolism, has the potential of causing damage to different macromolecules. To address these threats aerobic organisms have evolved different mechanisms to protect themselves against the toxicity of ROS. Anaerobic organisms do not use O₂ for energy production. Although usually inhabit anoxic ecosystems, they can not avoid periodic exposures to O₂. Metabolic pathways present in anaerobic organisms, especially the ones that depend on flavoenzymes, transfer electrons to O₂ adventitiously, thereby generating ROS. In general, anaerobic organisms lack the classical defense mechanism against ROS found in aerobic organisms and they have evolved novel ones. This thesis focuses on the study of different antioxidant systems present in human parasites, one that has an anaerobic metabolism (*Entamoeba histolytica*) and other that has a aerobic way of life (*Trypanosoma cruzi*). These pathogens not only have to deal with ROS produced by their own metabolism, but also with those derived from the immune response of parasitized host.

Entamoeba histolytica, an intestinal parasite that is the causative agent of amoebiasis, is exposed to elevated amounts of ROS during tissue invasion. Firstly, this thesis deals with biochemical studies performed to reach a better understanding of the kinetic and structural properties of a rubredoxin reductase (*EhNROR*), a flavodiiron protein (*EhFDP1*), a rubrerythrin (*EhRr*) and two ferredoxins (*EhFd1-2*) from *E. histolytica*. We complemented the characterization of two different metabolic pathways for O₂ and H₂O₂ detoxification in *E. histolytica*. That is, the characterization of a novel amoebic protein with rubredoxin reductase activity (*EhNROR*) catalyzing the NAD(P)H-dependent reduction of heterologous rubredoxins (Rd), *EhRr* and *EhFDP1* but not *EhFd1-2*. In addition, the protein exhibited NAD(P)H oxidase activity, which generates H₂O₂ from O₂. We describe how different ferredoxins were also efficient reducing substrates for both *EhFDP1* and *EhRr*. The enzymatic systems herein characterized could contribute to the *in vivo* detoxification of O₂ and H₂O₂, playing a key role for the parasite defense against ROS.

Trypanosomatids parasitize a wide range of invertebrate and vertebrate. Many efforts have been made to understand the mechanisms by which these organisms neutralize ROS but much less are known about the proteins responsible of repairing the damage created by them. Methionine, for example, is an amino acid susceptible to

be oxidized to methionine sulfoxide (MetSO). Reduction of MetSO to methionine is catalyzed by methionine sulfoxide reductase (Msr), an enzyme present in almost all organisms. MsrA and MsrB are the best known Msrs that repair methionine-S-sulfoxide (Met-S-SO) and methionine-R sulfoxide (Met-R-SO) respectively. In addition, an *Escherichia coli* Msr enzyme (*EcfRMsr*), specific for non-peptidic Met-R-SO, was recently discovered. This protein is present in some prokaryotes and unicellular eukaryotes. The second part of this thesis deals with the characterization of two allelic *TcfRMsr* present in the diploid genome of *Trypanosoma cruzi*. In comparison with its non-trypanosomatids counterparts, these proteins contains an extra C-terminal domain with a possible function in signal transduction. In this work, we carried out the cloning, expression, purification and enzymatic characterization of the catalytic *TcfRMsr* N-terminal domains of both alleles. They reduced Met-R-SO utilizing trypanredoxin as electron donor. The catalytic efficiency of the two alleles differs in one order of magnitude. This discrepancy can be explained based on their quaternary structure. In addition, *TcfRMsr* was found to complement a yeast strain deficient in all kind of Msr activity, confirming the *in vivo* enzyme functional role. *TcfRMsr* seems to undergo post-translational modifications such as for example a proteolytic cleavage between its two domains. The former process appears to be developmentally regulated but the signal which triggers that event remains elusive. In this regard, the physiological relevance of such process still needs to be elucidated.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Toxicidad del oxígeno.

Aunque el oxígeno es uno de los compuestos químicos más abundantes en la superficie de la Tierra, algunos de sus productos metabólicos derivados son extremadamente tóxicos para la vida. La base de esta toxicidad se explica por su naturaleza fisicoquímica. El oxígeno molecular (O_2) es paramagnético, lo que es inusual por tratarse de un gas, teniendo dos electrones desapareados con espines paralelos. Esta estructura electrónica constituye una barrera para la inserción de un par de electrones provenientes de un dador orgánico durante una reacción química (Lenton, 2003). Los electrones entrantes intentan acoplarse a los electrones desapareados (de espines paralelos) presentes en el O_2 , sin embargo, uno de ellos se ve imposibilitado de hacerlo debido a la incompatibilidad de espín. Esta situación es energéticamente desfavorable y se encuentra reflejada en el principio de exclusión de Pauli. Una forma de sortear esta barrera es ceder los electrones al O_2 uno a la vez. Esto es posible porque los espines electrónicos pueden ser invertidos por interacción con los espines nucleares. Sin embargo, este es un proceso lento comparado con el tiempo de vida media del complejo dador-aceptor y no es probable que ocurra mientras los reactantes están en contacto. No obstante, cuando los electrones son incorporados uno a la vez durante eventos independientes, hay tiempo suficiente entre colisiones para que ocurra la inversión del espín. Como resultado, la ruta más común de reducción del O_2 es mediante una serie de transferencias electrónicas univalentes (Fridovich, 1998).

Varios compuestos intermediarios se forman durante la reducción del O_2 a H_2O . Para completarse, este proceso requiere la transferencia univalente de cuatro electrones, generando como compuestos intermediarios superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^*). Estos intermediarios reactivos son los responsables de la toxicidad del O_2 y el motivo por el que todo organismo vivo ha desarrollado defensas antioxidantes, con el objetivo de eliminar estas especies reactivas del oxígeno (EROs) o prevenir su aparición (Fridovich, 1998).

La respiración aeróbica es el proceso responsable de que la mayoría de los seres vivos, los llamados por ello aerobios, requieran oxígeno. La respiración aeróbica es propia de los organismos eucariotas en general (y de algunos tipos de bacterias). En las células eucariotas, los equivalentes de reducción generados durante la oxidación de la glucosa transfieren electrones a la cadena de transporte de electrones

(CTE) mitocondrial. En ese evento se crea un gradiente de protones que es usado para la generación de ATP. Estos electrones reaccionan en última instancia con el O_2 para formar H_2O . Este proceso, conocido como fosforilación oxidativa, es energéticamente superior a los caminos metabólicos fermentativos que se basan en otros aceptores finales tales como piruvato, acetaldehído, etc (Semenza, 2007). Sin embargo, la utilización de O_2 como sustrato terminal en la fosforilación oxidativa trae aparejado ciertos riesgos. Cuando los electrones pasan a través de la CTE mitocondrial, algunos de ellos (0,1-0,5%) escapan y se combinan con el O_2 de forma prematura, resultando en la generación de O_2^- . A su vez, el O_2^- puede dar origen a otras formas de EROs que participan en la iniciación, o la propagación, de reacciones radicalarias dañando a las biomoléculas e interfiriendo con los procesos biológicos (Imlay, 2003). Para enfrentar estas amenazas los organismos aerobios han desarrollado diferentes mecanismos para protegerse de la toxicidad de las EROs.

Los organismos anaerobios no utilizan O_2 para la producción de energía. A pesar que por lo general habitan ecosistemas libres de O_2 , no pueden evitar exposiciones periódicas al mismo. Por ejemplo en el rumen, uno de los ecosistemas más anóxicos conocidos, se han detectado concentraciones de oxígeno de hasta $3 \mu M$ (Ellis y col., 1989). Las rutas metabólicas presentes en los organismos anaerobios, especialmente las dependientes de flavoenzimas, tienden a ceder electrones de forma adventicia al O_2 , generando de esta forma EROs. La bioquímica de los organismos anaerobios se basa en gran medida en la utilización de enzimas con centros de hierro-azufre. Dichas enzimas son especialmente sensibles a la inactivación por EROs, lo que puede amenazar gravemente la viabilidad del organismo (Meehan y col., 2012). Debido a que la mayoría de los anaerobios no puede replicarse en presencia de O_2 , en una primera instancia se creía que estos organismos carecían de enzimas detoxificadoras de EROs. En la actualidad se sabe que en general carecen de las defensas clásicas encontradas en los organismos aerobios pero que, en contrapartida, han evolucionado sistemas propios (Rolfe y col., 1978; Brioukhanov y Netrusov, 2004; Briukhanov, 2008).

1.2. Rol del oxígeno durante la evolución de la vida.

Durante el curso de la evolución, los recursos energéticos disponibles para las formas de vida existentes en la Tierra se tornaron limitados, estimulando la utilización de diferentes alternativas y promoviendo de esta forma la diversificación de los caminos bioenergéticos existentes. Entre los organismos más primitivos, se encontraban los heterótrofos fermentadores que dependían de compuestos orgánicos

como fuentes de carbono y energía. La innovación de la fotosíntesis anoxigénica permitió que algunos organismos pudieran convertir la energía de la luz en energía química. Esto es posible gracias a los electrones cedidos durante la oxidación del H₂ o el H₂S, además el proceso permite la fijación de CO₂ (Banerjee, 2008).

La atmósfera temprana de la tierra consistía probablemente de CO₂ como componente principal y era de naturaleza levemente reductora. En cambio, la atmósfera en los tiempos presentes es altamente oxidante (20% O₂) (Slesak y col., 2012). En la actualidad es aceptado que el advenimiento del O₂ atmosférico fue causa de la aparición de la fotosíntesis oxigénica (Blankenship, 2010). En este proceso un organismo utiliza el agua como dador de electrones en la producción de materia orgánica, liberando O₂ a la atmósfera. La fotosíntesis oxigénica se estableció entre 3,5 y 2,7 billones de años atrás. Los primeros microorganismos en realizarla fueron similares a las que hoy llamamos cianobacterias (Blankenship, 2010).

La capacidad de detoxificar EROs debió evolucionar de forma previa a la fotosíntesis oxigénica (y al metabolismo aerobio) de otra forma los primeros organismos aerobios se hubiesen intoxicado ellos mismos. Esto plantea una especie de paradoja en cuanto a cuál fue el estímulo inicial que impulsó la aparición de los sistemas antioxidantes aún antes que hubiera grandes cantidades de O₂ en el ambiente. Una posibilidad es la existencia en la Tierra temprana de otras fuentes de EROs (McKay y Hartman, 1991).

Un trabajo reciente demostró que durante el eón arcaico y el paleoproterozoico temprano fue posible la formación de H₂O₂, en la atmosfera temprana deficiente en oxígeno, por un proceso fotolítico del agua (Liang y col., 2006). Durante los eventos de glaciaciones producidos en estas eras, grandes cantidades de H₂O₂ pudieron ser preservadas y concentradas en el hielo. El hielo podía trasladarse hacia el océano, derretirse y liberar las especies oxidantes acumuladas. Aunque en menor escala, este proceso ocurre actualmente en la Antártida donde una fuerte radiación UV llega a la superficie del hielo como consecuencia del debilitamiento de la capa de ozono en esas latitudes. En la tierra temprana, carente de O₂ y por lo tanto de ozono, la superficie era bombardeada por una intensa radiación UV (Liang y col., 2006). Sobre la superficie terrestre esta misma radiación amenazaría severamente la proliferación de microorganismos, no así en el mar. El océano fue probablemente el lugar donde evolucionaron los primeros sistemas antioxidantes como una forma de defensa frente al H₂O₂ liberado por el deshielo. A su vez, cuando el H₂O₂ se encuentra en presencia de Fe²⁺ produce el radical hidroxilo, que es letal para las células. Es por esto que estas EROs producidas abióticamente pueden haber sido la razón del desarrollo de enzimas

protectoras como la catalasa, las peroxidasas y las superóxido dismutasas. Una vez que esas enzimas estuvieron en su lugar, se allanó el camino para que evolucione tanto la fotosíntesis oxigénica como la respiración aeróbica (Liang y col., 2006). Por otro lado las EROs formadas abióticamente habrían mermado las concentraciones de S^{2-} y otros compuestos reducidos, utilizados en la fotosíntesis anoxigénica, sobre todo en ecosistemas cerrados. Esto habría generado la necesidad, entre los fotosintetizadores, de desarrollar el fotosistema II para de esta forma poder utilizar H_2O como reductor, y por consiguiente evolucionar hacia la fotosíntesis oxigénica (McKay y Hartman, 1991).

Cuando las cianobacterias desarrollaron la habilidad de realizar la fotosíntesis oxigénica, liberando O_2 a la atmósfera, pusieron en movimiento una serie de cambios ambientales que tuvieron un gran impacto en la evolución de la vida en el planeta. Para evitar la extinción, algunos de los primeros microbios se vieron obligados a retirarse a nichos ecológicos reductores, donde se encontraron a resguardo del O_2 , como por ejemplo los sedimentos marinos. Otros se enfrentaron al desafío de un ambiente más oxigenado y por lo tanto mejoraron sus defensas antioxidantes y desarrollaron nuevas rutas metabólicas menos sensibles a las EROs. Con estas innovaciones protectoras, no solo pudieron crecer en presencia de O_2 sino que sacaron ventaja del enorme potencial energético de utilizar este aceptor final en la respiración aerobia (Meehan y col., 2012). Esta nueva capacidad energética dio origen al aumento del repertorio de reacciones bioquímicas, con la aparición de no menos de mil reacciones no encontradas en redes metabólicas anaerobias, generando nuevos metabolitos secundarios como esteroides, alcaloides, etc (Banerjee, 2008).

La forma en que se originó la primera célula eucariota es todavía objeto de debate y se postulan diversas hipótesis. Más aceptada es la idea de que el primer organismo eucariota, propiamente dicho, habría sido capaz de realizar respiración aerobia. Esta capacidad le habría sido transferida a causa de un evento de endosimbiosis de una célula bacteriana, probablemente una α -proteobacteria. Con el tiempo, el endosimbionte se transformaría, mediante un proceso de reducción genómica, en la organela que hoy se conoce como mitocondria (Embley y Martin, 2006). La aparición de los organismos eucariotas se vio facilitada por el incremento paulatino de la cantidad de O_2 presente en la atmósfera. Esto se debe a que las mitocondrias están contenidas dentro de otro compartimento, que limita la provisión de O_2 por difusión simple, necesiándose una mayor concentración de O_2 en el medio externo que la requerida por las bacterias aerobias (Lenton, 2003).

Se postula que el avance de la concentración atmosférica de O₂ contribuyó en parte a la aparición de los metazoos. La proteína que confiere a los animales su resistencia a la tracción mecánica es el colágeno. Esta es la principal proteína de todos los tejidos conectivos, estén calcificados (huesos, dientes, etc.) o desnudos (ligamentos, cartílagos, piel, etc.). Esta molécula es tan importante que por ejemplo representa un 25% de todas las proteínas presentes en los mamíferos. El colágeno es una proteína inusual porque está compuesta de unidades repetidas de unos pocos aminoácidos, incluyendo la hidroxiprolina. Este aminoácido es producido *in situ*, por la oxidación de la prolina, luego que la estructura básica de la proteína ha sido formada. Para que este proceso se produzca se requiere que haya al menos un 1% de los niveles de oxígeno libre presente en la atmósfera actual (Towe, 1970).

Con el objetivo de alcanzar mayores tamaños los metazoos desarrollaron sistemas circulatorios empleando la innovación de una proteína transportadora de O₂, la hemoglobina (Lenton, 2003). El O₂ es relativamente insoluble en agua y su solubilidad disminuye con el aumento de la salinidad y la temperatura. Por este motivo, la concentración de O₂ disuelta limitaba el tamaño potencial de algunos metazoos acuáticos (Peck y Chapelle, 2003). Con el tiempo los animales evolucionaron la capacidad de respirar aire y por esto se beneficiaron de una mayor disponibilidad de O₂. Sin embargo, con esta transición aumentaron los daños causados por las EROs, y es por eso que los vertebrados adquirieron defensas antioxidantes aún más eficientes (Lenton, 2003).

Finalmente con el advenimiento de animales de mayor tamaño y complejidad, surgieron nuevos nichos ecológicos que los microorganismos podían colonizar. Por ejemplo, el desarrollo de un sistema digestivo dio origen a la aparición de la flora intestinal. De esta forma surgieron nuevos tipos de interacciones biológicas, las cuales no siempre eran beneficiosas para el huésped y como consecuencia aparecieron las primeras formas de parasitismo (Solomons, 1993). A su vez, el arribo de agentes patogénicos determinó la evolución de la respuesta inmune en el organismo amenazado. En dicho proceso las EROs juegan un papel central en la destrucción del patógeno (Allen y Maizels, 2011; Buchmann, 2014).

Los estilos de vida parasíticos han evolucionado muchas veces de forma independiente entre los eucariotas. Los parásitos eucariotas han desarrollado la capacidad de colonizar una amplia gama de huéspedes, incluidos animales y plantas (Haldar y col., 2006). La adaptación al parasitismo generalmente tiene como consecuencia la pérdida de algunas rutas metabólicas preexistentes (Keeling y Slamovits, 2005). Esto se debe a que muchas de las moléculas imprescindibles para la

vida se obtienen directamente del huésped y ya no existe la necesidad de sintetizarlas. En contrapartida, estos organismos adquieren otras vías necesarias para sostener su nuevo estilo de vida como ser, entre otras, las necesarias para la invasión y la defensa frente al sistema inmune del hospedero (Schmid-Hempel, 2009).

La vida ha producido el oxígeno atmosférico, que es a su vez una de las principales variables ambientales que dirigen la evolución de la misma. Esto implica la existencia de mecanismos de retroalimentación y pone de manifiesto la interdependencia de la biosfera con los elementos abióticos del planeta (Lenton, 2003).

1.3. Especies reactivas.

1.3.1. Superóxido.

El O_2^- se genera a partir del O_2 por la adición de un electrón. A pesar de ser un radical, no es altamente reactivo ni posee la capacidad de penetrar membranas lipídicas. Por este motivo queda confinado al compartimiento donde se produjo. La formación de O_2^- es espontánea, especialmente en ambientes aerobios ricos en electrones (como por ejemplo la vecindad de la membrana interna mitocondrial). El radical O_2^- , como también el H_2O_2 , es generado de forma endógena por flavoenzimas. Dos moléculas de O_2^- pueden dismutar a H_2O_2 y O_2 , pudiendo esta reacción ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Nordberg y Arner, 2001).

La carga aniónica del O_2^- inhibe su actividad electrofílica hacia compuestos ricos en electrones y por esto solo puede oxidar a pocas biomoléculas tales como enzimas que contengan centros de [4Fe-4S] (por ejemplo aconitasa o desidratasa) (Imlay, 2003). Los átomos de hierro, cargados localmente de forma positiva, atraen electrostáticamente al O_2^- y por este motivo son particularmente susceptibles a ser dañados por esta ERO.

El O_2^- tiene un tiempo de vida medio corto (10^{-6} s) y su concentración intracelular es baja (1×10^{-4} μ M) (Winterbourn, 2008).

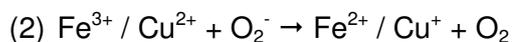
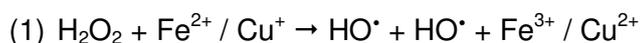
1.3.2. Peróxido de hidrógeno.

El H_2O_2 es no polar y por esto es capaz de penetrar membranas biológicas y dañar macromoléculas en sitios distantes de su lugar de producción. Por ejemplo, se estima que puede difundir hasta 1,5 mm aún en presencia de una concentración de 2 mM de glutatión en el medio circundante. Es relativamente estable (tiempo de vida

media: 10^{-5} s) y su concentración intracelular puede ser normalmente de $10 \mu\text{M}$ (Winterbourn, 2008). También es intermediario en la generación de moléculas más reactivas, incluyendo ácido hipocloroso y el HO^\bullet . Teóricamente, los efectos nocivos del H_2O_2 se deben principalmente a su conversión a HO^\bullet por la reacción de Fenton (Imlay, 2003). El H_2O_2 participa en procesos de señalización intracelular al regular diferentes vías metabólicas mediante la oxidación reversible de distintas moléculas blanco. Varias proteínas quinasas, fosfatasas y factores de transcripción pueden ser oxidadas reversiblemente por el H_2O_2 (Imlay, 2003). El atractivo del H_2O_2 como segundo mensajero se debe a su alta difusibilidad, a que puede producirse de forma endógena, acumularse localmente y ser metabolizado enzimáticamente para “apagar” su función (Rhee y col., 2005). Debido a la estabilidad de su enlace oxígeno – oxígeno, el H_2O_2 es un oxidante relativamente débil (Imlay, 2003). El H_2O_2 puede oxidar los residuos de cisteína de las proteínas, sin embargo la reacción es lenta a menos que dichos residuos se encuentren en su forma de tiolato. Esto sucede cuando las cisteínas están espacialmente localizadas cerca de aminoácidos cargados positivamente (Bindoli y col., 2008).

1.3.3. Radical hidroxilo.

Dada su fuerte reactividad con otras biomoléculas (lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos), el HO^\bullet es capaz de realizar mayor daño a los sistemas biológicos que otras EROs. Este radical se forma a partir del H_2O_2 en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} o Cu^+). Este comportamiento es conocido como la reacción de Fenton (1). En una reacción acoplada, el O_2^- tiene una función relevante en el reciclado del ión metálico (2).



La suma de ambas reacciones se denominó reacción de Haber-Weiss, donde los metales de transición juegan un rol clave en la formación de radicales hidroxilos (Nordberg y Arner, 2001).

El HO^\bullet tiene un tiempo de vida medio corto (10^{-9} s) y su concentración intracelular es muy baja ($1 \times 10^{-9} \mu\text{M}$) (Winterbourn, 2008).

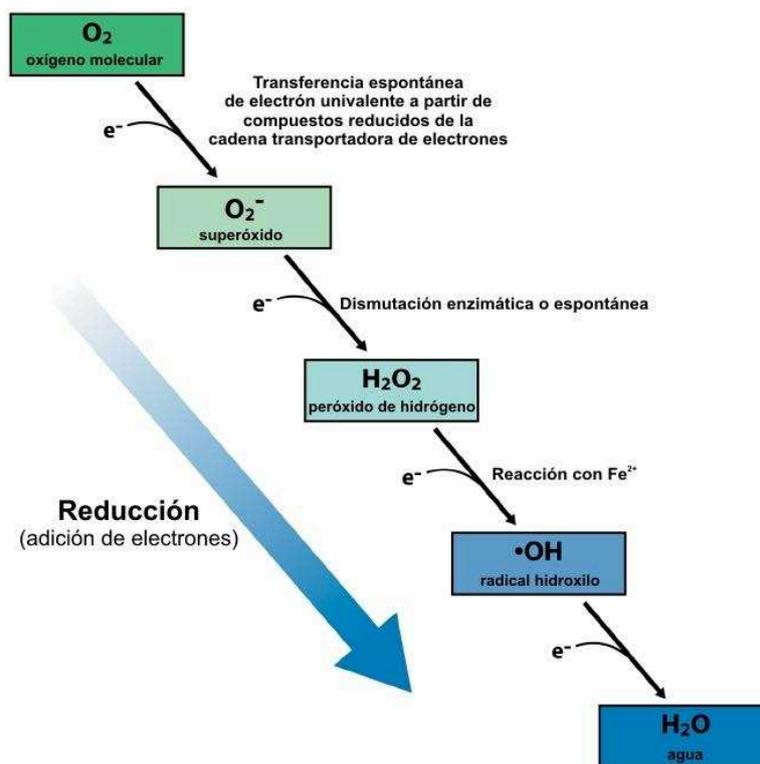


Figura 1.1: Formación de especies reactivas del oxígeno. Imagen tomada de (Halliwell, 2006).

1.3.4. Óxido nítrico / peroxinitrito.

El óxido nítrico (NO^\bullet) es miembro de la familia de los radicales libres. A pesar de que posee un electrón desapareado reacciona lentamente con las biomoléculas (característica que comparte con el O_2^-). Por otro lado, interactúa fácilmente con otros radicales libres (por ejemplo, radicales peroxilos y alquilos) generando moléculas menos reactivas, es por ello que bajo ciertas circunstancias funciona como un antioxidante. Sin embargo si el O_2^- es producido en grandes cantidades junto con el NO^\bullet , reaccionan entre ellos para dar peroxinitrito (ONOO^-) que es un compuesto altamente citotóxico (Quijano y col., 1997; Patel y col., 1999; Nordberg y Arner, 2001).

En concentraciones fisiológicas el NO^\bullet funciona como un mensajero intracelular, por ejemplo estimulando a la guanidil ciclasa y proteínas quinasas. El NO^\bullet posee la habilidad de atravesar las membranas celulares y puede, de ese modo, transmitir señales a otras células. Cuando es producido en grandes cantidades, el NO^\bullet se torna un factor significativo en el control redox de las funciones celulares. La nitrosilación, condensación del grupo NO^\bullet a tioles reactivos de proteínas, actúa, por ejemplo, como regulador de actividades enzimáticas. Así, la producción excesiva de NO^\bullet es contrarrestada mediante su conjugación a glutatión (GSH), dando S-nitrosoglutatión (GSNO). El GSNO puede ser nuevamente reducido en forma fisiológica a GSH y NO^\bullet por acción enzimática (Quijano y col., 1997; Patel y col., 1999).

1.4. Blancos de las especies reactivas.

1.4.1. Daño oxidativo a los lípidos.

Los radicales libres de alta reactividad, como el HO[•], pueden sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos, conduciendo a reacciones en cadena. Los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al ataque de los radicales libres y como consecuencia resultan oxidados. Este evento conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, que origina alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula y que pueden conducir a su lisis total (Sevanian y Ursini, 2000). Este tipo de reacciones puede disminuir la fluidez de las membranas biológicas, inactivar enzimas y receptores asociados a la membrana celular y aumentar la permeabilidad al Ca²⁺. Este fenómeno conduce a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4-hidroxi-alquenos y otros (Dennis y Shibamoto, 1989).

1.4.2. Daño oxidativo al ADN.

El HO[•] es la principal ERO que actúa sobre el ADN, siendo todos sus componentes susceptibles a la acción de esta especie radicalaria. Los principales daños que se obtienen son: ruptura de las hebras del ADN, hidroxilación de bases y fragmentación del azúcar 2-desoxi-D-ribosa por el ataque al grupo 3'-OH (Southorn y Powis, 1988; Henle y Linn, 1997; Box y col., 2001). El HO[•] puede generarse en la vecindad del ADN, mediante la reacción de Fenton (Goldstein y col., 1993), a partir de los metales de transición, hierro y cobre, los cuales en condiciones de estrés oxidativo, pueden ser liberados de las proteínas que los mantienen secuestrados y a su vez unirse al ADN. Además, la movilización de Ca²⁺ inducida por ERO puede activar endonucleasas dependientes de este catión y provocar la fragmentación del ADN (Orrenius y col., 1989; Fernandez y col., 1995).

Cuando el NO[•] se produce en exceso, se descompone en diferentes óxidos de nitrógeno para producir daño directo al ADN, entre ellos se encuentra el N₂O₃, el cual promueve la desaminación oxidativa de muchas aminas aromáticas primarias, incluyendo las purinas y pirimidinas. Las consecuencias *in vivo* del daño oxidativo al ADN, incluyen: alteraciones estructurales del ADN, debido a mutaciones, pérdida e inserción de bases. Estas, a su vez conducen a la pérdida de la expresión de genes o a la síntesis de una proteína anormal. Como consecuencia se producen alteraciones en el metabolismo y el crecimiento, así como un funcionamiento inadecuado de las

vías de señalización celular; todas estas disfunciones fisiológicas conllevan al desarrollo de enfermedades, como el cáncer, al envejecimiento, e incluso pueden conducir a la muerte celular.

1.4.3. Daño oxidativo a las proteínas.

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos de una proteína son susceptibles a oxidarse de forma irreversible, a excepción de la metionina y la cisteína, cuyas oxidaciones pueden ser revertidas enzimáticamente (Nordberg y Arner, 2001; Ghezzi, 2005; Friguet, 2006). Los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo son el triptófano, la tirosina, la fenilalanina, la metionina y la cisteína (Stadtman y Levine, 2000).

La oxidación del esqueleto carbonado de las proteínas trae aparejada la fragmentación de la cadena polipeptídica mediante una vía que involucra la formación de diamida, α -amidación o β -oxidación dependiente de HO^\bullet (Nordberg y Arner, 2001). A su vez, el HO^\bullet interactúa con muchos aminoácidos, y en ocasiones genera daños puntuales a proteínas que están unidas a metales de transición (Stadtman y Oliver, 1991). Los aminoácidos aromáticos y el anillo de imidazol de la histidina son hidroxilados como consecuencia de su reacción con el HO^\bullet . Los aminoácidos de cadena alifática, como son: valina, leucina, isoleucina y prolina, cuando interactúan con el HO^\bullet resultan peroxidados.

Otro importante daño oxidativo, que tiene lugar en las proteínas, es la oxidación de los grupos amino de los aminoácidos a grupos carbonilo. Los residuos de mayor relevancia en este tipo de modificación son: lisina, arginina, prolina e histidina. Por otro lado, el ONOO^- también es responsable del daño a las proteínas por al menos tres mecanismos: 1) puede descomponerse y generar el HO^\bullet , 2) el ONOO^- reacciona directamente con los tioles proteicos y 3) puede reaccionar con iones metálicos para generar una potente especie, el catión nitronio, capaz de nitrar muchos aminoácidos. Los residuos de tirosina nitrosilados son estables y constituyen indicadores del ataque del ONOO^- a las proteínas (Simonian y Coyle, 1996).

Todos los procesos de oxidación de proteínas no sólo modifican su funcionalidad, sino que también las hacen más susceptibles a la degradación mediada por el proteosoma u otras proteasas. Las consecuencias bioquímicas de las modificaciones oxidativas a las proteínas, incluyen la pérdida de la función de receptores, enzimas y proteínas de transporte, así como la generación de nuevos

antígenos que provocan respuestas autoinmunes (Nordberg y Arner, 2001; Friguet, 2006).

1.5. Antioxidantes.

Los antioxidantes son descritos como sustancias capaces, a concentraciones relativamente bajas, de competir con otros posibles sustratos oxidables y, de esta forma, retrasar significativamente o inhibir la oxidación de esos sustratos.

Los antioxidantes se pueden clasificar según el modo de acción en:

Preventivos: el antioxidante intercepta a la especie oxidante antes de que pueda realizar daño. Estos pueden actuar por:

- Secuestro de metales (por ejemplo, transferrina, ferritina).
- Removiendo hidroperóxidos (por ejemplo, catalasa, glutatión peroxidasa).
- Inactivando al oxígeno singulete (por ejemplo, β -caroteno, bilirrubina, licopeno).

Terminadores: los antioxidantes lentifican o detienen la reacción en cadena mediada por radicales libres. Estos pueden ser:

- Antioxidantes donadores (por ejemplo, tocoferol, ascorbato, ácido úrico).
- Antioxidantes suicidas (óxido nítrico).

Según su naturaleza, los antioxidantes pueden dividirse en:

No enzimáticos (por ejemplo, glutatión, ascorbato, tripanotión, tocoferol).

Enzimáticos (catalasa, glutatión transferasa, peroxirredoxina, tiorredoxina).

1.6. Visión general sobre el estrés oxidativo.

La formación de EROs es una consecuencia inevitable en una gran variedad de reacciones bioquímicas, especialmente en organismos aerobios. Es por esto que existe la necesidad de mantener un balance crítico entre la generación de EROs y la defensa antioxidante. El estrés oxidativo ocurre cuando el balance entre pro-oxidantes y antioxidantes es perturbado. La valoración de los actores involucrados en este equilibrio puede cambiar de acuerdo a la fisiología del organismo en cuestión. Por ejemplo, el O_2 es un sustrato vital para los organismos aerobios, mientras que desde el punto de vista de un anaerobio es un pro-oxidante que es necesario evitar.

Debido a su reactividad, la acumulación de EROs, más allá de las necesidades inmediatas de la célula, puede afectar la fisiología celular al dañar moléculas críticas como lípidos, ADN y proteínas. La existencia de vías de señalización redox implica que este balance puede ser intencionalmente perturbado de forma temporaria, ya sea por un incremento de las concentraciones de EROs o por una disminución de las actividades de los sistemas antioxidantes.

Al considerar a un parásito, se debe tener en cuenta que el balance redox no solo puede ser afectado por causas endógenas sino también por factores exógenos, como por ejemplo el desencadenamiento de la respuesta inmune del hospedero o como respuesta a drogas terapéuticas. En el caso en que el aumento de la producción de EROs no sea transitorio, sino que se mantenga en el tiempo, la célula deberá incrementar su capacidad antioxidante en igual medida. En este escenario, no se regresará al balance redox original sino que se producirá un nuevo equilibrio. Si la respuesta antioxidante se ve desbordada, entonces la célula sufrirá un daño irreversible que desencadenará la muerte celular.

1.7. Defensa antioxidante en organismos aerobios.

Los organismos que dependen de un metabolismo aerobio tienen que lidiar con la toxicidad implícita del O_2 y por esto han desarrollado una amplia gama de mecanismos para hacer frente a las especies reactivas.

Tanto la superóxido dismutasa (SOD) como la catalasa (CAT) son enzimas ubicuas entre las células aerobias y se las considera claves en la defensa antioxidante. Ambas enzimas probablemente evolucionaron aún antes que el O_2 se encuentre ampliamente distribuido en la atmósfera (Slesak y col., 2012).

La SOD cataliza la dismutación de O_2^- en O_2 y H_2O_2 . Existen varias formas de SOD que contienen diferentes cofactores metálicos como cobre, zinc, manganeso, hierro o níquel (Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008). El citosol de prácticamente todas las células eucariotas contiene una enzima SOD con cobre y zinc (Cu-Zn-SOD), mientras que las mitocondrias (y numerosas bacterias) contienen una forma con manganeso (Mn-SOD)(Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008). Es importante remarcar que debido a sus concentraciones relativas, es más probable que una molécula de O_2^- se encuentre con una molécula de SOD de que lo haga con otra molécula de O_2^- . Hay que añadir a ese hecho que la constante de reacción del O_2^- con la SOD es de $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$, mientras que la de la reacción no catalizada, con otro O_2^- a pH neutro, es $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$. Por esto, el tiempo de vida medio del O_2^- se acorta en un factor de 10^9 debido a

la acción de la enzima (Fridovich, 1998). Se estima que la SOD de *E. coli* provee aproximadamente el 95% de la protección existente para los blancos susceptibles al ataque del O_2^- en la célula (Liochev y Fridovich, 1997).

La catalasa es una hemoperoxidasa que cataliza la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 (formando O_2 y H_2O) con una eficiencia catalítica muy alta, de aproximadamente $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta enzima es un homotetrámero, conteniendo un grupo hemo por subunidad (Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008). La CAT es única entre las enzimas que degradan H_2O_2 , ya que lo hace sin consumir equivalentes de reducción. Por lo tanto, la CAT proporciona a la célula un mecanismo muy eficiente de detoxificación, en lo que a conservación de recursos energéticos se refiere. La CAT posee una K_m elevada (en el orden de los mM) por lo que no se satura fácilmente y puede, de esta manera, incrementar linealmente su actividad en un amplio rango de concentraciones de H_2O_2 (Scandalios y col., 1997).

En un segundo orden de importancia, existen otras moléculas que intervienen en la defensa antioxidante de los organismos aerobios. Estas tienen una distribución más heterogénea y probablemente hayan evolucionado de forma posterior a la CAT y la SOD, como respuesta a las necesidades particulares de cada ser vivo. Algunas de ellas son moléculas de bajo peso molecular (ascorbato, tocoferol, glutatión, etc.) y otras son de naturaleza proteica, como las tioredoxinas. Al cumplir su función estas moléculas se oxidan, sin embargo existen sistemas enzimáticos encargados de regenerarlas (dehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa, tioredoxina reductasa). Para finalizar, vale la pena mencionar que estos antioxidantes también pueden servir como cosustratos para distintas peroxidasas. Así pues, existen en la naturaleza las ascorbato peroxidasas, glutatión peroxidasas y las peroxirredoxinas (las cuales utilizan tioredoxinas como cosustratos) (Fridovich, 1998).

1.8. Defensa antioxidante en organismos anaerobios.

A pesar de que existen algunas excepciones, las bacterias anaerobias carecen de los sistemas clásicos de defensa encontrados en los organismos aerobios, los cuales incluyen la SOD y la CAT. Inicialmente se planteó que la ausencia de SOD era la causa que las ubicaba en hábitats anóxicos (McCord y col., 1971). Sin embargo, de forma reciente, se descubrió que la eliminación del O_2^- en algunas bacterias anaerobias (y microaerófilicas) puede ocurrir por un mecanismo de reducción, en vez de dismutación, por la acción de una nueva enzima denominada superóxido reductasa (SOR) (Niviere y Fontecave, 2004).

Otras proteínas han sido implicadas en la respuesta antioxidante de algunos procariotas anaerobios, como por ejemplo en *Pyrococcus furiosus*, incluyendo la peroxidasa rubreritina (Rr), el transportador de electrones rubredoxina (Rd) y una NAD(P)H rubredoxina reductasa (NROR) (figura 1.2). La vía de reducción completa se reconstituyó *in vitro* utilizando NAD(P)H como dador final de electrones, en la reducción de O_2^- (Grunden y col., 2005). El centro mononuclear de hierro presente en la SOR se reduce por acción de la Rd, que a su vez es reducida por la flavoproteína NROR. Se ha demostrado, *in vitro*, que la misma vía es utilizada para reducir la Rr, enzima que es capaz de reducir el H_2O_2 , en lugar de dismutarlo como hace la CAT. Una ventaja particular de la reducción sobre la dismutación del O_2^- (o el H_2O_2) es que no genera O_2 , el cual podría contribuir con una toxicidad adicional.

Sorprendentemente, en los últimos años también se ha reportado que algunas procariotas anaerobios son capaces de metabolizar el O_2 , no con fines energéticos sino mas probablemente como una vía de detoxificación. Una de las enzimas responsables de este evento son las NADH oxidasas. Éstas catalizan la reducción de O_2 a expensas de NADH. El producto de la reacción puede ser H_2O_2 , mediante la transferencia de dos electrones, o H_2O , cuando son cuatro los electrones cedidos. La generación de uno u otro producto depende de cada enzima en particular (Higuchi y col., 1993; Ward y col., 2001; Yang y Ma, 2007).

Otra familia de proteínas importantes en la protección contra las EROs, en anaerobios, son las proteínas flavodiférricas (FDPs). Se han reportado dos actividades para estas proteínas: la reducción de O_2 y la reducción de NO^+ . En *Desulfovibrio gigas* la FDP utiliza Rd como dador de electrones, por lo que también se acopla al sistema de transferencia electrónica antes comentado (Gomes y col., 1997; Frazao y col., 2000).

Es probable que la razón que impide a los anaerobios tolerar una aireación significativa se deba a que el O_2 dañe, *per se*, enzimas clave. Como corolario, los sistemas antioxidantes anaerobios pueden impedir el daño ocasionado por las EROs, pero solo cuando pequeñas cantidades de O_2 se introducen brevemente en los hábitats anóxicos (Imlay, 2008).

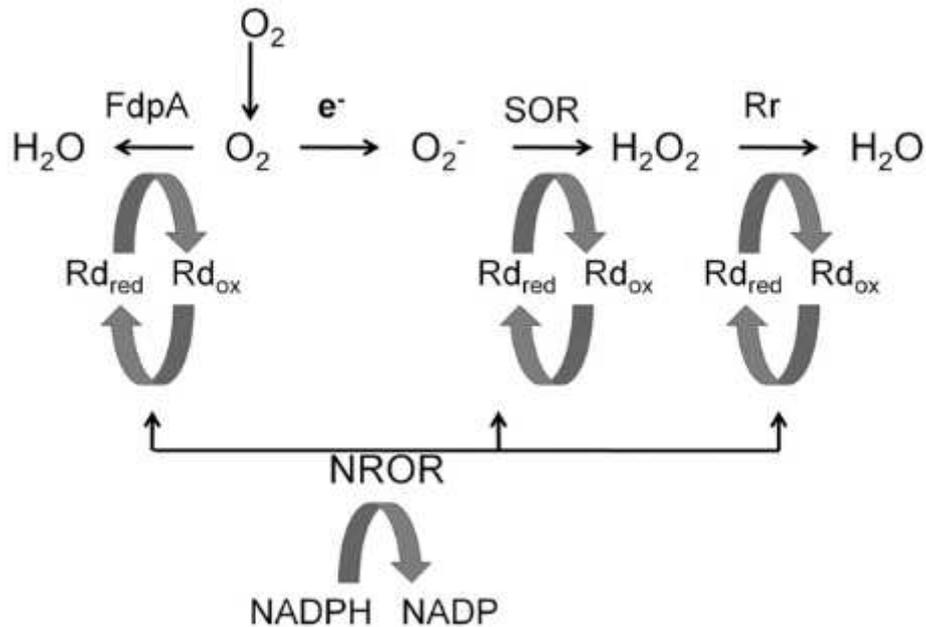


Figura 1.2: Sistema de defensa contra EROs propuesto para *P. furiosus*. Imagen tomada de (Thorgersen y col., 2012).

1.9. Reparación de moléculas dañadas.

Los sistemas antioxidantes celulares se desarrollaron con el objetivo de evitar el daño de las biomoléculas. Estos mecanismos actúan a diferentes niveles, por ejemplo, evitando la aparición de EROs, eliminándolas, o terminando las reacciones en cadena. Aún cuando existen estos sistemas, es inevitable que se produzcan daños en las biomoléculas.

Existen mecanismos muy elaborados para reparar el ADN dañado por causa de especies reactivas. Tanto el ADN nuclear como el mitocondrial pueden ser afectados por EROs, estando este último mucho más expuesto debido a su localización. Las células no pueden funcionar si los daños en el ADN corrompen la integridad y accesibilidad de información esencial en el genoma. Según el tipo de daños que ha sufrido la estructura de doble hélice del ADN, han evolucionado una variedad de estrategias de reparación que restauran la información perdida. Es entendible la necesidad de contar con estos mecanismos tan intrincados ya que la célula no puede simplemente deshacerse de las moléculas dañadas (principalmente del ADN nuclear). Por otro lado, de no reparar los errores se corre el riesgo de propagarlos durante la replicación celular, generando una mayor probabilidad de aparición de células cancerosas.

Otras de las macromoléculas afectadas por el estrés oxidativo son las proteínas, probablemente debido a su abundancia dentro de las células. De acuerdo al tipo de

daño que hayan sufrido sus aminoácidos, las proteínas pueden perder su funcionalidad debido a cambios irreversibles o reversibles. Las proteínas oxidadas de forma irreversible son generalmente eliminadas vía diferentes caminos de degradación (proteosoma, proteasas, micro o macroautofagia, etc.). Por otra parte, para los cambios reversibles han evolucionado distintos sistemas de reparación, como ser, los sistemas dependientes de tiorredoxina o glutaredoxina (eliminación de puentes disulfuro y disulfuros mixtos), metionina sulfóxido reductasas (reducción de metionina sulfóxidos), sulfiredoxinas (eliminación de grupos sulfénicos en cisteínas), etc (Demir y Koc, 2011).

1.9.1. Metionina sulfóxido reductasas.

Los aminoácidos, tanto en su forma libre como los que forman parte de proteínas, están expuestos a modificaciones oxidativas mediadas por EROs. La metionina es el aminoácido más susceptible a la oxidación, junto con la cisteína y el triptófano. Cuando la metionina es oxidada da origen a una mezcla racémica de metionina-R-sulfóxido (Met-R-SO) y metionina-S-sulfóxido (Met-S-SO) (figura 1.3). Las características fisicoquímicas de la metionina y la metionina sulfóxido son diferentes, siendo la primera de naturaleza no polar y la segunda un residuo marcadamente más hidrofílico. Es por esto que la oxidación de residuos de metionina puede acarrear importantes cambios estructurales en las proteínas afectadas y por consiguiente llevar a la pérdida de funcionalidad de las mismas. Hay que destacar que en los últimos años se ha comprobado que dicho proceso también puede ser utilizado de forma endógena por la célula, en procesos de señalización celular. Esto es posible porque existen reductasas capaces de revertir el proceso de oxidación, las metionina sulfóxido reductasas (MSRs), las cuales son dependientes de tioles y existen en casi todos los organismos vivos (Moskovitz, 2005; Petropoulos y Friguet, 2006).

Las MSRs pueden reducir Met-R-SO o Met-S-SO a metionina. Son estereoespecíficas, por lo que actúan solo sobre uno de los isómeros. Debido a su función, estas enzimas juegan un papel importante en la defensa antioxidante de los organismos. Las MSRs son conocidas por su función en el mantenimiento de la homeostasis redox, la reparación de proteínas dañadas y la resistencia al estrés oxidativo, factores importantes en el desarrollo de ciertas enfermedades (Moskovitz, 2005; Petropoulos y Friguet, 2006).

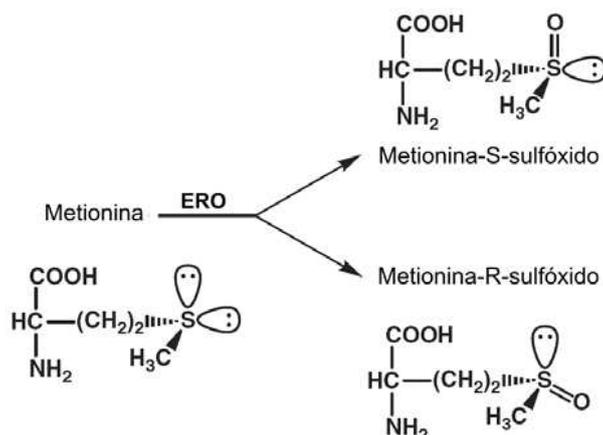


Figura 1.3: Susceptibilidad a la oxidación del átomo de azufre de la metionina. Imagen adaptada de (Banerjee, 2008).

1.9.1.1. Tipos de metionina sulfóxido reductasas.

La primera MSR, MsrA, fue descubierta hace 30 años. Se comprobó que esta enzima podía restaurar la función de la proteína ribosomal L12 de *E. coli*, al revertir su oxidación (Caldwell y col., 1978). Luego de este hallazgo inicial las MSR fueron estudiadas en varios organismos y se describieron nuevas formas. Actualmente estas enzimas pueden dividirse en tres grandes grupos de acuerdo a su especificidad de sustrato. Las MSR de tipo A (MsrA) actúan sobre el isómero S de la metionina sulfóxido, se encuentre la misma en estado libre o formando parte de un polipéptido (Sharov y col., 1999; Moskovitz y col., 2000; Lee y col., 2005; Boschi-Muller y col., 2008). Se ha descrito que la MsrA puede existir como una selenoproteína en algunos organismos inferiores, como ser algas verdes y algunas bacterias, esto se debe a que utiliza una selenocisteína catalítica en lugar de una cisteína (Kim y col., 2006; Kim y col., 2009).

Un segundo tipo de MSRs, conocidas como MsrB, son específicas para la reducción de Met-R-SO peptídica aunque también, con muy baja eficiencia, son capaces de reducir Met-R-SO libre. Por ejemplo, la eficiencia catalítica de la MsrB de *E. coli* para la reducción de Met-R-SO libre es 1000 veces menor que la de la MsrA del mismo organismo para la reducción de Met-S-SO libre. Por otra parte, cuando el gen de *E. coli* codificante para la MsrB es eliminado, la actividad específica de los extractos celulares para la reducción de Met-R-SO libre permanece inalterada (Grimaud y col., 2001; Etienne y col., 2003).

En mamíferos hay tres MsrB (MsrB1-3). Todas contienen un átomo de Zinc, coordinado por dos motivos CxxC, que estabilizan la estructura de la proteína. Una de estas enzimas, MsrB1, es una selenoproteína que contiene selenocisteína en el lugar

del residuo catalítico de cisteína, normalmente presente en otras MsrB (Kryukov y col., 2002; Kim y Gladyshev, 2004).

Un tercer tipo de MSR, fRMs_r, fue descubierta recientemente (Lin y col., 2007) y cataliza la reducción de Met-R-SO libre (no peptídica) (Lee y col., 2008; Le y col., 2009). Esta enzima presenta el plegamiento característico de un dominio GAF y es altamente específica para su sustrato (Ho y col., 2000). Análisis genómicos comparativos revelan que su ocurrencia está limitada a organismos unicelulares, mientras que los organismos multicelulares, incluyendo los mamíferos, carecen de esta proteína (Lin y col., 2007; Le y col., 2009). Esta observación sugiere que la fRMs_r se perdió durante la evolución en mamíferos, lo que concuerda con su incapacidad de reducir Met-R-SO libre. Las plantas también carecen de fRMs_r, sin embargo en un trabajo reciente se caracterizó una isoforma de MsrB de soja que posee la capacidad de reducir Met-R-SO libre con una eficiencia similar a las fRMs_r microbianas (Le y col., 2013).

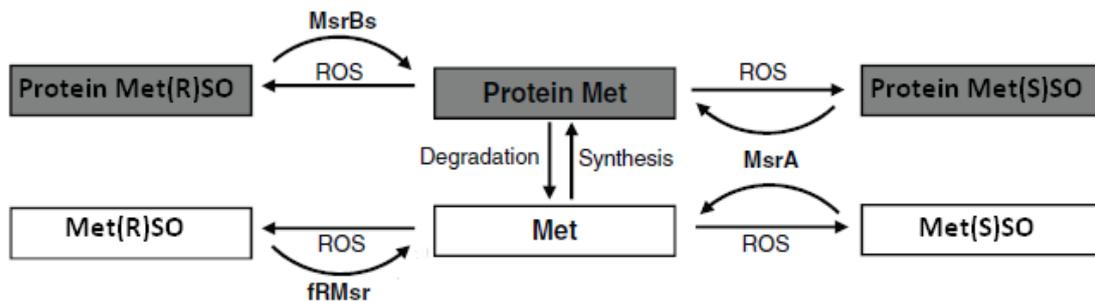


Figura 1.4: Clasificación de las enzimas reparadoras de metionina sulfóxido según su especificidad. Imagen tomada de (Le y col., 2009) .

1.10. Protistas.

El reino Protista, también llamado Protoctista, es aquel que contiene a todos aquellos organismos eucariotas que no pueden clasificarse dentro de alguno de los otros tres reinos eucarióticos: Fungi (hongos), Animalia (animales en sentido estricto) o Plantae (plantas). En el árbol filogenético de los organismos eucariotas, los protistas forman varios grupos monofiléticos separados, o incluyen miembros que están estrechamente emparentados con alguno de los tres reinos citados. Se les designa con nombres que han perdido valor en la ciencia biológica, pero cuyo uso es imposible desterrar, como “algas”, “protozoos” o “mohos mucosos” (Cavalier-Smith, 2002).

1.11. Parásitos y parasitismo.

Los parásitos fueron originalmente seres de vida libre y los ancestros de los actuales parásitos fueron capaces de encontrar un medio bioquímico y biofísico al que pudieron adaptarse, sacando algún tipo de beneficio (Sánchez, 2000).

El término parásito procede del griego y significa "sentado al lado del alimento". Un parásito es un organismo que no puede vivir de forma independiente, sino que vive utilizando recursos del hospedador. El parasitismo es un tipo de relación simbiótica entre organismos de diferentes especies. Uno de los organismos, el parásito, se beneficia de la asociación prolongada con el hospedador, mientras que este último se ve perjudicado, potencial o actualmente (Sánchez, 2000).

Existen diversas categorías de parásitos dependiendo del hospedador, así pues se habla de zooparásitos y fitoparásitos. Dependiendo de su localización, se diferencian en ectoparásitos (parásitos externos) y endoparásitos (parásitos internos), englobando en este caso tanto a los parásitos intracelulares como a los extracelulares. Considerando su ciclo vital, hay parásitos de ciclo directo (monoxenos) o de ciclo indirecto (heteroxenos). Otra forma de clasificar a los parásitos está relacionada con el tipo de dependencia que estos tienen con el hospedador, por lo cual pueden ser parásitos obligados o facultativos, y finalmente, si consideramos el tiempo de permanencia en el hospedador permite diferenciar entre parásitos temporales y permanentes (Sánchez, 2000).

Los parásitos, en cada caso, alternan entre diferentes ambientes a través de su ciclo de vida. El punto de partida para el inicio de una interacción biológica de tipo parasítica se puede dar por la ingestión de la forma infectiva del protozoario por su hospedador, la inyección mediante la intervención de algún tipo de artrópodo vector o la invasión activa por parte de los mismos protozoarios. Una vez dentro del hospedador necesitan adaptarse para sobrevivir a la respuesta inmune específica e inespecífica. Esto es conseguido mediante diferentes mecanismos de evasión que utiliza el parásito (secreción-excreción de antígenos, variabilidad antigénica, etc.), afectando al hospedador directamente o indirectamente. Realmente el éxito del parásito se mide no por los trastornos que causa a su hospedador, sino por su capacidad para adaptarse e integrarse al medio interno de este último (Sánchez, 2000).

1.12. Protozoos parásitos.

Los protozoos constituyen un grupo de organismos diversificados que en su mayoría son heterótrofos unicelulares y generalmente se reproducen asexualmente por simple división celular, aunque algunos también tienen ciclos sexuales con meiosis y fusión de gametos haploides, dando lugar a cigotos diploides. La gran mayoría de los protozoos son aerobios, sin embargo existen algunos que se adaptaron posteriormente a una forma de vida anaerobia (ya que habitan nichos anóxicos). De forma general, se puede afirmar que todos los protozoos tienen un antecesor aerobio. Los protozoos son organismos unicelulares, aunque puedan existir grupos con dos núcleos, o incluso con muchos núcleos. Son de pequeño tamaño, sin separación entre lo somático y lo germinal, por lo que cuando un protozoo se reproduce sexualmente, todo el individuo se transforma en gamonte generador de gametos de uno u otro sexo (Sánchez, 2000).

Entre los protozoos abundan las especies de hábito parasítico. Los protozoos parásitos están ampliamente esparcidos en la naturaleza y pueden afectar tanto a plantas, invertebrados y a la mayoría de los vertebrados, incluyendo a los humanos. Los protozoos parásitos frecuentemente presentan ciclos de vida muy complejos y especializados. En humanos la infección con alguno de estos parásitos produce enfermedades graves que en algunos casos pueden llegar al óbito.

1.13. *Entamoeba histolytica*.

1.13.1. *El parásito.*

Entamoeba histolytica es un parásito microaerófilo que genera severos problemas de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo, siendo el agente causal de la disentería amebiana y de los abscesos hepáticos amebicos. De acuerdo con los reportes de la Organización Mundial de la Salud este organismo causa varios millones de casos de enfermedad y hasta 100.000 muertes por año. Está entre las enfermedades parasitarias que afectan a mayor número de personas, siendo precedida solo por la malaria (WHO, 1997).

La primera descripción de la especie fue dada por el ruso Fedor Lösch in 1875, quien observó trofozoítos en las heces de granjeros con disentería y llamó al parásito *Amoeba coli*. Recién en 1903 Fritz Schaudinn estableció el vigente nombre de *Entamoeba histolytica*, indicando su habilidad para destruir tejidos del huésped.



Figura 1.5: Cultivo de *E. histolytica* en fase exponencial.

A pesar de que la enfermedad se presenta habitualmente en regiones cálidas y húmedas del planeta, se ha observado en casi todas las latitudes (Brandt y Tamayo, 1970) (figura 1.6). Frecuentemente las infecciones con *E. histolytica* son asintomáticas y se auto resuelven sin inconvenientes. Sin embargo, un 4 - 10% de estos portadores asintomáticos desarrollan la enfermedad en el transcurso de un año (Gathiram y Jackson, 1987).

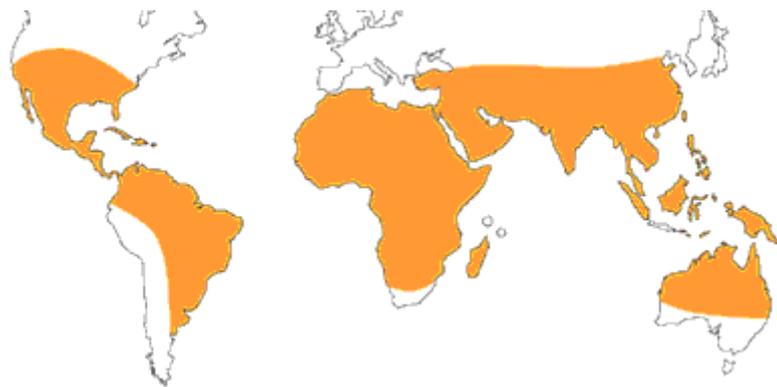


Figura 1.6: Distribución geográfica de la amebiosis. (OMS 2004).

El ciclo de vida de *E. histolytica* es simple comparado con el de otros protozoos, consistiendo solo de un estadio vegetativo en forma de trofozoíto y un estadio infeccioso en forma de quiste. Los quistes son transmitidos usualmente vía fecal – oral ya sea por el consumo de agua (o comida) contaminada o por contacto directo con materia fecal. Luego de ser ingeridos, el quiste tetranucleado pasa a través del estómago sin ser dañado por el ambiente ácido del mismo, gracias a la protección de su pared de quitina. Al alcanzar la sección proximal del colon se produce el desenquistamiento liberando ocho trofozoítos, los cuales posteriormente se adhieren a la mucosa del colon iniciando la infección. Los trofozoítos se alimentan de la flora bacteriana y se dividen por fisión binaria. Pueden invadir el tejido intestinal del huésped, proceso en el que fagocitan eritrocitos y consecuentemente producen colitis amebiana o incluso

pueden pasar a circulación portal y llegar al hígado donde desencadenan cuadros de absceso hepático (Nozaki y Bhattacharya, 2015). Alternativamente los trofozoítos pueden enquistarse y abandonar el colon junto con la materia fecal, cerrando así el ciclo infeccioso (figura 1.7).

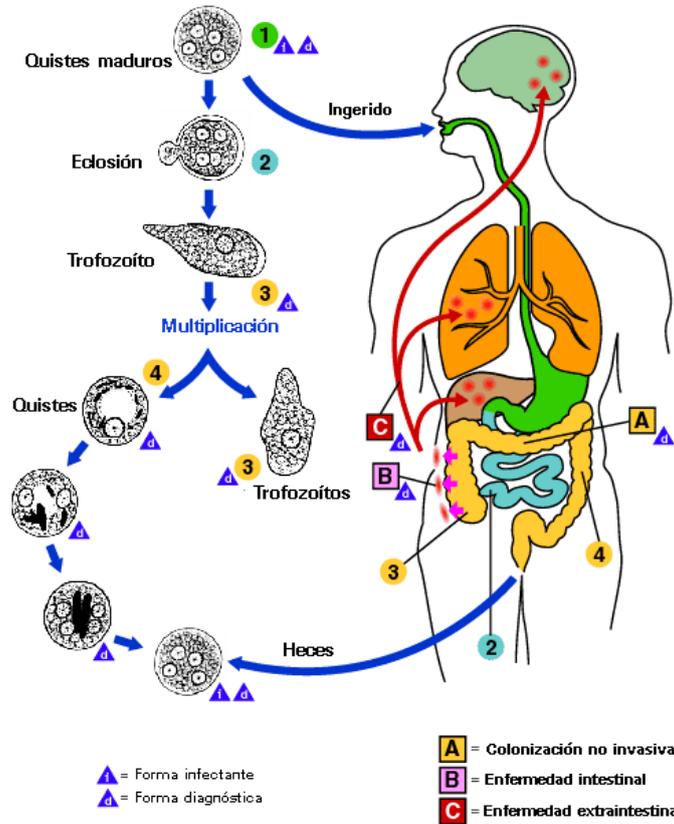


Figura 1.7: Morfología y ciclo de vida de *E. histolytica*. Imagen tomada de www.cdc.gov.

Existen dos tipos principales de manifestaciones clínicas en la amebiosis humana. La primera es la forma intestinal, colitis o disentería amebiana, donde se presentan úlceras en los tejidos submucosos. En estado avanzado estas úlceras presentan formas en botella debido a la expansión lateral de los trofozoítos, luego de penetrar el epitelio intestinal. El tejido subyacente presenta menor resistencia lo que produce úlceras con esa forma característica. Si el parásito entra en contacto con capilares sanguíneos puede extravasarse y pasar a circulación afectando distintos órganos y dando origen a un segundo tipo de manifestación clínica conocida como amebiosis extraintestinal. La forma extraintestinal mas frecuente es el absceso hepático, produciendo grandes lesiones necróticas en el hígado (Stanley, 2003). Otros órganos tales como los pulmones o el cerebro pueden ser afectados aunque esos casos son menos frecuentes.

1.13.2. Filogenia.

El género *Entamoeba* pertenece a la familia *Entamoebidae*. El mismo está emparentado de forma distante con los géneros *Mastigamoeba* y *Dictyostelium*. Existen amebas de vida libre como *E. moshkovskii*, comensales intestinales como *E. coli* y otras que causan infecciones orales como *E. gingivalis*. Por otra parte, *E. invadens*, ameba parásita de reptiles, se ha constituido como un modelo interesante para el estudio de este tipo de organismos ya que es relativamente sencillo inducir su enquistamiento en cultivos axénicos (Eichinger, 1997), algo que por el momento no es posible hacer con *E. histolytica* (en cultivo).

Taxonomía

Reino: Protista
Filo: Amoebozoa
Clase: Archamoebae
Orden: Entamoebida
Familia: Entamoebidae
Género: *Entamoeba*
Especie: *E. histolytica*

Debido a su falta de mitocondrias *E. histolytica* fue agrupada durante mucho tiempo junto con otros dos parásitos microaerófilos, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, en un grupo parafilético denominado Archezoa. Se pensaba que este grupo representaba a los descendientes de la primera célula eucariota, aquella que existió previo al evento de endosimbiosis de una α -proteobacteria que dio origen a la mitocondria. Sin embargo, en 1995 se encontró en *E. histolytica* una proteína homóloga a una chaperona mitocondrial, dando la primer evidencia, entre muchas otras que le siguieron, que estos organismos en realidad sufrieron la pérdida secundaria de dicha organela (Clark y Roger, 1995).

En un comienzo todos los organismos améebicos encontrados en pacientes humanos fueron catalogados como *E. histolytica*. En 1925, Émile Brumpt sugirió que debía existir al menos otra especie que era morfológicamente indistinguible de *E. histolytica* pero que no causaba enfermedad. Propuso el nombre de *E. dispar* para esta nueva especie. Datos moleculares corroboraron esta afirmación recién transcurridas varias décadas (Sargeant y col., 1978; Farri y col., 1980; Tannich y Burchard, 1991). Finalmente en 1993 *E. histolytica* fue separada de *E. dispar* y actualmente la existencia de ambas especies está ampliamente aceptada (Diamond y Clark, 1993).

1.13.3. Biología celular.

Los quistes de *E. histolytica* contienen cuatro núcleos, son redondeados y poseen un diámetro de 10-15 μm ; por su parte los trofozoítos son móviles y pueden alcanzar los 10-50 μm (Stanley, 2003).

Debido a su falta de mitocondrias, aparato de golgi y retículo endoplasmático, la estructura celular de *E. histolytica* fue vista siempre como una de las más simples entre los eucariotas. Estas ausencias se sustentaban en la creencia de que este organismo es un fósil viviente, una célula primitiva que no adquirió endosimbiontes procariotas (Cavalier-Smith, 1991; Poole y Penny, 2007). Sin embargo, en 1973 fueron descubiertos los llamados “hidrogenosomas” en *T. vaginalis*. Estas son organelas con doble membrana que producen hidrógeno molecular (Lindmark y Muller, 1973). Más tarde, se comprobó que las mitocondrias y los hidrogenosomas son homólogos, aerobios y anaerobios respectivamente, derivados del mismo endosimbionte (Hrdy y col., 2004). Organelas relacionadas denominadas “mitosomas” fueron encontradas en *G. lamblia* (Tovar y col., 2003) y *E. histolytica* (Mai y col., 1999; Tovar y col., 1999). A diferencia de los hidrogenosomas y mitocondrias, los mitosomas no producirían ATP, por lo que su función es todavía controversial, aunque una hipótesis sustenta que juegan un rol importante en la maduración de los centros de hierro-azufre de proteínas (Tovar y col., 2003; Maralikova y col., 2010).

Por otra parte, métodos modernos de microscopía sugieren que algunas de las numerosas vesículas presentes en los trofozoítos pueden corresponderse a componentes del retículo endoplasmático y del complejo de Golgi (Mazzuco y col., 1997; Ghosh y col., 1999; Bredston y col., 2005). Estos estudios muestran que si bien la apariencia de estas estructuras difiere de la forma tradicional, su función se encuentra conservada.

Los trofozoítos de *E. histolytica* contienen proteosomas en su citoplasma que parecen jugar un rol importante en la replicación y diferenciación celular (Makioka y col., 2002).

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una marcada habilidad para realizar movimiento ameboide y fagocitosis. Esta habilidad es una característica clave en su patogenicidad (Meza y col., 2006). La quimiotaxis también aparenta ser importante en ese sentido (Zaki y col., 2006).

Los trofozoítos exhiben bipolaridad, con un pseudópodo en la parte frontal y una estructura llamada uroide en la parte posterior (Bailey y col., 1992). Ambas estructuras se forman por la redistribución de la F-actina (Guillen, 1996). El proceso llamado

“capping” es un mecanismo de evasión inmunológica en el cual los receptores de superficie que han sido expuestos a los anticuerpos del huésped, o proteínas del complemento, son transferidos a sitios particulares de la superficie celular formando parches. Luego, estos parches se mueven hacia el uroide donde son concentrados. Finalmente, se eliminan junto con la estructura uroideal (Arhets y col., 1995).

1.13.4. *El genoma.*

Los cromosomas de *E. histolytica* no se condensan durante la mitosis, haciendo dificultosa la identificación de su ploidía y número exacto. La electroforesis de campo pulsado predice 14 cromosomas que van desde los 0.3 a los 2.2 Mpb y una posible ploidía de 4 (Willhoeft y Tannich, 1999). Sin embargo, un estudio reciente muestra que los procesos de citoquinesis y división nuclear no están coordinados, dando como resultado un amplio rango de posibles ploidías (Mukherjee y col., 2009).

El proyecto genoma de la cepa patogénica HM-1:IMSS fue publicado en 2005 (Loftus y col., 2005). Fueron identificados 9938 genes. Los mismos tienen un tamaño promedio de 1170 pb. Uno de los hallazgos más significativos es la presencia de un considerable número de genes que presumiblemente tengan origen bacteriano y hayan sido adquiridos por eventos de transferencia horizontal. Varias enzimas metabólicas importantes han sido reemplazadas por otras de origen procariota. Algunos de los primeros ejemplos estudiados son la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (Sanchez y col., 2002), la enzima málica, la acetil-CoA sintetasa (Field y col., 2000), la aldehído alcohol dehidrogenasa (Bruchhaus y Tannich, 1994), la piruvato ferredoxina dehidrogenasa y ferredoxina (Rosenthal y col., 1997).

La publicación del proyecto genoma de *E. histolytica* impulsó ampliamente la investigación en este organismo, haciendo posible la implementación de nuevas estrategias tales como la expresión de genes, análisis del transcriptoma, estudios proteómicos, etc.

1.13.5. *Metabolismo.*

E. histolytica vive en el intestino humano, por esto tiene acceso a muchos compuestos ya elaborados, derivados del huésped o de la flora intestinal, tales como lípidos o colesterol (Das y col., 2002).

El estilo de vida de *E. histolytica* moldeó fuertemente su metabolismo. El ambiente en donde el parásito se desenvuelve excluye la posibilidad de realizar fosforilación oxidativa. A su vez, al no poseer el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la

ameba depende de la fosforilación a nivel del sustrato para su provisión de energía (Reeves, 1984). En *E. histolytica* la glicólisis ocurre en el citosol, no existiendo compartimentación en lo que a la producción de energía se refiere.

La mayor parte del ATP es generado durante la glicólisis, sin embargo en el proyecto genoma se encontraron varios genes, algunos de origen bacteriano, que podrían contribuir a la producción de ATP durante el catabolismo de aminoácidos, por ejemplo mediante aminotransferasas (Anderson y Loftus, 2005; Clark y col., 2007). Típicamente, luego del primer paso de transaminación se genera un 2-cetoácido, que puede ser piruvato u otro. Estos 2-cetoácidos pueden ser utilizados por la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) para generar tioésteres-CoA desde los cuales se genera una molécula extra de ATP.

La enzima PFOR es de gran importancia para el parásito, ya que el mismo carece de piruvato deshidrogenasa o piruvato decarboxilasa. Esta proteína que contiene grupos de hierro-azufre decarboxila oxidativamente al piruvato a acetyl-CoA. Los electrones son transferidos a una ferredoxina, la cual luego deberá reducir otros sustratos. Por otra parte, la PFOR es una de las principales enzimas que producen la activación del metronidazol que es la principal droga antiamebica de uso terapéutico (Muller, 1986). Para ser activo farmacológicamente, el metronidazol debe ser reducido en su grupo nitro originando un nitroradical que es quien tiene las propiedades tóxicas (Muller, 1983). Este radical se reduce aún más para generar nitrosoimidazol, el cual es capaz de reaccionar con grupos sulfidrilos (West y col., 1982) y con el ADN (Ludlum y col., 1988). Este camino de activación sucede solo en un ambiente anaerobio, por ejemplo dentro de las células de los llamados amitocondriados. En un ambiente aerobio, como ser las células humanas, el nitroradical es inmediatamente reoxidado dando origen a un ciclo fútil (Mason y Holtzman, 1975). Este proceso genera estrés oxidativo pero no ocasiona un daño mayor a la célula aerobia, siendo así compuestos seguros para su uso como fármacos en humanos.

En *Giardia* y *Trichomonas* la resistencia a metronidazol es un problema de importancia, por ejemplo en *Giardia* hasta un 20% de los aislamientos clínicos presentan resistencia (Ali y Nozaki, 2007). En estos casos los niveles de PFOR se encuentran disminuidos, por lo cual evitar la activación de la droga parece ser el mecanismo de resistencia en *Giardia*. En *Trichomonas* la aparición de resistencia también parece estar vinculada con la disminución o hasta la pérdida de la expresión de la PFOR y la ferredoxina. Hasta el momento no se reportaron aislamientos clínicos de *E. histolytica* resistentes a metronidazol pero si se logró inducir en el laboratorio la aparición de cepas tolerantes hasta una concentración de 40 μ M, dosis letal en

amebas no adaptadas (Wassmann y col., 1999). En estas líneas celulares resistentes se encontró aumentada la expresión de la superóxido dismutasa (SOD) y de la peroxirredoxina (PRX). La ferredoxina 1 (Fd1) se encontró disminuida, mientras que la expresión de la PFOR lo hizo muy levemente. Estos resultados ponen de manifiesto las diferencias existentes en las bases moleculares de la resistencia al metronidazol por parte de estos parásitos amitocondriados.

Debido a que se conocen solo un limitado número de drogas quimioterapéuticas contra estos organismos, y que casos de resistencia son reportados cada vez con mayor frecuencia, se debe intensificar la búsqueda de nuevas drogas, identificación de blancos moleculares y de los caminos metabólicos que participan en la aparición de resistencias.

1.13.6. Fermentación de la glucosa.

El catabolismo de la glucosa comienza con su transporte a través de la membrana mediante difusión facilitada. El valor del K_m para este transporte es bajo, por lo que se ha sugerido que este es el paso limitante en el flujo glicolítico (Reeves, 1984).

Las actividades enzimáticas que catalizan la fermentación de la glucosa se listan en la tabla 1.1. Los intermediarios metabólicos son convencionales pero varias de las enzimas involucradas utilizan cosustratos poco habituales (Reeves, 1984). Los pasos de la vía se muestran esquemáticamente en la figura 1.8.

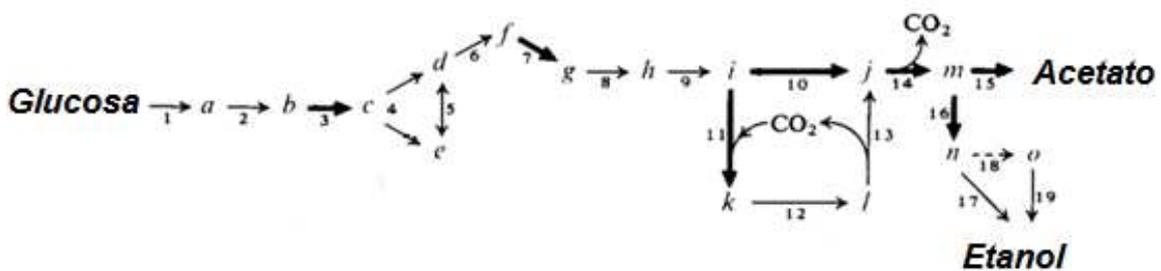


Figura 1.8: Esquema del proceso fermentativo de *E. histolytica*. Las referencias para las enzimas y metabolitos involucrados se detallan en la tabla 1.1. Imagen adaptada de (Reeves, 1984).

Paso	Enzima	Código	Producto
1	Glucocuinasa	a	Glucosa-6-fosfato
2	Glucosafosfato isomerasa	b	Fructosa-6-fosfato
3	Fosfofructoquinasa	c	Fructosa-1,6-bifosfato
4	Aldolasa	d	Gliceraldehído 3-fosfato
		e	Dihidroxiacetona fosfato
5	Triosafofosfato isomerasa	d	Gliceraldehído 3-fosfato
6	Gliceraldehidofosfato deshidrogenasa	f	1,3 Difosfoglicerato
7	Fosfoglicerato quinasa	g	3-Fosfoglicerato
8	Fosfoglicerato mutasa	h	2-Fosfoglicerato
9	Enolasa	i	Fosfoenolpiruvato
10	Piruvato fosfato diquinasa	j	Piruvato
11	PEP carboxifosfotransferasa	k	Oxalacetato
12	Malato deshidrogenasa	l	L-Malato
13	Malato deshidrogenasa descarboxilante	j	Piruvato
14	Piruvato sintasa	m	Acetil-CoA + CO ₂
15	Acetil-CoA sintetasa	-	Acetato
16	Acetaldehído deshidrogenasa	n	Tiohemiacetal unido a enzima
17	Alcohol deshidrogenasa	-	Etanol
18	Hidrólisis no enzimática del tiohemiacetal	o	Acetaldehído
19	Alcohol deshidrogenasa	-	Etanol

Tabla 1.1: Enzimas y metabolitos partícipes de la vía fermentativa de *E. histolytica*. Los números y letras referenciadas corresponden a aquellos presentados en la figura 1.8.

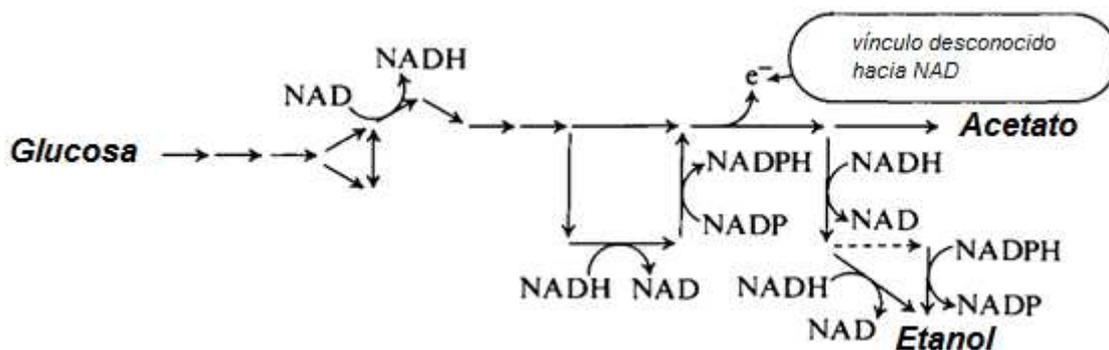


Figura 1.9: Esquema de los pasos de la vía fermentativa de *E. histolytica* donde están involucrados el NAD(P)⁺ y NAD(P)H. El esquema se corresponde con el presentado en la figura 1.8.

Los pasos con características especiales se describen brevemente (Reeves, 1984):

Paso 3. La fosfofructoquinasa de *E. histolytica* emplea pirofosfato inorgánico en lugar de un nucleósido trifosfato como dador de fosfato.

Paso 7. La fosfoglicerato quinasa es selectiva para nucleótidos de guanina en lugar de adenina.

Paso 10. *E. histolytica* carece de piruvato quinasa por lo que el fosfoenolpiruvato es convertido a piruvato por una piruvato fosfato diquinasa

Paso 11-13. Alternativamente, el piruvato es formado de manera secuencial por la acción de una fosfopiruvato carboxilasa, una malato dehidrogenasa (NAD^+) y una malato dehidrogenasa (decarboxilante, NADP^+). Junto con la piruvato fosfato diquinasa estas enzimas constituyen un “loop”, la fosfopiruvato carboxilasa genera PP_i en la carboxilación del PEP y luego ese PP_i es utilizado en la conversión de PEP a piruvato por la piruvato fosfato diquinasa. Al mismo tiempo, las dos deshidrogenasas proveen el equivalente funcional a una actividad NADH:NADP^+ transhidrogenasa.

Paso 14. La piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) cataliza la reacción entre el piruvato y la coenzima A (CoA) para formar acetil-CoA y CO_2 , generando electrones que son aceptados por la ferredoxina, pero no así por el NAD^+ o NADP^+ . La PFOR reemplaza las actividades de la piruvato decarboxilasa o de la piruvato dehidrogenasa, presentes en otros organismos pero ausentes en este parásito.

Paso 15. Esta enzima cataliza la formación de acetato desde el acetil-CoA utilizando ADP, P_i y generando CoA y ATP.

Paso 16. La acetaldehído dehidrogenasa (acilante) es una actividad NAD^+ dependiente que convierte reversiblemente el grupo acetal del acetil-CoA en un aldehído. El producto inmediato de esta reacción está unido a la enzima como un acetaldehído tiohemiacetal, el cual se equilibra lentamente con acetaldehído libre, probablemente de manera no enzimática (paso 18).

Paso 17. Este paso es llevado a cabo por una actividad alcohol dehidrogenasa NAD^+ dependiente. Esta actividad está localizada en la misma proteína que contiene la actividad acetaldehído dehidrogenasa. Por lo tanto los pasos 16 y 17 son catalizados por una enzima bifuncional donde la segunda actividad utiliza como sustrato el tiohemiacetal producto de la primera.

Paso 19. Este paso es catalizado por una alcohol dehidrogenasa NADP^+ dependiente. Esta enzima reduce acetaldehído libre.

1.13.7. Rol del oxígeno en los caminos metabólicos y productos finales.

Habitualmente se cataloga a *E. histolytica* como un parásito anaerobio. La base de esta aseveración se halla en el hecho de que este organismo requiere una baja tensión de O_2 para su multiplicación y crecimiento óptimo. También colabora el hecho de carecer de mitocondrias. Sin embargo, la condición de crecimiento *in vitro* es microaerofílica ($<30 \mu\text{M}$ de O_2 disuelto) (Band y Cirrito, 1979); esta concentración es similar a aquella encontrada en el colon humano (Ladas y col., 2007). Por otra parte, durante la etapa invasiva, el parásito se encuentra con concentraciones aún mayores

de O₂ (40 μM y 65 μM en el hígado y mucosa gástrica, respectivamente) (Vaupel y col., 1989). A su vez, para alcanzar otros órganos como cerebro y pulmones, tiene que desplazarse por los vasos sanguíneos donde la concentración de O₂ es de 50 μM en sangre venosa y 130 μM en sangre arterial (Radisic y col., 2005). Por todo lo detallado queda en evidencia que el patógeno tiene una importante tolerancia al O₂.

Los productos finales del metabolismo anaerobio de carbohidratos son etanol y CO₂. La presencia de O₂ produce un cambio en los productos finales originando una menor producción de etanol y la aparición también de acetato como producto de excreción (Reeves, 1984).

En estudios preliminares se observó una disminución de la concentración de O₂ en los cultivos axénicos de *E. histolytica*. Este hecho constituyó la primer evidencia de que el parásito metaboliza dicho compuesto (Wittner, 1968). Posteriormente se comprobó que los trofozoítos cultivados axénicamente no solo respiran sino que tienen una alta afinidad por el O₂, comparable a la de organismos aerobios (Weinbach y Diamond, 1974). Se piensa que esta vía de transporte de electrones hacia el O₂ se lleva a cabo por componentes que contienen flavinas o centros de hierro azufre, ya que el parásito carece de hemoproteínas. Esta respiración no tiene fines energéticos y se ha postulado que podría ser una forma de detoxificación de O₂ o de regeneración de cofactores oxidados, reducidos durante la glicólisis (Reeves, 1984).

1.13.8. Defensas antioxidantes.

Los trofozoítos de *E. histolytica* usualmente residen y multiplican en el intestino humano, el cual constituye un ambiente anaeróbico o microaerobio. Sin embargo, durante la invasión a tejidos, la ameba es expuesta a una mayor tensión de O₂ y tiene que eliminar los metabolitos tóxicos producidos por los fagocitos, activados durante el estallido respiratorio. El parásito carece de una cadena respiratoria de transporte de electrones convencional, a pesar de esto, *E. histolytica* “respira” y tolera hasta un 5% de O₂ en la fase gaseosa (Band y Cirrito, 1979).

E. histolytica carece de GSH, principal tiol de bajo peso molecular para la mayoría de las células eucariotas aerobias, y en su lugar emplea cisteína. Recientes estudios metabolómicos comprobaron que, a pesar de contar con las enzimas necesarias para su síntesis, el parásito no produciría cisteína de forma endógena (o por lo menos en los niveles necesarios). Esto concuerda con el hecho de que el cultivo *in vitro* de trofozoítos requiere del agregado de una alta concentración de cisteína, la cual no puede ser reemplazada por otros tioles (Husain y col., 2010). Entonces, como

es de esperar, el parásito carece de enzimas que requieren GSH como cofactor, tales como glutatión-S-transferasas, glutatión peroxidasas, glutatión reductasas o glutaredoxinas. Finalmente, en el genoma de *E. histolytica* también están ausentes genes que codifiquen para catalasas u otras peroxidasas (Loftus y col., 2005; Clark y col., 2007).

Se ha comprobado que el parásito posee una Fe-SOD enzimáticamente activa (Bruchhaus y col., 1992). También se identificaron en *E. histolytica* cinco genes que codifican para peroxirredoxinas, todas pertenecientes a la familia de 2-Cys (Clark y col., 2007). Estudios bioquímicos demostraron que las proteínas codificadas por estos genes son capaces de detoxificar H₂O₂ e hidroperóxido de cumeno (Bruchhaus y col., 1997; Poole y col., 1997). Las reacciones catalizadas por las peroxirredoxinas son dependientes de la presencia de tiorredoxinas. Fueron identificados en el parásito cinco genes codificantes para tiorredoxinas citoplasmáticas clásicas (Arias y col., 2007; Clark y col., 2007; Arias y col., 2008). Así, se logró reconstruir y caracterizar *in vitro* el sistema de detoxificación de H₂O₂ dependiente de tiorredoxina presente en *E. histolytica*. Las tiorredoxinas son mantenidas en su forma reducida por una tiorredoxina reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como sustrato reductor (Arias y col., 2012).

Como se mencionó anteriormente, en *E. histolytica* se han encontrado varios genes que fueron adquiridos por eventos de transferencia horizontal desde procariotas. Muchas de estas proteínas están implicadas en rutas metabólicas centrales, sin embargo otras presentan una alta identidad de secuencia con enzimas de vías antioxidantes presentes en bacterias anaerobias (sección 1.8). Entre ellas se encuentran una rubreritina, cuatro proteínas flavodiférricas y una NADH-oxidasa. Al momento se desconoce si estas enzimas son funcionales *in vivo* ya que se ignora cuáles son sus posibles compañeros redox (Loftus y col., 2005; Clark y col., 2007).

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el NO[•], liberado por los macrófagos activados, desempeña un papel crítico en la eliminación de trofozoítos de *E. histolytica* (Lin y Chadee, 1992; Lin y col., 1994). La capacidad de establecer infecciones denota que el parásito debe contar con defensas contra especies oxidantes del nitrógeno, sin embargo no existen demasiados reportes al respecto. Se comprobó que *E. histolytica* produce una arginasa funcional que es capaz de mermar la concentración de arginina presente en el medio circundante. De esta forma se reduce significativamente la producción de NO[•] por parte de los monocitos y neutrófilos, ya que el NO[•] se genera enzimáticamente por acción de la NO[•] sintasa utilizando arginina como sustrato (Elnekave y col., 2003).

Entonces, bajo condiciones anaeróbicas, las ferredoxinas reducidas deberían tener alguna conexión con el NAD⁺, por ejemplo a través de una ferredoxina : NAD(P)⁺ reductasa. El NAD(P)H generado se utilizaría para la producción de etanol, llevada a cabo por las alcohol deshidrogenasas. De esta manera se regenerarían los cofactores oxidados necesarios para que la glicólisis siga su curso.

Bajo condiciones aeróbicas parte de los equivalentes de reducción son probablemente desviados hacia el O₂, dando origen al fenómeno de “respiración”. La reducción de oxígeno podría utilizar NAD(P)H o quizás ferredoxinas, regenerándolas directamente. Este gasto de equivalentes de reducción podría explicar la producción de acetato bajo condiciones aeróbicas. Al existir menor poder reductor disponible para transformar el acetil-CoA a etanol, el mismo es transformado en acetato por una acetil-CoA sintetasa en una reacción no reductiva. De esta forma se regenera la CoA necesaria para continuar con la glicólisis.

¿Cuál es la identidad de la oxidasa terminal presente en *E. histolytica*?

Se ha demostrado una importante actividad O₂ reductasa en este parásito. Esta actividad no produciría peróxidos in vivo (Lo y Reeves, 1980; Reeves, 1984). Hasta el momento se han estudiado varias proteínas con actividad NAD(P)H oxidasa pero todas generan H₂O₂ como producto (Lo y Reeves, 1980; Arias y col., 2007; Jeelani y col., 2010), por lo que es improbable que las mismas representen la vía principal de consumo de O₂. En *G. lamblia* se ha encontrado que la mayor parte del consumo de oxígeno se debe a una NADH oxidasa que cataliza la reducción de O₂ a H₂O. Se ha postulado que esta enzima podría constituir la oxidasa terminal presente en ese organismo (Brown y col., 1996; Brown y col., 1998). El proyecto genoma de *E. histolytica* expone la presencia de una NADH oxidasa putativa por lo que sería de interés develar si la misma puede cumplir funciones similares a la enzima de *Giardia* (Loftus y col., 2005).

E. histolytica posee cuatro isoformas de una proteína flavodiférrica (EhFDP) que no han sido estudiadas (Loftus y col., 2005). En bacterias anaerobias estas enzimas reducen O₂ a H₂O, por lo que podrían representar otro candidato para ser la oxidasa terminal de la ameba. Sin embargo, en bacterias, el dador de equivalentes de reducción para las FDP son las rubredoxinas, proteínas que están ausentes en el parásito.

¿Son funcionales en la detoxificación de especies reactivas del nitrógeno u oxígeno otras enzimas identificadas en el proyecto genoma?

Como se mencionó anteriormente, en *E. histolytica* se encuentran ausentes varias enzimas y compuestos participes en la defensa antioxidante de otros eucariotas. Sin embargo, se ha caracterizado el sistema de detoxificación dependiente de TRX, así como también una SOD (Bruchhaus y col., 1992; Arias y col., 2007). Otras enzimas, generalmente encontradas en procariotas anaerobios, y asociadas a la detoxificación de especies reactivas, han sido identificadas en el proyecto genoma de *E. histolytica* pero aún continúan sin estudiarse. Una de esas enzimas es la rubrerytrina (EhRr) que actuaría sobre el H₂O₂. También se encontraron las ya mencionadas FDPs, que en algunas bacterias tienen actividad NO[•] reductasa y que hasta el momento son las únicas candidatas para llevar adelante dicha actividad en el parásito (Loftus y col., 2005).

1.14. Tripanosomátidos.

La tripanosomiosis y leishmaniosis son enfermedades causadas por protozoos parasíticos flagelados de la familia *Trypanosomatidae*, conocidos como tripanosomátidos.

La leishmaniosis es causada por distintas especies y subespecies de protozoos del género *Leishmania* que se trasmite por la picadura de hembras de insectos dípteros, que en América se conocen con el nombre común “carachay” (*Lutzomyia sp.*). La enfermedad puede presentar distintas formas clínicas, leishmaniosis tegumentaria (cutánea, mucocutánea y cutánea difusa) y leishmaniosis visceral.

Por otro lado, los tripanosomas africanos (*Trypanosoma brucei sp.*) viven en el torrente sanguíneo del hospedero y causan una afección neurológica conocida como enfermedad del sueño (en humanos), la tripanosomiosis africana humana. Esta enfermedad es endémica en el África Sub-sahariana donde la mosca tse-tse (el principal vector) tiene su hábitat determinado por la temperatura y la humedad de la región (Cox y col., 2005).

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Puede transmitirse, fundamentalmente, a través de transfusiones y, vectorialmente, por la picadura de insectos hematófagos conocidos como triatominos (*Triatoma sp.*).

1.15. Características particulares de los tripanosomátidos.

Los tripanosomátidos poseen una estructura derivada de las mitocondrias que es característica de estos protozoos y que se conoce con el nombre kinetoplasto. El ADN mitocondrial es distinto al que podemos encontrar en el núcleo y se concentra en un determinado espacio de la mitocondria dando lugar al kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto contiene mini y maxi-círculos que se encuentran concatenados. Los maxi-círculos tienen genes que codifican para varias proteínas mitocondriales en tanto que los mini-círculos son más heterogéneos y contienen información codificante para los llamados ARN guías, los cuales son necesarios para la edición de los ARNm transcritos desde los maxi-círculos. La edición del ARN es también una particularidad de los tripanosomátidos (Souza, 2008).

Estos organismos tienen una organela derivada de los peroxisomas, llamada glicosoma en donde ocurre la mayor parte de las reacciones de la vía glicolítica. En esta organela ocurre la vía glucolítica desde la hexoquinasa hasta la fosfogliceratoquinasa. Otras funciones que ocurren en glicosoma son la biosíntesis de pirimidinas, la β -oxidación de ácidos grasos y el salvataje de purinas (Parsons, 2004; Michels y col., 2006; Souza, 2008).

Los tripanosomátidos poseen una única mitocondria muy ramificada y un único flagelo que participa en procesos celulares como motilidad y unión a sustratos (Souza, 2008). Poseen un fuerte citoesqueleto, compuesto de microtúbulos (Souza, 2008) y, contrariamente a lo que ocurre en otros eucariotas, el ADN de este organismo es transcripto continuamente en forma de un mensajero policistrónico. La maduración de este mensajero es llevado a cabo por un proceso de *trans-splicing* (Teixeira, 1998; Teixeira y daRocha, 2003).

Estos organismos representan un caso excepcional entre los eucariotas ya que al no existir ninguna regulación transcripcional, todos los genes son transcriptos. La regulación reside a nivel post-transcripcional (Teixeira, 1998; Teixeira y daRocha, 2003).

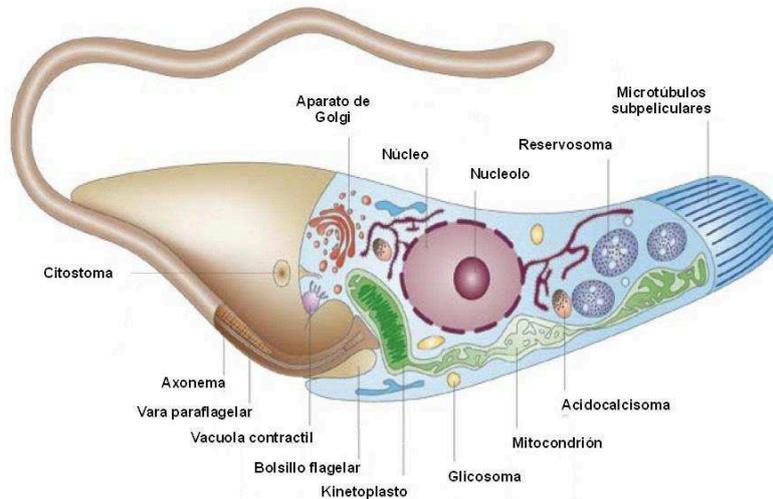


Figura 1.11: Esquema de la organización subcelular de un epimastigote de *T. cruzi*. Imagen tomada de (Souza, 2008).

1.16. *Trypanosoma cruzi*.

1.16.1. Taxonomía.

Dentro de la clase *Kinetoplastidae* se encuentra el orden Trypanosomatida al cual pertenece la familia *Trypanosomatidae* (triptanosomátidos). En dicha familia se encuentran, además del género *Trypanosoma*, otros géneros como *Leishmania*, *Phytomonas*, *Crithidia*, y *Leptomonas* los cuales parasitan animales, plantas, insectos y reptiles respectivamente.

Reino: Protista
 Filo: *Euglenozoa*
 Clase: *Kinetoplastidae*
 Orden: *Trypanosomatida*
 Familia: *Trypanosomatidae*
 Género: *Trypanosoma*
 Especie: *T. cruzi*

1.16.2. Morfología.

T. cruzi presenta tres formas morfológicas distintas: amastigote, epimastigote y tripomastigote.

Amastigote: esférico u ovalado. Es la forma replicativa en el interior de las células del hospedador.

Epimastigote: alargado y con el kinetoplasto localizado entre el núcleo y el flagelo. Es la forma replicativa en el tracto digestivo de los insectos vectores y en cultivos axénicos.

Tripomastigote: también alargado, pero con el núcleo localizado entre el kinetoplasto y el flagelo. Es la forma infectiva y no se divide.

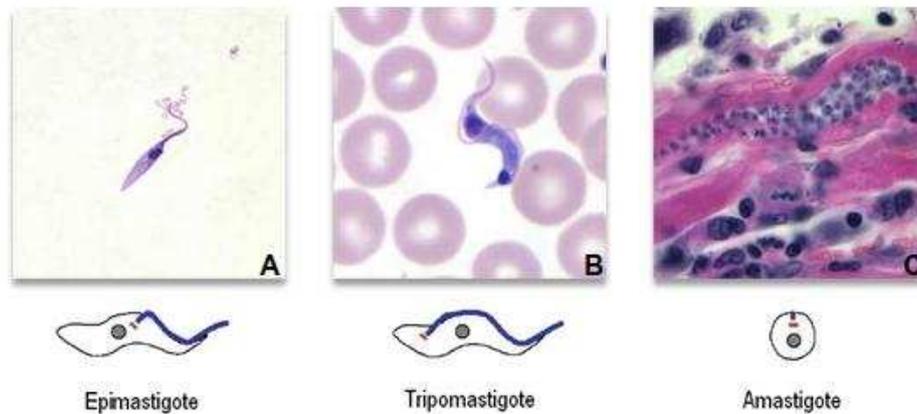


Figura 1.12: Formas morfológicas presentes durante el ciclo de vida de *T. cruzi*.

1.16.3. El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

El ciclo de vida del *T. cruzi* comienza cuando el insecto vector infestado se alimenta de un mamífero por succión. Simultáneamente, defeca cerca de la herida causada por la picadura liberando los tripomastigotes metacíclicos presentes en sus heces. Estas formas infectivas invaden las células en el sitio de la picadura. Para esto, el parásito se adhiere a la membrana plasmática de la célula mediante el reconocimiento de residuos de ácido siálico, el cual es removido y transferido a proteínas de la membrana plasmática del parásito (De Souza, 2002; Cox y col., 2005). En este momento se produce un reclutamiento de lisosomas al sitio de invasión (Tardieux y col., 1992; Burleigh, 2005), con la consecuente formación de una vacuola parasítica que permite la entrada del parásito a través de la vía endocítica (aún en células no fagocíticas). La vacuola se fusiona con más lisosomas para formar un fagolisosoma, desde donde el parásito escapa al citosol. En este lugar los tripomastigotes se transforman en amastigotes. Esta forma se multiplica por fisión binaria generando, luego de cinco días, alrededor de 500 amastigotes los que finalmente se diferencian a tripomastigotes rompiendo la célula (Cox y col., 2005). Estos parásitos escapan al espacio intercelular para infectar otras células o continuar

hacia el torrente sanguíneo desde donde circulan hacia otros tejidos. El ciclo continúa cuando otro insecto se alimenta de un individuo infectado. Dentro del vector, *T. cruzi* está confinado al tracto digestivo donde los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria. Una vez que alcanzan el recto, los parásitos se adhieren al epitelio y comienzan a diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos que serán liberados la próxima vez que el insecto se alimente (figura 1.13) (de Souza, 1984; Vickerman, 1985; Tyler y Engman, 2001; De Souza, 2002; Cox y col., 2005).

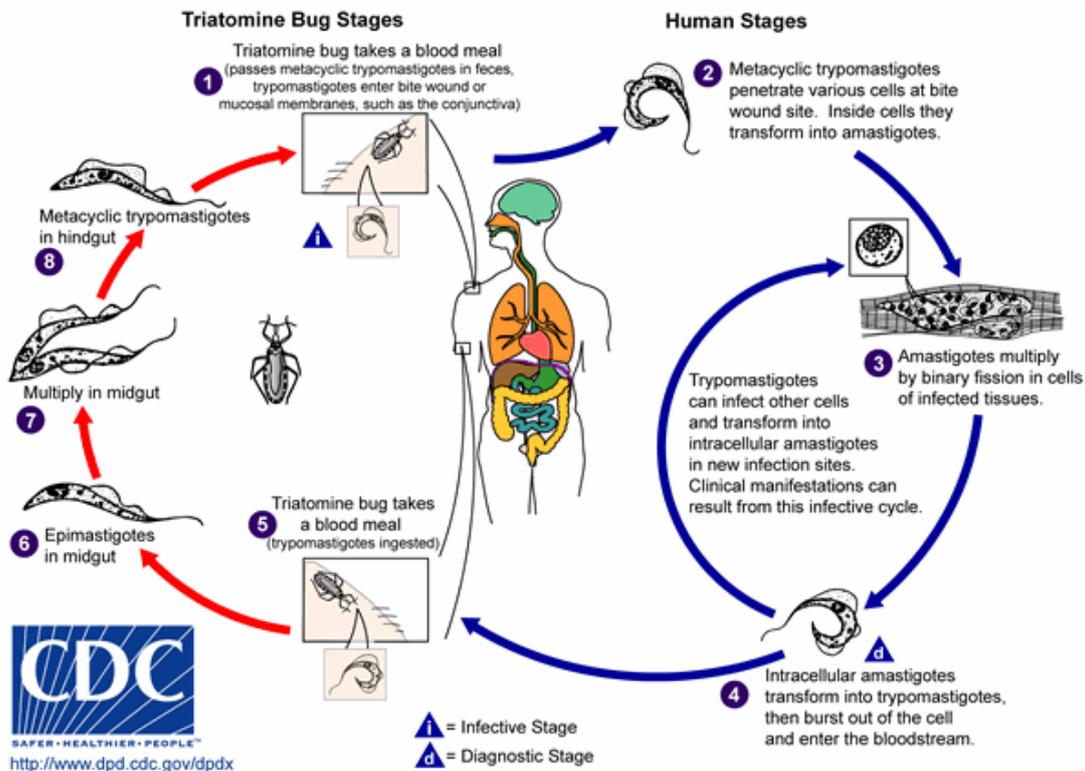


Figura 1.13: Ciclo de vida de *T. cruzi*. Imagen tomada de www.cdc.gov

1.16.4. Enfermedad de Chagas.

1.16.4.1. Transmisión: el vector.

La transmisión de la enfermedad de Chagas ocurre principalmente a través de insectos vectores que llevan el parásito en su tracto digestivo. Estos insectos pertenecen a la familia *Reduviidae*, sub-familia *Triatominae*. A la fecha hay más de 140 especies descritas (Maudlin y col., 2004). *Triatoma infestans*, es el principal vector en el sur de Sudamérica (Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y el sur de Perú), mientras que *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma dimidiata* colonizan el norte de Sudamérica y América Central (Maudlin y col., 2004).



Figura 1.14: Insecto vector *Triatoma infestans*. Imagen tomada de (Schaefer, 2003)

1.16.4.2. Aspectos clínicos.

Clínicamente, hay tres fases en la enfermedad de Chagas: aguda, indeterminada y crónica. Están caracterizadas por condiciones específicas y por el nivel de parásitos circulantes.

1.16.4.2.1. Fase aguda.

Tiene lugar poco después de la infección y puede ser letal. Normalmente no es detectada porque sus síntomas se confunden con los de otras afecciones. En más del 90% de los casos es asintomático (Teixeira y col., 2006). Puede haber lesión visible en el sitio de entrada, el chagoma cutáneo (Cox y col., 2005). Si el parásito atraviesa la membrana del ojo o conjuntiva, este se inflama originando lo que se conoce como el signo de Romana (Dias, 1997).

Luego de 7 a 10 días post-infección pueden aparecer fiebre, mialgias, somnolencia, calambres y diarrea, problemas respiratorios, dolor de músculos y articulaciones, sudoración, hepatosplenomegalia, problemas cardíacos como ser anomalías en el electrocardiograma y miocardiopatía (Teixeira y col., 2006; Punukollu y col., 2007). Luego de 2 a 3 meses estos síntomas desaparecen. Durante la fase aguda los casos de muerte están relacionados con pacientes con compromiso cardíaco, intestinal o nervioso (Teixeira y col., 2006). Los niños son los más afectados durante esta etapa especialmente los menores de 10 años.

1.16.4.2.2. Fase indeterminada.

Tiene lugar luego de la fase aguda. Es mayormente asintomática, con corazón, esófago y colon normales, a pesar de esto los individuos presentan serología positiva.

1.16.4.2.3. Fase crónica.

Luego de 20 a 50 años desde la infección, para un tercio de los individuos crónicos (Teixeira y col., 2006), la enfermedad evoluciona hacia la forma cardíaca (arresto cardíaco), digestiva (megaesofago y megacolon), o hacia la forma cardíaca y digestiva juntas (Coura, 2007). Se produce un avance “silencioso” del daño en órganos y tejidos. La forma cardíaca de la enfermedad de Chagas es la más común y severa. Sus signos son arritmia, insuficiencia cardíaca, bloqueos auriculares-ventriculares y tromboembolismo (Coura, 2007).

1.16.4.3. Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es dependiente de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. Durante la fase aguda, cuando los niveles de parásitos en sangre son altos y fácilmente detectables, se utilizan métodos parasitológicos directos (Freilij y Altcheh, 1995; Maudlin y col., 2004). En cambio, durante la fase crónica el número de parásitos en sangre está por debajo del límite de detección. En esta fase los títulos de anticuerpos contra antígenos de *T. cruzi* son altos y el diagnóstico se basa en la serología (Levin y col., 1991; Umezawa y Silveira, 1999). También se utilizan, en fase aguda o crónica y con diferente sensibilidad, métodos indirectos (Gomes, 1997; Luz, 1999; Schenone, 1999) siendo la detección a través de PCR el de más reciente desarrollo (Avila y col., 1993; Wincker y col., 1994).

A pesar de lo comentado, no existe a la fecha un método que posea alta sensibilidad, especificidad, que sea fácil de usar y de bajo costo (Schmunis, 2007).

1.16.4.4. Tratamiento Actual.

No hay cura para la enfermedad de Chagas. Desde finales de la década del '60 y principios de los '70, solo dos drogas han sido desarrolladas para ser utilizadas en su tratamiento: nifurtimox (su producción ha sido discontinuada en el actualidad), usado para las etapas agudas e intermedias tempranas de la enfermedad, y benznidazol, el cual requiere 60 días de tratamiento en infecciones agudas y es efectivo solamente en el 50% de los casos (Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

El nifurtimox genera compuestos reactivos, tóxicos para el parásito, el cual es deficiente en algunos de los mecanismos clásicos de detoxificación de radicales libres (Docampo y Moreno, 1984). El benznidazol interfiere con la síntesis de macromoléculas interactuando con intermediarios de nitroreducción (de Castro, 1993). Cuando son administradas en infecciones recientes, estas drogas disminuyen la

parasitemia a niveles indetectables, pero los resultados dependen del tiempo de tratamiento. Severos efectos colaterales ocurren durante este periodo. El nifurtimox causa anorexia, alteraciones psicológicas, náuseas, vómitos, cólicos intestinales y diarrea. El benznidazol tiene aún mayor cantidad de reacciones adversas, puede causar síntomas de hipersensibilidad, dermatitis, fiebre, dolores articulares y musculares, depresión de la médula ósea, agranulocitosis y polineuritis de los nervios periféricos, entre otras (Rodrigues Coura y de Castro, 2002). En varios países el benznidazol es la única droga que se encuentra comercialmente disponible.

No hay tratamiento para las etapas intermedias y crónicas de la enfermedad.

En el año 2003 se ha formado a partir de diversas organizaciones a lo largo del mundo la DNDi, Iniciativa de Drogas para Enfermedades Olvidadas, por sus siglas en inglés. El objetivo principal de la DNDi es desarrollar nuevas drogas o nuevas formulaciones que reemplacen o ayuden al tratamiento de las llamadas enfermedades olvidadas, tales como la enfermedad de Chagas.

El proceso completo que va desde la evaluación de un compuesto como un candidato, pasando por las pruebas clínicas en humanos y finalmente su disponibilidad en el mercado lleva muchos años y mucha inversión. La enfermedad de Chagas y muchas otras infecciones parasíticas afectan principalmente poblaciones postergadas económicamente, y la inversión en estos desarrollos, muy probablemente, podría ser considerada como no rentable para muchas compañías farmacéuticas (Witty, 1999).

1.16.4.5. Posibles blancos terapéuticos actualmente bajo evaluación.

Las poliaminas son compuestos de bajo peso molecular esenciales para procesos celulares como la síntesis de ácidos nucleicos y la estabilización de ciertas macromoléculas. Las poliaminas más comunes son la putrescina, espermidina y espermina. Varias enzimas están involucradas en la síntesis de poliaminas: arginasa, ornitina decarboxilasa (ODC), S-adenosilmetionina decarboxilasa (AdoMetDC), espermidina sintasa, tripanotión sintetasa (TS) y tripanotión reductasa (TR). Estas enzimas exhiben características que difieren de aquellas ortólogas en el hospedador humano, encontrándose algunas sólo en los parásitos (Heby y col., 2007).

Otras moléculas y caminos metabólicos de *T. cruzi*, están bajo evaluación como posibles blancos para nuevas drogas por la DNDi, asociaciones públicas/privadas y grupos de investigación independientes en todo el mundo. Entre ellas podemos mencionar varias enzimas involucradas en el metabolismo antioxidante, la proteólisis

mediada por cruzipaina, el metabolismo del pirofosfato y la biosíntesis de purinas, glicosilfosfatidilinositol y esteroides (Urbina y Docampo, 2003).

Pese a que el metabolismo de los hidratos de carbonos es un proceso altamente conservado entre los seres vivos dicha vía en *T. cruzi*, y varios protozoos kinetoplastidos relacionados, tiene características inusuales que la diferencia de la que se produce en otros eucariotas. En primer lugar, la mayor parte de la glicólisis se localiza en el glicosoma (Opperdoes, 1987; Taylor y Gutteridge, 1987). Por otro lado, la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, dos enzimas clave de la glicólisis, no son afectadas por los moduladores alostéricos clásicos reportados para mamíferos, hongos y bacterias (Racagni y Machado de Domenech, 1983; Urbina y Crespo, 1984; Taylor y Gutteridge, 1986). Por último, el flujo glicolítico no es influenciado negativamente por la presencia de oxígeno (efecto Pasteur) (Cazzulo y col., 1989). Se ha propuesto que la compartimentalización de la glicólisis puede constituir una alternativa evolutiva para regular el flujo glicolítico en tripanosomas a nivel del transporte de glucosa desde el citoplasma al glicosoma (Bakker y col., 1999).

1.16.5. Defensas antioxidantes.

Una vez inoculado en un huésped mamífero, *T. cruzi* depende de su capacidad para infectar células y, dentro de estas células, diferenciarse y replicarse. Para tener éxito en esta compleja secuencia de eventos, los parásitos deben estar equipados para hacer frente a las EROs generadas como consecuencia de su propio metabolismo aeróbico y como parte de la defensa antimicrobiana del huésped. La capacidad del patógeno para resistir el estrés oxidativo es esencial para la supervivencia durante la infección de los tejidos de mamíferos.

T. cruzi carece de enzimas detoxificantes clásicas, tales como la CAT, sin embargo, posee un metabolismo redox único (al igual que otros tripanosomátidos) dependiente de tripanotión [T(SH)₂]. El T(SH)₂ es un ditiol de bajo peso molecular que consiste de dos moléculas de GSH unidas covalentemente a una molécula de espermidina (Irigoin y col., 2008). El T(SH)₂ es mantenido en su forma reducida mediante la actividad de la tripanotión reductasa (TcTR), una flavoenzima dependiente de NADPH (Irigoin y col., 2008).

parte de estas enzimas (Arias y col., 2011). Actualmente en el proyecto genoma de *T. cruzi* solo se encuentran anotadas las MsrA. Estudios informáticos preliminares nos permitieron encontrar dos marcos abiertos de lectura, anotados como proteínas hipotéticas, que posiblemente representen las MSR restantes (MsrB y fRMsr). Con este trabajo de tesis se buscó completar el estudio del sistema, caracterizando funcionalmente la fRMsr del parásito.

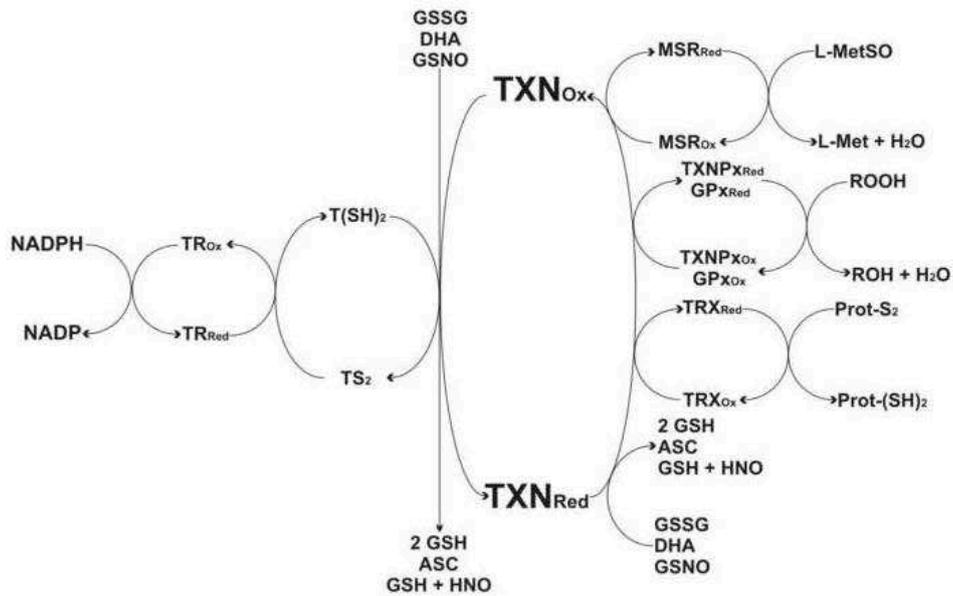


Figura 1.16: Esquema del sistema antioxidante dependiente de tripanotión en *T. cruzi*. Imagen tomada de (Arias y col., 2013).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar estudios a nivel del metabolismo redox en protozoos parásitos, específicamente en *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi*. Se pretende caracterizar nuevas enzimas involucradas en la defensa antioxidante y reparación del daño oxidativo en ambos organismos.

Objetivos específicos:

1. Identificación, clonado, expresión recombinante y caracterización funcional de posibles enzimas protectoras, características de procariotas anaerobios, en *E. histolytica*. Se intentará comprender como dichas proteínas, adquiridas por transferencia horizontal de genes, se insertan en el contexto metabólico del parásito.
2. Identificación, clonado, expresión recombinante y caracterización funcional de una posible metionina sulfóxido reductasa de tipo libre de *T. cruzi*. Con dicho objetivo se pretende profundizar el estudio del sistema reparador de metioninas presente en el parásito, iniciado previamente en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y reactivos químicos

Los componentes de los medios bacteriológicos fueron obtenidos de Laboratorios Britania (Argentina). Los reactivos para biología molecular fueron adquiridos de los representantes en Argentina de las firmas: Promega, Invitrogen y Thermo Scientific. Los materiales para purificación de proteínas fueron adquiridos a la firma GE Healthcare. Todos los demás reactivos químicos empleados fueron de la más alta calidad comercialmente disponible (Sigma-Adrich, Merck, BD o similares).

3.2. Protozoos utilizados y procedimiento de cultivo.

3.2.1. Entamoeba histolytica

Los trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente a 36,5 °C en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino adulto al 10 % (v/v) y complejo vitamínico de Diamond al 2 % (p/v) (Diamond y col., 1978).

3.2.2. Trypanosoma cruzi

Para este estudio se emplearon células de *T. cruzi* cepa CL-Brener. Los epimastigotes fueron cultivados axénicamente bajo condiciones de crecimiento logarítmico a 28 °C en medio LIT suplementado con hemina 20 µg/ml y suero fetal bovino al 10% (Gomez y col., 1989). Los tripomastigotes metacíclicos fueron obtenidos por cultivo axénico bajo condiciones de diferenciación espontánea de epimastigotes (Allaoui y col., 1999). Los amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* se obtuvieron mediante la infección de monocapas de células Vero con tripomastigotes metacíclicos (Andrews y Colli, 1982).

3.3. Cepas bacterianas y de levaduras, plásmidos y procedimiento de cultivo.

3.3.1. Cepas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron cuatro cepas de *E. coli*, para el clonado y expresión de las proteínas recombinantes, el genotipo de las mismas se detalla a continuación:

***E. coli* Top 10 F' (Invitrogen):** [lacI^q Tn10(Tet^R)] mcr A Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.

***E. coli* BL21 (DE3) (Novagen):** F⁻ ompT hsdS (r⁻ m⁻) gal dcm (DE3)

***E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen):** F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE (argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL) (Cm^R)

***E. coli* M15 (Qiagen):** F⁻ Φ80ΔlacM15 thi lac⁻ mtl⁻ recA⁺ pREP4 (lacI) (Kan^R)

Los ensayos de complementación en levaduras se llevaron a cabo con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* GY202, gentilmente suministrada por el Dr. Vadim Gladyshev (Department of Medicine, Harvard Medical School), cuyo genotipo es:

***S. cerevisiae* GY202:** MATa his3 leu2 met15 ura3 ΔmsrA::URA3 ΔmsrB::KAN ΔfRmsr::HIS3 (Le y col., 2009).

3.3.2. Plásmidos utilizados.

Para el desarrollo de este estudio se emplearon los plásmidos de clonado y expresión listados en la Tabla 3.1.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM [®] -T Easy	Vector de clonado (3 Kb) para productos de PCR. Alfa complementación, resistencia a ampicilina.	Promega
pRSET-A	Vector de expresión (2,9 kb) inducible por IPTG, promotor T7, fusión a polihistidina N-terminal, resistencia a ampicilina.	Invitrogen
pMAL-C2	Vector de expresión (6 Kb) inducible por IPTG, promotor Ptac, fusión a MBP N-terminal, resistencia a ampicilina.	New England Biolabs
pQE-9	Vector de expresión (3,4 Kb) inducible por IPTG, promotor T5/ operador lac, fusión a polihistidina N-terminal, resistencia a ampicilina.	Qiagen
pET-28a	Vector de expresión (5,4 kb) inducible por IPTG, promotor T7, fusión a polihistidina N-terminal, resistencia a kanamicina.	Novagen
P425-GPD	Vector no integrativo para expresión constitutiva en levaduras. Ori 2μ. Promotor GPD. Selección por reversión de auxotrofia a Leu.	(Mumberg y col., 1995)

Tabla 3.1: Características de los plásmidos empleados.

3.3.3. Cultivo de *Escherichia coli*.

Las células de *E. coli* TOP10 F' fueron utilizadas para mantenimiento y replicación de plásmidos. Las cepas *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta (DE3) y *E. coli* M15 se emplearon para la expresión de las proteínas recombinantes. Las células fueron cultivadas a 25-37 °C en medio LB, LB-Glc o TB, según el experimento realizado, con agitación a 180 rpm. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, se utilizó ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml o cloranfenicol 34 µg/ml, según el caso. Para almacenamiento a corto plazo, las bacterias transformadas se conservaron en placas con medio LB-agar a 4 °C por un mes. Para tiempos mayores, los cultivos líquidos saturados se suplementaron con glicerol al 25 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C. La composición de los medios de cultivo empleados se detalla a continuación:

- *Medio Lysogeny broth (LB):*

Peptona de carne	10 g/l
NaCl	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
pH	7,0

- *LB-Glucosa (LB-Glc):* medio LB adicionado con glucosa al 2% (p/v).

- *Medio Terrific Broth (TB):*

Peptona de carne	12 g/l
Extracto de levadura	24 g/l
Glicerol	4 ml/l
KH ₂ PO ₄	17 mM
K ₂ HPO ₄	72 mM
pH	7,0

- *LB-Agar:* medio LB más agar a una concentración final de 2% (p/v).

3.3.4. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* GY202 se creció en medio YPD o YPD-Agar. Las células transformadas con las diferentes construcciones del plásmido P425-GPD se crecieron en medio selectivo: YNB (*BD - Yeast Nitrogen Base without Amino*

Acids & Ammonium Sulfate – Catalog # 233520), suplementado con glucosa 2%, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 % y metionina 100 mM. Para su conservación, los cultivos líquidos crecidos por 48 h fueron adicionados con glicerol a una concentración final de 25% (v/v) y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Para almacenamiento a corto plazo, las levaduras transformadas se conservaron en placas con medio selectivo agarizado a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por un mes.

- *Medio YPD:*

Extracto de levadura	10 g/l
Peptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l

- *YPD-Agar:* medio YPD más agar a una concentración final de 2% (p/v).

- *Medio selectivo:*

YNB	1,7 g/l
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	5 g/l
Glucosa	20 g/l
Metionina	100 mM

3.4. Métodos utilizados en biología molecular.

Varios de los métodos de biología molecular empleados en este trabajo fueron realizados acorde a lo descrito por Maniatis y Sambrook (Maniatis y col., 1982; Sambrook y Russell, 2001).

3.4.1. Extracción de material genético.

- *ADN genómico de E. histolytica.*

El ADN genómico de la ameba se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Maniatis y col (Maniatis y col., 1982) a partir de trofozoítos crecidos en fase logarítmica, como se describe en 3.2.

- *ADN genómico de T. cruzi.*

El ADN genómico del parásito se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Maniatis y col (Maniatis y col., 1982) a partir de epimastigotes crecidos en fase logarítmica, como se describe en 3.2.

3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa.

Se realizó la amplificación de los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos que poseían diferentes sitios de restricción en sus extremos 5'. Se emplearon los siguientes reactivos: *Taq* ADN polimerasa 2,5 U (Thermo Scientific), $MgCl_2$ 3 mM (Thermo Scientific), PCR *buffer* 1X (Thermo Scientific), dNTP 0,4 mM de cada uno (Promega), cebadores 0,1 μ M de cada uno, ADN genómico o ADN plasmídico (según sea el caso) y agua estéril, para completar un volumen de reacción de 20-50 μ l finales.

El programa base utilizado en las PCRs fue:

- 1- 95 °C durante 10 min
- 2- 95 °C durante 1 min
- 3- T_m durante 1 min
- 4- 72 °C durante 1 min
- 5- 72 °C durante 10 min

Los pasos 2-4 se repitieron durante 30 ciclos. Las reacciones fueron realizadas en *BOECO thermal cyclers Biocycler TC-S*.

3.4.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos desalados y liofilizados utilizados en este estudio fueron sintetizados por GBT o Sigma. En la Tabla 3.2 se detallan las secuencias de los mismos.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción	T _m (°C)
ehnr-or-fow	<u>GGATCC</u> CATGAATATAAATGTACAATA	BamHI	58.6
ehnr-or-rev	AAGCTTTTAAAAATATGTTTTCCATT	HindIII	60.0
141deltaehnr-or-fow	<u>GGATCC</u> CAGTAATCTTGAGGTAGTTAT	BamHI	68.8
141deltaehnr-or-rev	AAGCTTTTAAAAATATGTTTTCCATT	HindIII	60.0
ehrr-fow	<u>GGATTC</u> CATGGCAACTCTCATTAATCT	BamHI	67.7
ehrr-rev	AAGCTTTTAAATAGAACTTGAAGTC	HindIII	58.3
ehfdp1-fow	<u>GGATCC</u> CATGAAAGCATTGGAAGTAGT	BamHI	57.1
ehfdp1-rev	<u>CTGCAGT</u> TAAAGCTTTAAGGGCCTCAG	PstI	59.6
ehfd1-fow	<u>GGATCC</u> CATGGGAAAGATCACTATTGT	BamHI	56.6
ehfd1-rev	AAGCTTTTATTCAACTTTAAGAACTC	HindIII	50.5
ehfd2-fow	<u>GGATCC</u> CATGTCAAAAGTATTACAAG	BamHI	52.4
ehfd2-rev	AAGCTTTTATAGATGTCATCAACTGTAA	HindIII	52.9
tcfrmsr-fow	<u>GGATCC</u> CATGCACGCTGACAACAGTTC	BamHI	60.9
tcfrmsr-rev	AAGCTTTCAATGGACGCCAATCGTCG	HindIII	62.1
gaf-rev	AAGCTTTCAAGGGAACTCAAGATTTT	HindIII	55.8
tip41-fow	<u>GGATCC</u> CATGGCTTGCACTTTGGCGAG	BamHI	63.4

Tabla 3.2: Secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores. Subrayados se muestran los sitios de restricción especificados.

3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.

El análisis de fragmentos de ADN obtenidos se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis utilizando geles de agarosa al 1 - 1,5% (p/v) en solución TAE (Tris 40 mM; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), con la adición de gel *Green Biotium®* a una concentración final de 0,3 µg/ml. Cada muestra se sembró en el gel adicionando previamente *buffer* de siembra de ADN [azul de bromofenol 0,25% (p/v); Glicerol 30% (v/v)] o glicerol al 30% para facilitar el proceso. Los geles se corrieron en *buffer* TAE a 100 V utilizando el sistema *Mini-Sub Cell GT* (Bio-Rad). La visualización de cada fragmento de ADN retenido en el gel se realizó bajo luz azul pura (310 nm) con ayuda de un transiluminador DR- 46B (*Clare Chemical Research Dark Reader*). En todos los casos, las muestras se corrieron junto con un marcador de peso molecular de referencia.

3.4.5. Purificación de ADN desde geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de las reacciones de PCR o de las digestiones enzimáticas se corrieron en geles de agarosa al 1 - 1,5%, como se explicó en el inciso anterior. Una vez identificado cada segmento de interés, se recortó la porción del gel que lo contenía con bisturí, y se purificó con el sistema comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.6. *Precipitación de ADN.*

Para precipitar el ADN se agregó a las soluciones que lo contenían 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4,8). Las muestras se incubaron a -20 °C durante 30 min y se centrifugaron a 15000 rpm., a 4 °C durante 15 min. A continuación se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado se resuspendió en agua mQ estéril.

3.4.7. *Minipreparación de ADN plasmídico.*

Cada clon de *E. coli* que portaba el plásmido de interés se cultivó por 16 h en 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, a 37 °C y con agitación de 180 rpm. Luego se cosecharon las células obtenidas a 5000 rpm durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente se realizó la extracción del ADN plasmídico con el *kit* comercial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se almacenaron a -20 °C.

3.4.8. *Digestión enzimática de ADN.*

Las reacciones de digestión del ADN se realizaron a 37 °C, durante 3 h y en un volumen final de 40 µl utilizando enzimas de restricción Promega o Thermo Scientific, según las indicaciones del fabricante. Los productos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se identificaron por comparación con un marcador de peso molecular de referencia y se purificaron a partir del gel como se explicó anteriormente.

3.4.9. *Ligación de fragmentos de ADN.*

Para realizar las reacciones de ligación se mezclaron volúmenes de inserto y vector en una relación molar de 3 a 1 respectivamente. Cada mezcla se incubó a 60 °C durante 5 min, luego en hielo y posteriormente se agregó el *buffer* de reacción correspondiente y 1 U de la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific), logrando un volumen final de reacción de 15 µl. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 16 h. Para los controles de vector religado se realizó el mismo procedimiento reemplazando el volumen de inserto con agua mQ estéril.

3.4.10. Secuenciación de ADN.

La secuenciación nucleotídica automática del ADN fue llevada a cabo por la empresa Macrogen (Corea del Sur).

3.4.11. Transformación de *E. coli* por el método de CaCl_2 .

Las células de *E. coli* Top 10 F' o *E. coli* BL21 (DE3), dependiendo el caso, se hicieron crecer en medio LB, a 37 °C y con agitación de 180 rpm durante toda la noche. Una vez conseguido un cultivo saturado, se realizó una dilución 1/100 del mismo en medio LB fresco y se incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0,5 - 0,6$ característica de la fase de crecimiento logarítmica. De este cultivo se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos de 1,5 ml y se cosecharon a 5000 rpm durante 5 min. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 500 μl de solución ST1 (MOPS 100 mM; KCl 10 mM; pH 7,0). El paso de centrifugación y resuspensión se repitió utilizando la solución ST2 (MOPS 100 mM; KCl 10 mM; CaCl_2 50 mM; pH 6,5) y luego se incubaron las muestras en hielo por un período de 15 min. Transcurrido ese tiempo, nuevamente se cosecharon las células, se resuspendieron en 100 μl de ST2 y se agregó 6,5 μl de cada mezcla de ligación. Las muestras se incubaron en hielo por 60 min, seguidamente se realizó el shock térmico a 42 °C durante 40 s y nuevamente se incubaron 2 min en hielo. Inmediatamente se adicionó 1 ml de medio LB – Glucosa en cada tubo y se incubó 60 min a 37 °C. Finalmente las células se cosecharon a 4500 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 100 μl de medio LB y se distribuyeron en placas de Petri conteniendo LB - Agar más el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C hasta la visualización de colonias.

3.4.12. Transformación de *S. cerevisiae* por el método del acetato de litio.

Se centrifugaron 50 ml de un cultivo de levaduras en fase exponencial ($\text{OD}_{600} = 1$), crecido en medio YPD. Las células se resuspendieron en 10 ml de agua estéril y se centrifugaron nuevamente. En el paso siguiente las levaduras se resuspendieron en 5 ml de SOL1 y se centrifugaron. Luego de descartar el sobrenadante, se volvió a resuspender las levaduras en 250 μl de SOL1. Para cada transformación se alicuotaron 50 μl de células en microtubos de 1,5 ml, se agregó el plásmido y luego 300 μl de SOL2. Los tubos se incubaron a 30 °C por 30 min y luego 15 min a 42 °C. Finalmente el contenido de cada tubo se distribuyó en placas de Petri conteniendo el

medio selectivo indicado. El método empleado se baso en el protocolo de Gietz y col. (Gietz y col., 1992).

- **SOL1:**

44,4 ml de agua estéril

5 ml de 1 M LiOAc estéril, pH 7 – 7,4

0,5 ml de 1 M Tris-HCL, pH 7,5

0,1 ml de 500 mM EDTA

- **SOL2:**

40 ml de 50 % PEG 4000 estéril

5 ml de 1 M LiOAc estéril, pH 7 – 7,4

0,5 ml de 1 M Tris-HCL, pH 7,5

0,1 ml de 500 mM EDTA

4,4 ml de agua estéril

3.4.13. Ensayos de complementación en levaduras.

Se utilizaron células de *S. cerevisiae* GY202 transformadas con distintas construcciones del plásmido p425-GPD. Para evidenciar el proceso de complementación, se realizaron estrías de cada clon obtenido en una placa de Petri conteniendo medio selectivo, pero en donde la metionina fue reemplazada por Met-R,S-SO 200 μ M o Met-S-SO 100 μ M. Las placas se cultivaron a 30 °C hasta visualización de crecimiento.

3.5. Métodos bioquímicos.

3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para corroborar la eficiencia de la expresión y la purificación de las proteínas recombinantes, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La misma se realizó utilizando como soporte geles discontinuos de poliacrilamida al 10-15% y el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Las muestras fueron desnaturizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de muestra [SDS 1% (p/v); 2-mercaptoetanol 100 mM; Tris 50 mM; glicerol 10% (v/v); azul de

bromofenol 1,25% (p/v); pH 6,8] y posteriormente se incubaron a 95 °C durante 5 min. Terminada la corrida, se visualizaron las proteínas en el gel por tinción con Coomassie brilliant blueR-250.

3.5.2. Preparación de antisueros.

Los sueros inmunes contra las proteínas de interés fueron preparados por el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina), mediante la inmunización de conejos con proteínas purificadas acorde a lo descrito por Vaitukaitis y col. (Vaitukaitis y col., 1971).

3.5.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección.

Tras realizar un SDS-PAGE, se efectuó la electrotransferencia de las proteínas contenidas en el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (*GE Healthcare*). Ésta se llevó a cabo durante 30 min aplicando 5 mA por cada cm de gel, en un equipo *Semi-Dry Fastblot B43* (Biometra) que contenía el gel y la membrana entre papeles de filtro embebidos previamente en solución de transferencia [Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% (v/v); pH 8,3]. La membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con solución de TBS (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; pH 8,0) más leche descremada al 4% (p/v), incubándose durante 60 min a temperatura ambiente. Luego se realizó la incubación por 60 min con los anticuerpos primarios hechos contra las proteínas de interés en conejo o ratón, según el caso, a una dilución adecuada. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* o anti-*mouse* conjugado a peroxidasa en una dilución final de 1/10000 durante 60 min. Entre cada incubación se realizaron lavados con solución de TBS más Tween 20 0,05% (p/v). Las diluciones de los anticuerpos se llevaron a cabo con solución de TBS más leche descremada al 1% (p/v). La reacción de revelado se llevó a cabo mediante el método quimioluminiscente utilizando el sustrato comercial: *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5.4. Cuantificación de proteínas totales.

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis Boeco Germany S-26. Se utilizó una curva de calibrado

construida a partir de patrones de BSA (Sigma) para referir cada resultado de absorbancia obtenido a una concentración proteica dada.

En el caso de extractos proteicos obtenidos en presencia de detergente, la cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido bicinconínico, utilizando el kit comercial *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), según las indicaciones del fabricante.

3.5.5. Desalado y cambio de buffer.

Los *buffers* de las soluciones proteicas fueron cambiados mediante filtración por geles empleando una *HiTrap™ Desalting Column* (GE), siguiendo indicaciones del fabricante.

3.5.6. Concentrado de proteínas.

Para la concentración de soluciones proteicas, se emplearon dispositivos de ultrafiltración Amicon (Millipore), con un tamaño de poro apropiado para cada proteína a concentrar. El dispositivo se operó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

3.5.7. Preparación de S-nitrosotioles.

Los S-nitrosotioles se prepararon según el método descrito por Gordge y col. (Gordge y col., 1998). Brevemente, la cisteína 200 mM y NaNO₂ 200 mM se incubaron en presencia de HCl 10 mM por 30 min en hielo. La solución fue luego estabilizada por la adición de EDTA 1 mM pH 7. El compuesto se preparó el mismo día a ser empleado, fue almacenado en hielo y a resguardo de la luz hasta su utilización. La concentración de CysNO se estimó mediante su coeficiente de extinción molar a 334 nm (0,74 mM⁻¹·cm⁻¹), en un espectrofotómetro UV-Vis METROLAB 325 BD.

3.5.8. Permeabilización de células de T. cruzi con digitonina.

Se partió de 5x10⁸ células de epimastigotes. Las células se lavaron con una solución que contenía Tris 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 2% (p/v), pH 7.5 y se centrifugaron. Se prepararon soluciones de digitonina a diferentes concentraciones (de 0,01 a 4 mg/ml). En cada paso de extracción se adicionó una dilución de digitonina sobre el pellet celular (100 µl por cada 1x10⁷ células), seguido de una incubación a 30 °C durante 5 min y centrifugación a 13000 rpm a 4 °C durante 30 min. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con *buffer* de muestra de SDS-PAGE,

se hirvieron durante 5 min. Finalmente, las muestras obtenidas se analizaron por *western blot*.

3.5.9. Purificación de anticuerpos.

Los antígenos recombinantes purificados, utilizados para inmunizar los conejos, se sembraron en un SDS-PAGE de un solo carril y se realizó la electroforesis. Posteriormente, el gel fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa y la misma se tiñó con Rojo Ponceau. Se recortó la banda correspondiente a la proteína de interés, se decoloró la tira obtenida y se bloqueó con PBS-Leche 5%. En el siguiente paso, la tira fue sometida a una incubación con el antisuero total diluido 1/10 en PBS-Leche 1% durante 16 horas. Luego de la incubación, la membrana fue lavada extensamente con PBS. Finalmente, los anticuerpos retenidos se eluyeron con 100 mM glicina pH 2.5 durante diez minutos. Se transfirió la solución de anticuerpos a un nuevo tubo conteniendo 10 μ l de 1M Tris pH 8.0 por cada 90 μ l de solución de elución. La solución neutralizada fue concentrada por ultrafiltración y se le adicionó una concentración final de 40 % glicerol (v/v). Los anticuerpos se conservaron alicuotados a -20 °C.

3.5.10. Obtención y purificación de los isómeros R y S de la Met-SO.

La obtención de Met-SO se realizó mediante oxidación de L-metionina, adaptando la escala y tiempos del protocolo descrito por Toennies y col (Toennies y Kolb, 1939). Se disolvieron 3,33 mmoles de L-metionina en una solución de 3,66 mmoles de HCL concentrado, 2,5 ml de H₂O y 4,16 ml de metanol. Luego se agregaron 4 mmoles de H₂O₂ en su forma de solución al 30 %. De ser necesario se agregó agua para completar un volumen de aproximadamente 8,33 ml. La reacción se dejó proceder por 3 horas. En el siguiente paso, se agregaron 3,83 mmoles de amilamina y metanol (en un volumen igual a la mitad de la mezcla de reacción). Finalmente, para precipitar el sulfóxido, se adicionaron 3 volúmenes de acetona. Luego de reposar 10 min, se separó el precipitado. A modo de lavado, se realizaron 6 resuspensiones en 8,33 ml de acetona. La sustancia blanca resultante se dejó secar al aire toda la noche y para completar el proceso se calentó a 100 °C por una hora.

La separación de los isómeros de Met-SO se realizó siguiendo el método de Lavine (Lavine, 1947; Kumar y col., 2002). Sucintamente, 0,3 g de L-Met-R,S-SO se disolvieron en 2 ml de agua en un baño María. Se agregó una solución de ácido pícrico en metanol (0,5 g (peso húmedo)/ 4 ml); y se dejó enfriar lentamente. El precipitado se separó por centrifugación (se conservó el sobrenadante), se lavó con

metanol frío y se redisolvió en 20 ml de agua. Para liberar el sulfóxido se agregó amilamina ($\approx 80 \mu\text{l}$) hasta alcanzar aproximadamente pH 8. La Met-S-SO se precipitó con 200 ml de acetona y se colectó por centrifugación. El precipitado se lavó dos veces con acetona y finalmente fue secado. El sobrenadante original que se había conservado, se evaporó y se redisolvió en 20 ml de agua. Luego se agregaron $80 \mu\text{l}$ de amilamina, se precipitó la Met-R-SO con 200 ml de acetona y se colectó por centrifugación. El precipitado se lavó dos veces con acetona y finalmente fue secado.

3.5.11. Ensayos de fosforilación.

Se emplearon $2 \mu\text{g}$ totales de extracto celular y $2 \mu\text{g}$ de cada proteína recombinante. El volumen final de la reacción fue de $20 \mu\text{l}$ conteniendo las siguientes concentraciones finales: 50 mM Hepes (pH 7,2), 10 mM MgCl_2 y $100 \mu\text{M}$ [γ - ^{32}P]ATP (actividad específica $\approx 6000 \text{ cpm/pmol}$). Las reacciones fueron incubadas por 20 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y terminadas hirviéndolas con buffer de SDS-PAGE 4X. Se realizó la corrida electroforética y la autoradiografía del gel se implementó utilizando una placa *storage phosphor* y un escáner Typhoon.

3.6. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

3.6.1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes.

Las distintas cepas de expresión de *E. coli*, transformadas con las construcciones de interés, se hicieron crecer en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. El cultivo prosiguió toda una noche a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y con agitación a 180 rpm. Posteriormente se realizó una dilución 1/100 del cultivo saturado en medio fresco, conteniendo los antibióticos correspondientes (y suplementos accesorios, de ser el caso). El cultivo se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación a 180 rpm hasta alcanzar una DO de 0,6 - 1,2. En esas condiciones se realizó la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes con el agregado de IPTG 0,1 – 0,5 mM y se volvió a incubar durante 16 horas, a $20\text{-}28 \text{ }^\circ\text{C}$ y con agitación a 180 rpm. Los parámetros para cada proteína recombinante en particular se indican en la sección de resultados. Finalmente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se guardaron los paquetes celulares a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior uso.

3.6.2. *Disrupción celular y preparación de extractos crudos.*

Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 1/10 del volumen del cultivo original usando una solución compatible con el proceso de purificación. La ruptura celular fue llevada a cabo, en baño de hielo, usando un procesador ultrasónico de alta intensidad *Vibra-cell TM VCX-600* (Sonics & Materials Inc.) con pulsos de 30 s durante una sesión de 10 min. Con el fin de separar las fracciones solubles e insolubles, los lisados celulares se centrifugaron a 4 °C y 15000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la purificación de las proteínas de interés.

3.6.3. *Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.*

Para purificar proteínas recombinantes fusionadas a etiquetas de poli-Histidina, se realizó una cromatografía de afinidad utilizando una columna *HiTrap chelating* (GE Healthcare) de 1 ml cargada con Ni²⁺ y equilibrada con solución A (Tris 20 mM; NaCl 400 mM; Imidazol 10 mM; pH 7,5). Las células fueron resuspendidas y lisadas en la solución A. Luego de la siembra, la columna se lavó con 15 ml de la solución A. La elución se realizó mediante un gradiente lineal de 10 a 300 mM de Imidazol (solución B: Tris 20 mM; NaCl 400 mM; Imidazol 300 mM; pH 7,5), recolectando fracciones de 2 ml. El proceso de purificación se ejecutó de forma automática utilizando un dispositivo *ÄKTAprime plus* (GE). Las fracciones que contenían la proteína de interés se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a -80 °C en presencia de glicerol al 15% (v/v).

3.6.4. *Cromatografía de afinidad por unión a amilosa.*

Para purificar proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP), se realizó una cromatografía de afinidad empleando una matriz de amilosa-agarosa (New England Biolabs) de 1 ml, equilibrada con solución A (Tris 20 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0). El paquete celular fue resuspendido y lisado en la solución A y se sembró en la columna. A continuación se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna empleando solución A. La elución de la proteína recombinante se realizó mediante el agregado de solución B (Tris 20 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0 y maltosa 10 mM). Las fracciones que contenían la proteína de interés se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a -80 °C en presencia de glicerol al 15% (v/v).

3.6.5. Proteínas accesorias utilizadas.

Para la realización de los distintos ensayos y medidas de actividad, se utilizaron varias proteínas que se encontraban purificadas previamente en el laboratorio o que fueron cedidas por otros grupos. En algunos casos se contó con el plásmido de expresión por lo que la purificación se realizó durante este trabajo. La tabla 3.3 lista las proteínas accesorias empleadas y su origen.

<i>Proteínas</i>	<i>Condición</i>	<i>Cedida por</i>
TmNROR	Plásmido	Dr. Donald Kurtz (University of Texas at San Antonio -USA)
PfRd	Plásmido	Dr. Michael Adams (University of Georgia - USA)
CpRd	Plásmido	Dr. Jean-Marc Moulis (Université J. Fourier - Francia)
PsFNR	Purificada	Dr. Ceccarelli (from IBR – Rosario – Argentina)
PsFd	Purificada	Dr. Ceccarelli (from IBR – Rosario – Argentina)
EcFld	Purificada	Dr. Ceccarelli (from IBR – Rosario – Argentina)
EhTrx8	Purificada	Obtenida previamente
EhTrx41	Purificada	Obtenida previamente
TcTR	Purificada	Obtenida previamente
TcTXNI	Purificada	Obtenida previamente

Tabla 3.3: Proteínas accesorias utilizadas en el trabajo

3.7. Métodos analíticos.

3.7.1. Determinación de la masa molecular.

La masa molecular nativa de las proteínas recombinantes se determinó mediante cromatografía de filtración por geles, empleando una columna Superdex 200 HR Tricorn (GE) conectada a un equipo *ÅKTA Explorer* (GE). Para efectuar la calibración de la columna se emplearon proteínas de masa molecular conocida (*Gel Filtration Calibration Kit* – GE). La curva de calibrado se construyó graficando el logaritmo de las masas moleculares de los estándares (log MM) versus los coeficientes de distribución obtenidos (K_{av}).

3.7.2. Determinación de flavinas.

Las enzimas purificadas se calentaron a 95 °C durante 10 min para liberar sus cofactores. Luego de centrifugar, se separó el sobrenadante de las proteínas desnaturalizadas. Una alícuota del sobrenadante se sembró y resolvió mediante cromatografía en capa delgada (TLC) empleando placas de silica soportadas sobre aluminio (Merck). El solvente de corrida consistió de butanol/acido acético/ agua en una relación 12:3:5. Se utilizaron soluciones de FAD y FMN como estándares. Los

spots fueron visualizados haciendo uso de su fluorescencia intrínseca, mediante un dispositivo *Typhoon scanner* (GE Healthcare).

Determinada la naturaleza del cofactor, su concentración fue cuantificada espectrofotométricamente a 450 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar $11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (García y col., 2011).

3.7.3. Determinación de hierro.

El hierro se cuantificó siguiendo el método del ferritocianato (Chauhan y Mande, 2001). Sucintamente, una muestra de la proteína recombinante (25 μl) fue adicionada con TCA 40% (5 μl) e incubada a 4 °C por diez minutos. Luego, la mezcla se centrifugó a 16000 rpm, a 4 °C y durante 15 min. Se mezclaron (en este orden) 10 μl del sobrenadante con 80 μl de TCA 4% y posteriormente con 10 μl de KSCN 2,5 M. La absorbancia del producto de reacción se midió a 492 nm. Para determinar la concentración de hierro se empleó una curva de calibrado generada utilizando FeCl_3 como estándar.

3.7.4. Ensayos enzimáticos.

Los ensayos se realizaron a 30 °C, en un volumen final de 50 μl , empleando el equipo *Multiskan Ascent one-channel vertical light path filter photometer* (Thermo Electron Co.). Se definió la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima capaz catalizar la conversión de 1 μmol de sustrato por min, bajo las condiciones especificadas en cada caso.

Las curvas de saturación se efectuaron utilizando concentraciones variables del sustrato en estudio (entre 7 y 13 puntos) y una concentración saturante fija del cosustrato. Los datos cinéticos fueron graficados como la velocidad inicial ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ o $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) versus la concentración del sustrato (μM o mM). Los parámetros cinéticos se calcularon mediante regresión no lineal según el modelo de Michaelis – Menten, utilizando el programa Origin™ 7.0. Los parámetros cinéticos reportados representan el promedio de un mínimo de tres determinaciones independientes, reproducibles dentro de un rango de $\pm 10\%$. En el estudio de inhibidores, el parámetro IC_{50} refiere a la concentración de inhibidor que disminuye la actividad inicial al 50%.

A menos que se indique lo contrario, en los ensayos en donde se siguió la oxidación/reducción de NADPH/NADP⁺, se empleó su coeficiente de extinción molar ($6,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para la realización de los respectivos cálculos.

3.7.2.1. Determinación de la actividad Rd reductasa de la EhNROR.

La actividad rubredoxina reductasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la reducción de rubredoxinas a 492 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, 0,1–100 μ M de Rd de *Pyrococcus furiosus* (*PfRd*) o *Clostridium pasteurianum* (*CpRd*) y 0,005–0,1 μ M de *EhNROR*.

3.7.2.2. Determinación de la actividad TRX reductasa de la EhNROR.

La actividad tiorredoxina reductasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, Insulina bovina 0,13 mM, 0,15–30 μ M *EhTrxs* y 0,1–1 μ M de *EhNROR*.

3.7.2.3. Determinación de la actividad DTNB reductasa de la EhNROR.

La actividad DTNB reductasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la producción de tionitrobenzoato a 405 nm ($\epsilon = 14.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Eyer y col., 2003). Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, DTNB 0,078–10 mM y 0,1–1 μ M de *EhNROR*.

3.7.2.4. Determinación de la actividad cistina o CysNO reductasa de la EhNROR.

La actividad cistina o CysNO reductasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, 0,1–1 μ M de *EhNROR* y 15–1000 μ M de cistina o CysNO.

3.7.2.5. Determinación de la actividad diaforasa de la EhNROR.

La actividad diaforasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT

20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, 0,1–1 μM de *EhNROR* y como aceptores finales MBQ 2–500 μM , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 15–1000 μM o MB 15–1000 μM .

*3.7.2.6. Determinación de la actividad NaNO_2 o NH_2OH reductasa de la *EhNROR*.*

La actividad nitrito o hidroxilamina reductasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, 0,1–1 μM de *EhNROR* y 15–1000 μM de NaNO_2 o 15–1000 μM de NH_2OH .

*3.7.2.7. Reducción de flavinas libres por la *EhNROR*.*

La actividad de la *EhNROR* se midió en condiciones microaerófilas monitoreando la reducción de FAD o de FMN a 450 nm ($\epsilon = 11.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Aliverti y col., 1999). Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, 0,1–1 μM de *EhNROR* y 3–200 μM de FAD o 3–200 μM de FMN.

*3.7.2.8. Determinación de la actividad nitroreductasa de la *EhNROR*.*

La actividad nitroreductasa reductasa de la *EhNROR* se determinó en condiciones microaerófilas monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml, NAD(P)H 0,3 mM, 0,1–1 μM de *EhNROR* y 10–1000 μM de CDNB o 10–1000 μM de MV.

*3.7.2.9. Determinación de la actividad NAD(P)H oxidasa de la *EhNROR*.*

La actividad oxidasa se determinó monitoreando la oxidación de NAD(P)H a 340 nm. Se empleó una solución oxigenada ($\text{O}_2 \sim 200 \mu\text{M}$) conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), 0,1–1 μM de *EhNROR* y 10–300 μM de NAD(P)H. Se determinó la producción de H_2O_2 mediante el método del ferritocianato (Chauhan y Mande, 2001). La presencia de O^{2-} se evidenció monitoreando la reducción de NBT por acción de dicho radical (Giannopolitis y Ries, 1977).

3.7.2.10. Reducción de la rubreritina (*EhRr*).

La reducción de la *EhRr* se evaluó mediante la medida de su actividad peroxidasa (en condiciones microaerófilas), utilizando diferentes proteínas como sustratos donadores de electrones. El ensayo se realizó monitoreando la oxidación del NAD(P)H a 340 nm. Se empleó una solución desgaseada conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, SOD 10 U/ml, 0,1–10 μ M de *EhRr*, 25 μ M H₂O₂ y diferentes sustratos donantes (con sus respectivos sistemas enzimáticos): 1) NADPH 0,3 mM, *PsFNR* 1 μ M y 0,1-10 μ M *EcFid*, *PsFd*, *EhFd1* o *EhFd2*. 2) NADH 0,3 mM, *TmNROR* 1 μ M y 0,1-10 μ M *PfRd*. 3) NAD(P)H 0,3 mM y 0,1-1 μ M *EhNROR*.

3.7.2.11. Reducción de la proteína flavodiférrica 1 (*EhFDP1*).

La reducción de la *EhFDP1* se evaluó mediante la medida de su actividad O₂ reductasa o NO[•] reductasa, utilizando diferentes proteínas como sustratos donadores de electrones. Los ensayos se realizaron monitoreando la oxidación del NAD(P)H a 340 nm en condiciones aerobias (actividad O₂ reductasa) o microaerófilas (actividad NO[•] reductasa). Se empleó una solución conteniendo: PBS 100 mM (pH 7), 0,05-5 μ M de *EhFDP1* y diferentes sustratos donantes (con sus respectivos sistemas enzimáticos): 1) NADPH 0,3 mM, *PsFNR* 1 μ M y 0,1-10 μ M *EcFid*, *PsFd*, *EhFd1* o *EhFd2*. 2) NADH 0,3 mM, *TmNROR* 1 μ M y 0,1-10 μ M *PfRd*. 3) NAD(P)H 0,3 mM y 0,1-1 μ M *EhNROR*. En los ensayos realizados bajo condiciones microaerófilas se agregó al medio de reacción: Glc 2 mM, GOD 10 U/ml, CAT 20 U/ml, SOD 10 U/ml y MAHMA NONOato 1mM (empleado como generador NO[•] de para la actividad NO[•] reductasa de la *EhFDP1*)

3.7.2.12. Determinación de la actividad Met-SO reductasa.

La actividad metionina sulfóxido reductasa de la *TcfRMsR* fue medida por seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm, mediante el sistema *TcTR*/T(SH)₂ /*TcTXNI*. La mezcla de reacción contenía Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *TcTR* 2 μ M; T(SH)₂ 100 μ M; *TcTXNI* 10 μ M y concentraciones variables de la *TcfRMsR*. Las reacciones se iniciaron por adición de Met-R-SO a una concentración final de 5 mM. El ensayo se realizó a 30 °C, en un volumen final de 50 μ l.

En forma paralela, se comprobó la naturaleza de los productos de reacción por TLC. Se evaluó la capacidad de reducción de Met-SO y sus isómeros individuales por acción de la *TcMsrA* y de la *TcfRMsR*. Las diferentes reacciones se iniciaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo las siguientes concentraciones: 50 mM PBS (pH

7,5), 10 mM DTT, 1 mM Met-(R,S)-SO y 5 μg de las proteínas recombinantes. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 h. Finalmente se sembraron 6 μl (3 x 2 μl) de cada reacción en una placa de TLC (silica soportada en aluminio, Merck). El solvente de corrida fue butanol/acido acético/agua (60/15/25). La placa se reveló mediante espray de ninhidrina (Kim y Gladyshev, 2004).

3.7.5. Determinación del potencial de reducción estándar.

Las titulaciones redox se realizaron incubando las proteínas en estudio (1-2 μM) por 3 h a 33 °C en un medio que consistía de TRIS-HCl 200 mM pH 7,5; EDTA 2 mM; HEDS 0,5 mM y concentraciones variables de 2 β ME. De esta forma se obtuvieron diferentes potenciales de semi-celda (E_h). Finalizadas las incubaciones, se analizó cada una de las muestras en SDS-PAGE no reductor. Empleando el programa *LabImage 2.7.2 Free edition* (Kapelan GMBH), se determinó la abundancia de la fracción reducida en cada una de las bandas proteicas. Las curvas de titulación se graficaron como la fracción reducida versus el E_h . El potencial de reducción estándar a pH 7,5 ($E_{h7,5}$) se determinó mediante regresión no lineal, empleando el modelo logístico del programa Origin™ 7.0.

3.7.6. Espectroscopia UV-visible.

Los espectros UV-visibles de las proteínas fueron determinados en un espectrofotómetro Boeco Germany S-26 a 25 °C. La línea de referencia fue realizada con el *buffer* donde se encontraba disuelta la enzima.

3.8. Microscopía confocal.

Los trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS se cosecharon por centrifugación a 500 g. El paquete celular se lavó dos veces con 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 con los anticuerpos primarios contra las proteínas de interés, en una dilución de 1/100 en PBS, Triton X-100 0,01% (v/v) y BSA 1% (p/v). En segunda instancia, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo (marcado con FITC) y anti-ratón (marcado con TRITC), en una dilución final de 1/1000. Finalmente, luego de varios lavados, las muestras se montaron con una

solución *antifade* conteniendo DAPI. La visualización de distintas secciones z de las células se realizó empleando un microscopio confocal *Eclipse TE-2000-E2 - Nikon*.

3.9. Modelado por homología.

Los alineamientos de secuencias se realizaron mediante el algoritmo ClustalX y se editaron de forma manual teniendo en cuenta información espacial complementaria de otras estructuras conocidas, pero que no se utilizaron como molde. Se evitó agregar *gaps* o deleciones en zonas con estructuras secundarias definidas y se hizo hincapié en la conservación espacial de residuos implicados en la iniciación, o finalización, de hélices alfa.

Las estructuras tridimensionales fueron generadas utilizando modelado por homología mediante el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) en su formato semiautomático: *Target-Template Alignment*. El modelo obtenido fue sometido a un proceso de minimización de energía en el programa Swiss-PdbViewer, utilizando 500 iteraciones del algoritmo *Steepest descent* y 1000 del *Conjugate gradient*. El proceso se repitió dos veces. La calidad del modelo final fue evaluada por el programa Verify-3D y Procheck. Ambos programas evaluadores forman parte del paquete integrado SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES>). El modelo obtenido fue visualizado para su análisis utilizando PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CAPÍTULO 1: Entamoeba histolytica

4.1.1. Análisis de la secuencia primaria de la EhNROR.

La información presente en la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/>) indica que el gen *ehnror* (EHI_153000) tiene 1344 pb y codifica para una proteína (*EhNROR*) de 447 aminoácidos, con un masa molecular calculada de 49,7 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 8,2. En el proyecto genoma original, el ORF se encontraba anotado como una NADH oxidasa hipotética.

El análisis de la secuencia primaria de la *EhNROR*, utilizando la herramienta de identificación de dominios conservados Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), indicó su pertenencia a la familia de las Piridín Nucleótido Reductasas Dependientes de FAD (FADPNR – pfam: PF07992). Esta familia de proteínas incluye varias enzimas estructuralmente relacionadas, tales como glutatión reductasas, tioredoxina reductasas, rubredoxina reductasas, ferredoxina reductasas, nitrito reductasas, NADH oxidasas, etc (Hagelueken y col., 2007). En la secuencia aminoacídica de la *EhNROR* se pudo reconocer el motivo de unión a FAD (⁴⁹EVVIIGGGIASLSVIRCLI⁶⁷) y el dominio de unión a NAD(P)H (¹⁹⁷QIAIIGAGLSGIEISNALR²¹⁵) (figura 4.1.1).

Utilizando el algoritmo de búsqueda *blastp* se identificaron proteínas homólogas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los puntajes máximos de identidad, excluyendo a los ortólogos de otras especies de *Entamoeba*, rondaron el 30% y estuvieron distribuidos principalmente entre proteínas pertenecientes a distintas especies del género *Clostridium*. Como era de esperar, las anotaciones indicaron enzimas incluidas en la familia de las FADPNR, siendo rubredoxina reductasa la asignación específica más representada. El homólogo bacteriano más cercano fue una proteína putativa de *Clostridium tetani* que poseía el nombre genérico de NADH deshidrogenasa (NCBI: NP_783044). Fue interesante observar que el análisis de dominios de esta proteína detectó el plegamiento FADPNR esperado, así como también la existencia de un dominio tipo-rubredoxina hacia el extremo N-terminal (prosite: PS50903) (figura 4.4.1). Este plegamiento se caracteriza por tener un motivo CXXC(X)₁₂CPXC y es exactamente igual al que se encuentra en las rubreritinas de *Clostridium perfringens* (Lehmann y col., 1996) o *Desulfovibrio vulgaris* (Prickril y col., 1991). En las rubredoxinas libres, la separación entre los pares de cisteínas es mayor (28 o 29 aminoácidos en lugar de 12). Igual a lo que sucede en

las rubredoxinas, los residuos de cisteína de los dominios tipo-rubredoxinas de las rubreritinas son los encargados de unir un átomo de hierro. El análisis manual de la secuencia de la *EhNROR* nos permitió observar la presencia de dos posibles pares de cisteínas quelantes, aunque la distancia de separación entre los mismos es de solo 9 aminoácidos. Otra diferencia existente es la ausencia del residuo conservado de prolina entre el segundo par de cisteínas y la aparición de un residuo extra de cisteína (figura 4.1.1). Es posible que estas diferencias sean las responsables de que el *software* de detección de dominios sea incapaz de predecir un plegamiento tipo-rubredoxina en la porción N-terminal de la *EhNROR*.

Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la *EhNROR* con diversas rubredoxinas reductasas (caracterizadas bioquímicamente) mostró una acotada identidad de secuencia (menor al 23%). También quedó en evidencia que el posible dominio tipo-rubredoxina (N-terminal) no se encuentra presente en estas últimas (figura 4.1.1).



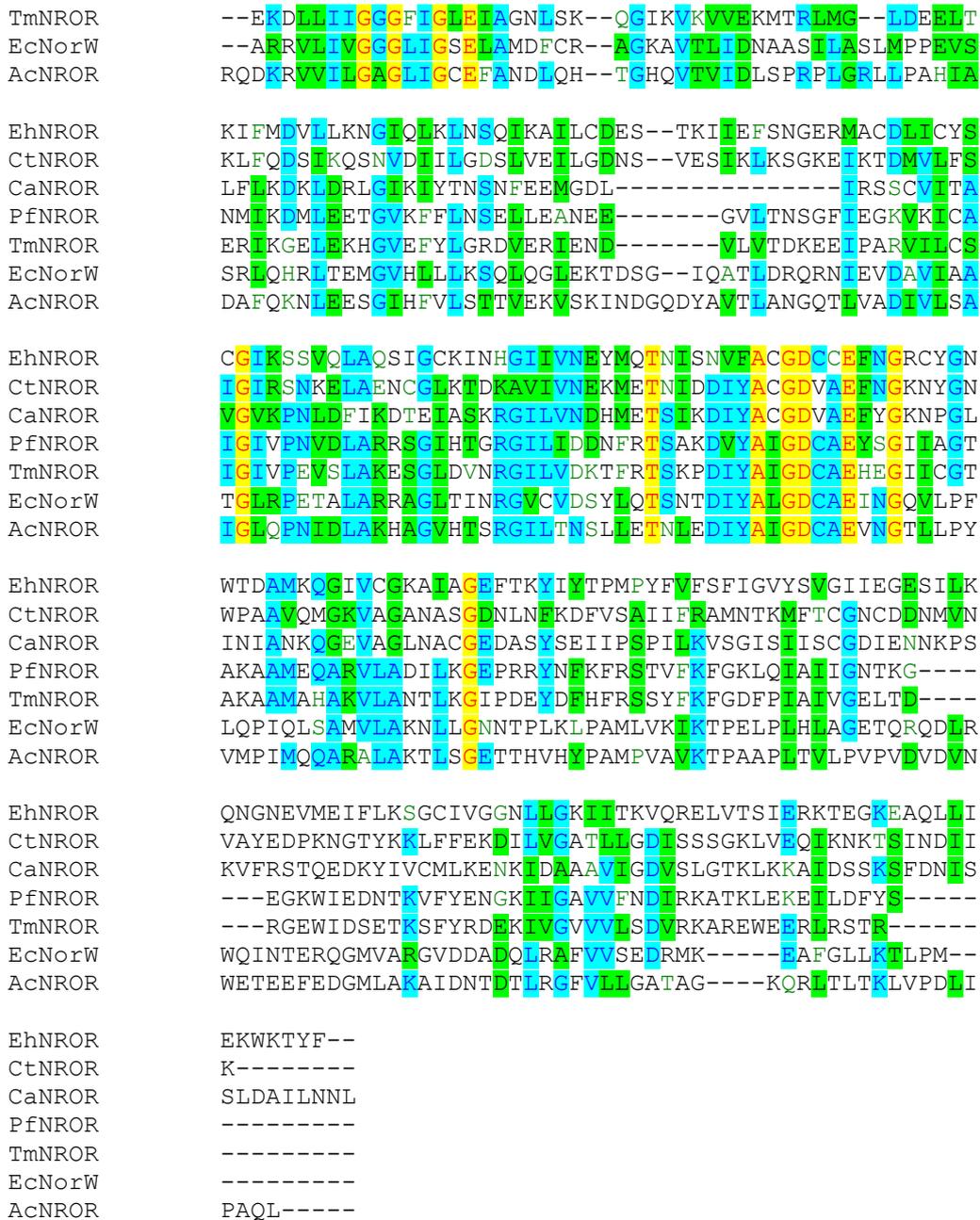


Figura 4.1.1: Alineamiento de las secuencias primarias de distintas NRORs. Eh: *Entamoeba histolytica*; Ct: *Clostridium tetani* (Q890W4); Ca: *Clostridium acetobutylicum* (Q9AL95); Pf: *Pyrococcus furiosus* (Q8U1K9); Tm: *Thermotoga maritima* (Q9WZL3); Ec: *Escherichia coli* (P37596); Ac: *Acinetobacter* sp. ADP1 (P42454). Entre paréntesis se indica el código de identificación UniProt. Resaltado en rojo se indica el dominio tipo rubredoxina presente en la CtNROR. Los # indican las posibles cisteínas quelantes del átomo de hierro. Se indican los sitios de unión a FAD y NAD(P)H. Omitiendo la enzima de *C. tetani*, las demás NRORs fueron confirmadas funcionalmente.

4.1.2. Clonado y expresión de la EhNROR.

Con el objetivo de caracterizar bioquímicamente a la EhNROR se procedió a obtener la proteína de forma recombinante. Para esto se diseñaron dos estrategias, una que tenía como objetivo expresar la proteína de forma completa y otra que generaba una versión donde se eliminaban 47 aminoácidos del extremo N-terminal

(*EhNROR* Δ 47N). Se utilizó la secuencia nucleotídica del gen *ehnr*, obtenida de la base de datos AmoebaDB (www.amoebadb.org), para diseñar cebadores específicos que poseían los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III (marco de lectura +1). Las secuencias codificantes para las proteínas de interés fueron amplificadas a partir de ADN genómico mediante PCR. Los productos de la reacción se ligaron al vector pGEM-T *Easy* y la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de *E. coli* Top10 utilizando el método del CaCl₂. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico, a partir de clones individuales, y la secuencia esperada para los insertos fue confirmada por secuenciación total. Finalmente, se utilizaron los sitios de restricción incluidos en los cebadores para sub-clonar los insertos en el vector pQE-9 y transformar con dichas construcciones, mediante el método de CaCl₂, células competentes de *E. coli* M15. Este sistema de expresión utiliza una ARN polimerasa endógena, junto con un promotor híbrido *Ptac* inducible (*trp/lac*), para guiar la expresión del gen recombinante.

Se comprobó, durante los ensayos de expresión, que ambas versiones de la proteína presentan problemas en cuanto a su solubilidad. Para optimizar la cantidad de proteína soluble se realizó la inducción del cultivo en las condiciones detalladas en la tabla 4.1.1. Fue llamativo comprobar que diversas combinaciones de otras cepas – vectores, basadas en el sistema de expresión T7, no produjeron las proteínas recombinantes de forma soluble, en ninguna de las condiciones ensayadas.

Condiciones de expresión <i>EhNROR</i>	
Cepa	<i>E. coli</i> M15
Plásmido	pQE-9
Medio	<i>Terrific Broth</i> (TB)
Suplemento	100 μ M Riboflavina
DO (al inducir)	1,2
Inductor	0,1 mM IPTG
Temperatura de inducción	20 °C
Tiempo de inducción	16 h

Tabla 4.1.1: Condiciones de expresión para la *EhNROR*. El proceso de purificación se realizó mediante IMAC a 8 °C con una columna HiTrap chelating de 1 ml (GE) cargada con Ni²⁺, utilizando un dispositivo ÄKTAprime plus (GE). Las fracciones coloreadas (amarillo tenue) se unificaron y concentraron por ultrafiltración. Finalmente la proteína se acondicionó y se conservó alicuotada a -80 °C. Como se aprecia en la figura 4.1.2-A, el proceso de purificación resultó en una pureza superior al 90 %.

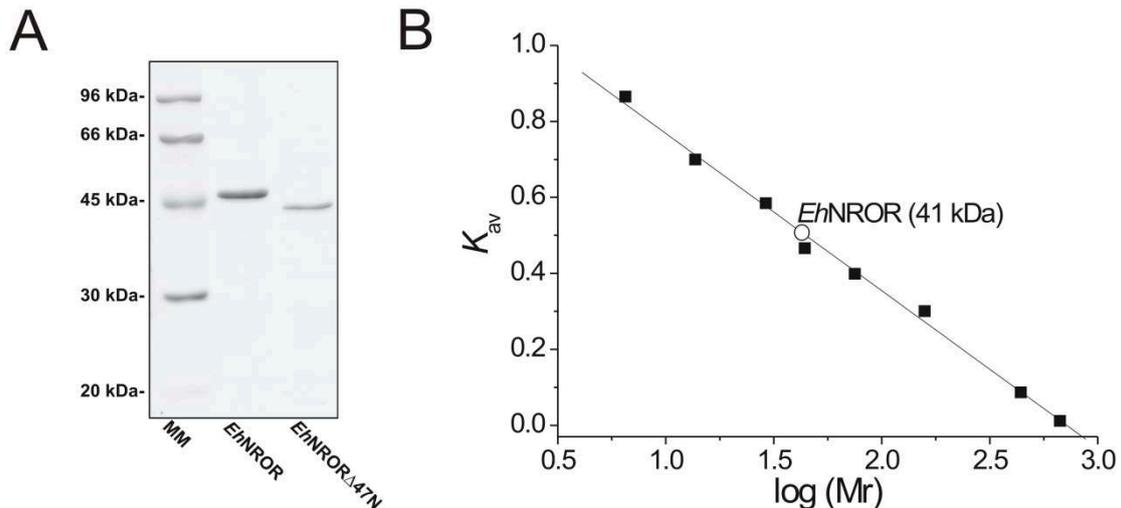


Figura 4.1.2: **A)** Análisis electroforético por SDS-PAGE de las distintas versiones purificadas de la EhNROR. La etiqueta MM indica los patrones de masa molecular. **B)** Análisis por cromatografía de filtración por geles en una columna Tricorn Superdex 200 HP. Gráfico de K_{av} vs $\log(M_r)$: (■) proteínas patrones (○) proteína recombinante. Todas las proteínas patrones pertenecen a GE (Filtration Calibration Kit): Tiroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Aldolasa (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Ribonucleasa A (13,7 kDa) y Aprotinina (6,5 kDa).

4.1.3. Análisis de las características bioquímicas de la EhNROR

A juzgar por los patrones de masa molecular de los SDS-PAGE, la EhNROR purificada migra como una proteína de ~50 kDa, lo que se corresponde con la masa teórica calculada desde la secuencia primaria (figura 4.1.2-A). Por otra parte, no se observan diferencias en la migración electroforética relativa cuando la proteína es analizada en geles no reductores. Un ensayo de titulación de tioles, utilizando DTNB, determinó que la proporción de tioles por molécula de EhNROR es de $21,2 \pm 0,4$, lo que implica que las 21 cisteínas presentes en la proteína se encuentran en su forma reducida. Todos estos resultados sugieren que, *a priori*, no existen enlaces disulfuros intra o inter moleculares presentes en la enzima. Finalmente, se realizó una cromatografía de filtración por geles para determinar la estructura cuaternaria de la proteína. La EhNROR eluyó con un volumen atribuible a una proteína de ~41 kDa, lo que sugiere que la enzima se comporta como un monómero (figura 4.1.2-B). Este resultado se encuentra en línea con reportes previos relativos a la estructura cuaternaria de rubredoxinas reductasas y NADH oxidasas presentes en otros organismos (Brown y col., 1996; Ma y Adams, 2001; Hagelueken y col., 2007; Nishikawa y col., 2010).

Mediante espectroscopia UV-visible se pudo comprobar la presencia de flavina en la EhNROR. El espectro de la proteína exhibió los picos característicos, a 450 y 375 nm, presentes en las flavoproteínas (Macheroux, 1999). Como se muestra en la figura 4.1.3-A, el agregado de NADPH causó una disminución en la absorbancia a 460

nm, que corresponde con la reducción del grupo prostético de flavina (Macheroux, 1999; Cheng y col., 2007). En la mayoría de las flavoproteínas el cofactor se encuentra fuertemente unido a la cadena polipeptídica, pero de forma no covalente. Este parece ser el caso de la flavina presente en la *EhNROR* ya que el compuesto coloreado pudo ser removido luego de la desnaturalización térmica de la proteína. Un análisis de cromatografía en capa delgada indicó que la *EhNROR* contiene FAD como grupo prostético (figura 4.1.3-B). El contenido de flavina de la proteína recombinante resultó ser de $1,2 \pm 0,3$ mol de FAD / mol de proteína. Considerando la presencia del posible dominio tipo-rubredoxina en el extremo N-terminal de la *EhNROR*, se intentó comprobar si la proteína poseía hierro como cofactor. El metal no se detectó, aún cuándo la proteína fue producida en un medio de cultivo suplementado con hierro. Este resultado concuerda con el hecho de que todas las cisteínas de la *EhNROR* se detectaron en su estado tiol.

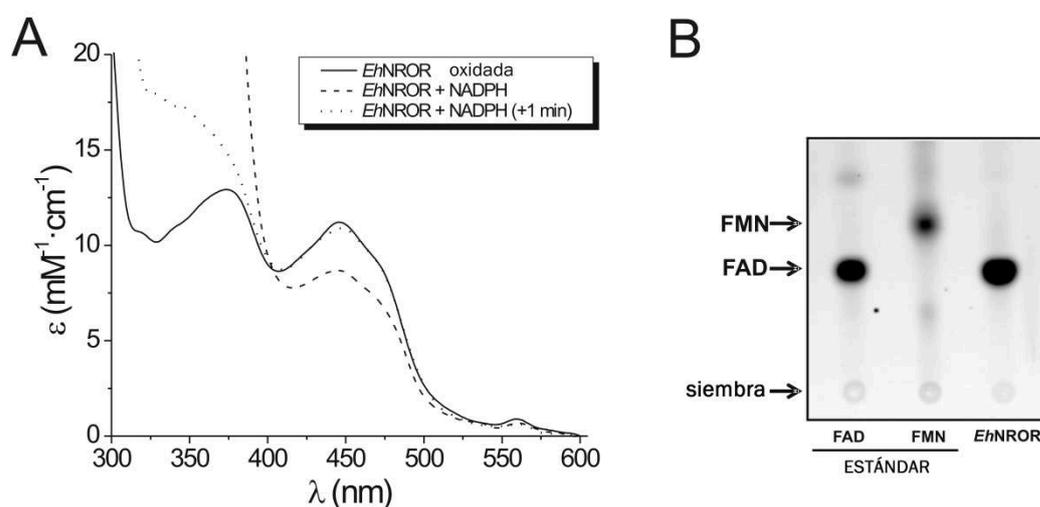


Figura 4.1.3: A) Espectro de absorción UV-visible de la *EhNROR* purificada (25 °C y pH 7,0). Línea continua: *EhNROR* oxidada; línea de trazos: *EhNROR* + 50 μ M NADPH; línea de puntos: *EhNROR* 1 min luego de la adición de NADPH. **B)** Determinación por TLC del tipo de flavina presente en la *EhNROR*. La placa fue revelada en un escáner de fluorescencia Typhoon.

4.1.4. Estudio de la capacidad NAD(P)H oxidasa de la *EhNROR*.

Tomando en cuenta la anotación original del proyecto genoma para la *EhNROR*, evaluamos la capacidad de la proteína recombinante de oxidar NAD(P)H. Así, en condiciones aerobias, la *EhNROR* mostró actividad NAD(P)H oxidasa utilizando O_2 como aceptor final (figura 4.1.4). Esta actividad siguió una cinética de saturación hiperbólica y fue máxima a pH 7,0 (a 30 °C). La tabla 4.1.2 resume los parámetros cinéticos calculados para la oxidación de NADPH y NADH, utilizando O_2 como cosustrato. La eficiencia catalítica exhibida por la enzima amebiana es 5 veces mayor para NADPH que para NADH. Este resultado contrasta con el comportamiento de la

NADH oxidasa de *G. lamblia* que tiene una marcada especificidad hacia el NADH (Brown y col., 1996).

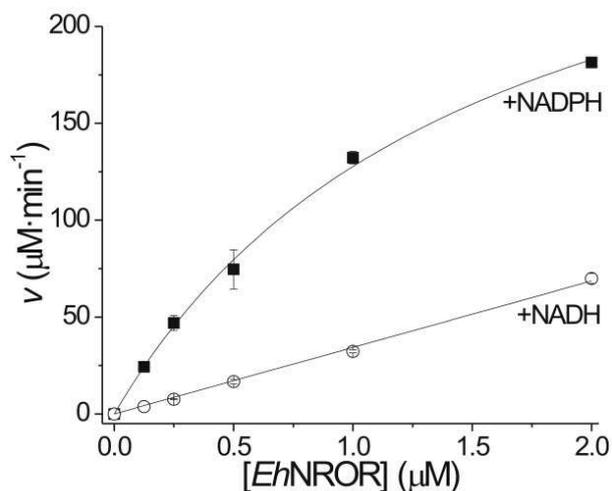
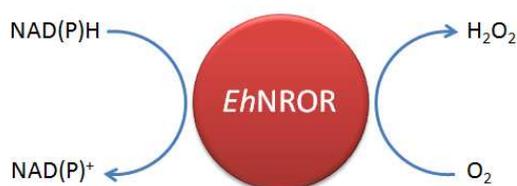


Figura 4.1.4: Actividad NAD(P)H oxidasa de la EhNROR (a 340 nm). Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,0 y 30 °C con 300 μM NADPH (■) o 300 μM NADH (○) y diferentes concentraciones de EhNROR.



Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
O ₂ ~200 μM	NADPH	36 ± 3	182 ± 5	8,4·10 ⁴
	NADH	183 ± 15	176 ± 9	1,6·10 ⁴

Tabla 4.1.2: Esquema y parámetros cinéticos para la actividad NAD(P)H oxidasa de la EhNROR a pH 7,0 y 30 °C.

La bibliografía consultada sugiere la existencia de dos tipos de NADH oxidasas según sea su inclinación a formar H₂O o H₂O₂ como producto (Matsumoto y col., 1996). Utilizando el método del ferrocianato se determinó que la reducción de O₂ mediada por la EhNROR genera H₂O₂ (figura 4.1.5). La tasa de producción de H₂O₂ fue equiparable con la de oxidación del NADPH o NADH.

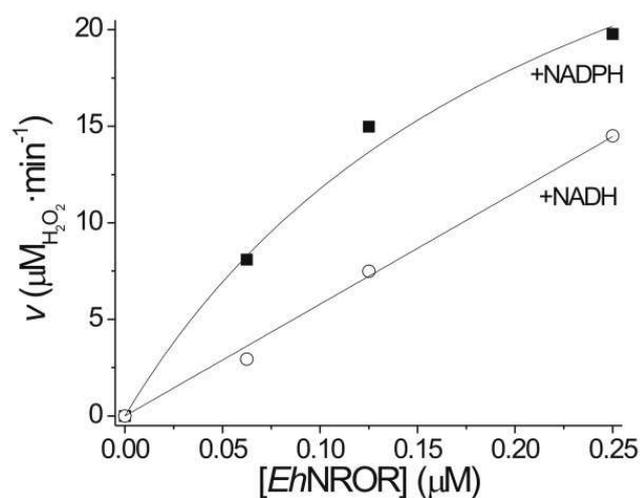


Figura 4.1.5: Producción de H_2O_2 por la acción de la EhNROR. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,0 y 30 °C en presencia de 300 μM NADPH (■) o 300 μM NADH (○) y diferentes concentraciones de EhNROR.

Como ya se ha aclarado anteriormente, debido a la restricción de espín, la reducción del O_2 en sistemas biológicos se produce mayoritariamente por un mecanismo de transferencia electrónica univalente. En consecuencia, se piensa que el O_2 y la flavina reducida (en las flavoenzimas) experimentan la transferencia de un electrón para generar un par de radicales, flavina semiquinona y O_2^- . Es probable que el O_2^- quede retenido en la enzima el tiempo suficiente para que se produzca una nueva molécula de O_2^- , dejando la flavina en su forma oxidada. Luego se produciría una dismutación entre las dos moléculas de O_2^- para generar H_2O_2 . Ciertas flavoenzimas tienen menor capacidad para retener el producto de la primera transferencia electrónica y por ende liberan O_2^- al medio celular. Esto puede generar efectos nocivos o ser un evento deseado, por ejemplo en el estallido respiratorio de los fagocitos (Chaiyen y col., 2012).

Se utilizó el ensayo de reducción del NBT para evidenciar la producción de O_2^- por parte de EhNROR. Como se indica en la figura 4.1.6, cuando las mezclas de reacción conteniendo NADPH y NBT (en condiciones aerobias) fueron suplementadas con diversas concentraciones de la enzima, la tasa de reducción del NBT se incrementó proporcionalmente. Cabe agregar que la tasa de reducción del NBT fue estimulada o inhibida por la presencia de CAT o SOD, respectivamente. Todo lo anterior indica que EhNROR es proclive a la fuga de moléculas de O_2^- durante su ciclo de catálisis, en la reducción de O_2 .

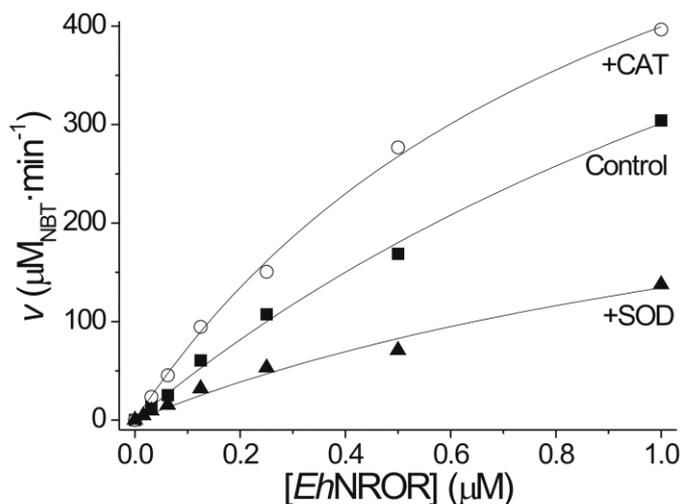


Figura 4.1.6: Ensayo de reducción del NBT por acción del O_2^- liberado durante la catálisis de la EhNROR. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,0 y 30 °C. Se utilizó una concentración de 300 μM NADPH y diferentes cantidades de EhNROR. Reacciones iniciadas en forma paralela contaron además con la presencia de catalasa (CAT) o superóxido dismutasa (SOD).

Finalmente se evaluó el perfil de inhibición de diferentes compuestos sobre la actividad NADPH oxidasa de la *EhNROR*. Dicha actividad fue sensible a IAA (compuesto alquilante), mientras que también se vio afectada por Cu^{2+} ($IC_{50} = 0,4 \mu M$), Hg^{2+} ($IC_{50} = 1,4 \mu M$) y Zn^{2+} ($IC_{50} = 4 \mu M$). Por otro lado, otros cationes bivalentes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} o compuestos que modifican centros metálicos (azida y EDTA), no provocaron efecto alguno. Se deduce así que existen residuos de cisteínas en la *EhNROR* que jugarían un papel importante durante la catálisis (figura 4.1.7). Un comportamiento similar se observa en la NADH oxidasa de *Giardia* (Brown y col., 1996). Inesperadamente, las coenzimas oxidadas aparentaron inhibir la actividad oxidasa de la enzima. Este comportamiento se estudió en profundidad y se detalla en la sección 4.1.15.

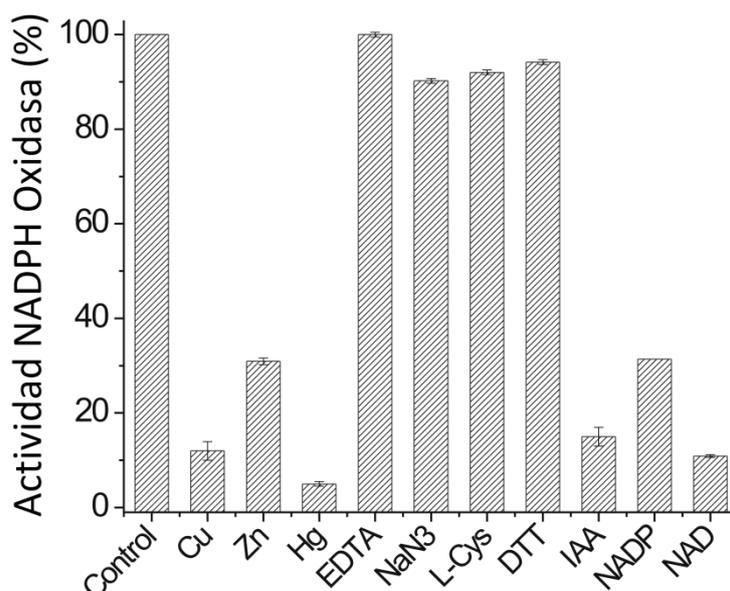


Figura 4.1.7: Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad NADPH oxidasa de la EhNROR. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,0 y 30 °C en presencia de 300 μ M NADPH y diferentes compuestos: Cu^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} a 100 μ M; EDTA, asida sódica, L-Cys, DTT, IAA, NADP⁺ y NAD⁺ a 1 mM. La reacción control se realizó sin aditivos.

4.1.5. Estudio de la capacidad de la EhNROR de reducir compuestos de bajo peso molecular.

El siguiente aspecto que se evaluó fue la competencia de *EhNROR* para mediar la reducción de compuestos de bajo peso molecular. La actividad se siguió midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH, durante la reducción de compuestos tales como H_2O_2 , azul de metileno (MB), $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, metil viológeno (MV), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), NO_2^- , NH_2OH y 2-metilbenzoquinona (MBQ). En cambio, para los compuestos FAD y FMN se siguió el aumento de la absorbancia (a 450 nm) que provoca su reducción. Los resultados obtenidos marcan que solo CDBN, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ y MV actúan como sustratos aceptores de los electrones transferidos desde la *EhNROR* y su reducción sigue una cinética de Michaelis-Menten (tabla 4.1.3). Por esta razón se puede argumentar que la *EhNROR* posee actividad nitro y ferri-reductasa. El comportamiento y los parámetros cinéticos fueron semejantes a los reportados para enzimas similares de otros organismos (Ma y Adams, 1999). En cuanto a la actividad ferrireductasa dependiente de NADPH, cuando se ensayaron altas concentraciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (mayores a 300 μ M), se detectó una cinética de inhibición por sustrato clásica de la enzima ($K_i = 393 \pm 80 \mu\text{M}$ a 30 °C y pH = 7). Llamativamente, no se observó inhibición enzimática cuando el NADH fue utilizado como sustrato reductor (figura 4.1.8).

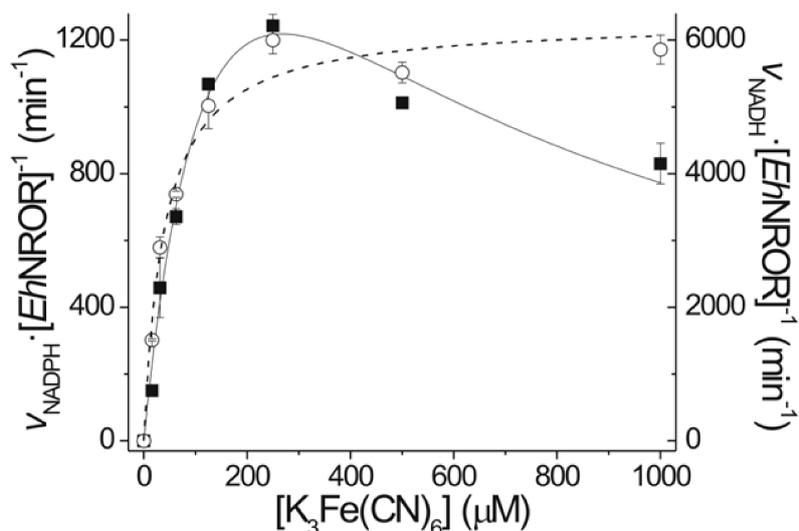


Figura 4.1.8: Actividad ferri-reductasa de la EhNROR. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,0 y 30 °C en presencia de 300 μM NADPH (■) o 300 μM NADH (○) y diferentes concentraciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (15 - 1000 μM). La concentración de EhNROR fue de 0,01 – 0,1 μM.

Con respecto a la reducción de nitrocompuestos, se observó que dicha actividad es más eficiente cuando la EhNROR utiliza NADPH en lugar de NADH. Es interesante recordar que este tipo de actividad, atribuida a diferentes moléculas en el parásito, es la responsable de la activación de drogas terapéuticas como el metronidazol (Pal y col., 2009).

Se inspeccionó la capacidad de la EhNROR de utilizar como sustratos a distintos disulfuros de bajo peso molecular. En este caso la enzima no presentó actividad frente a lipoamida, glutatión disulfuro (GSSG) o cistina (hasta 1 mM), mientras que sí pudo apreciarse una leve actividad disulfuro reductasa cuando se utilizó DTNB como sustrato. La reducción del DTNB siguió una cinética de Michaelis-Menten con una baja eficiencia catalítica ($320 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a 30 °C y pH = 7.0) (tabla 4.1.3).

Los S-nitrosotioles son portadores de NO^* , actuando como potenciales oxidantes de tioles proteicos esenciales. Por lo tanto, se investigó la participación de la EhNROR en la reducción de S-nitrosotioles, utilizando S-nitroso-cisteína (CySNO) como sustrato. Esta elección se debió a que de acuerdo a la particular bioquímica de *E. histolytica*, la CySNO es el representante fisiológico más factible de formarse dentro del parásito. Cuando la mezcla de reacción conteniendo NADPH y CySNO (en condiciones microaerobias) fue suplementada con la enzima, la tasa de oxidación del NADPH se incrementó proporcionalmente con la concentración de la EhNROR. La reducción de CySNO siguió una cinética de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos calculados se listan en la tabla 4.1.3. La eficiencia catalítica observada para la reducción de CySNO ($\sim 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH = 7,0 y 30 °C), por parte de la EhNROR,

es comparable con los valores reportados para la tiorredoxina reductasa del mismo organismo (Arias y col., 2012).



Co-sustrato	Sustrato	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} · Km ⁻¹ (M ⁻¹ · s ⁻¹)
NADPH 300 μM	Fe(CN) ₆ ³⁻	183 ± 28	2879 ± 320	2,6 · 10 ⁵
	CDNB	110 ± 11	1080 ± 36	1,6 · 10 ⁵
	MV	162 ± 22	64 ± 3	6,5 · 10 ³
	H ₂ O ₂		No Detectable	
	MB		No Detectable	
	NO ₂ ⁻		No Detectable	
	NH ₂ OH		No Detectable	
	MBQ		No Detectable	
	FAD		No Detectable	
	FMN		No Detectable	
	DTNB	468 ± 32	8,7 ± 0,2	3,1 · 10 ²
	Lipoamida		No Detectable	
	GSSG		No Detectable	
	Cistina		No Detectable	
CySNO	243 ± 22	116 ± 4	8,0 · 10 ³	
NADH 300 μM	Fe(CN) ₆ ³⁻	40 ± 6	6298 ± 243	2,6 · 10 ⁶
	CDNB	105 ± 15	87 ± 6	1,4 · 10 ⁴

Tabla: 4.1.3: Esquema y parámetros cinéticos para la reducción de distintos compuestos, a expensas de NAD(P)H, mediada por la EhNROR (pH 7,0 y 30 °C).

4.1.6. Estudio de la capacidad redoxina reductasa de la EhNROR.

La búsqueda de homólogos antes mencionada, nos permitió inspeccionar la actividad NAD(P)H rubredoxina reductasa de la EhNROR utilizando como sustratos las Rds de *Clostridium pasteurianum* (CpRd) (Mathieu y col., 1992) y *Pyrococcus furiosus* (PfRd) (Blake y col., 1991) (figura 4.1.9). La actividad enzimática evidenció un máximo a pH = 7,0 (a 30 °C) y la eficiencia catalítica de la enzima fue 5 veces mayor al utilizar NADH en lugar de NADPH. El análisis de los parámetros cinéticos obtenidos indican

que esta diferencia se basa mayormente en la variación de los valores calculados para las k_{cat} y no en los de las K_m , que se mantienen similares sin importar el tipo de coenzima empleada. Esta preferencia también ha sido reportada para NRORs de otras fuentes, aunque la diferencia en esos casos fue más acentuada (Guedon y Petitdemange, 2001). Así mismo, no se observó inhibición por sustrato al evaluar altas concentraciones de NAD(P)H (hasta 300 μ M). Los resultados presentados en la tabla 4.1.4 indican que *EhNROR* exhibe una alta afinidad ($K_m \sim 2,8 - 5,2 \mu$ M) y una alta eficiencia catalítica hacia las Rbs heterólogas ($k_{cat} \cdot K_m^{-1} \sim 3 \times 10^6 - 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH = 7,0 y 30 °C), siendo estos valores similares a aquellos determinados para NRORs de otras especies (Lee y col., 1998; Ma y Adams, 1999; Guedon y Petitdemange, 2001; Vicente y col., 2008).

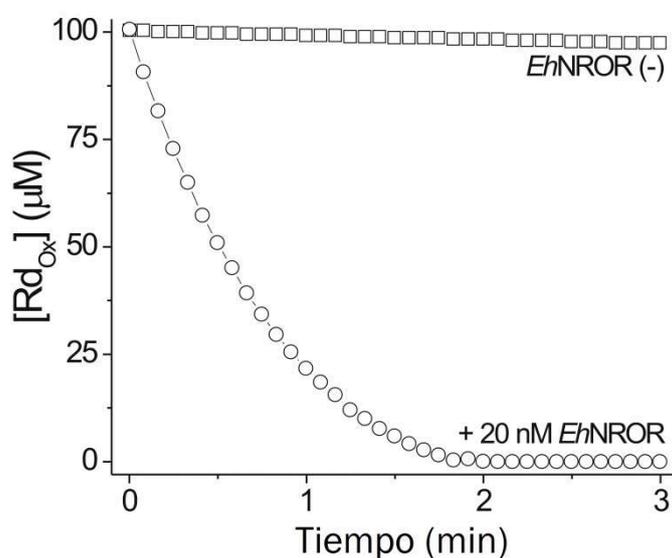
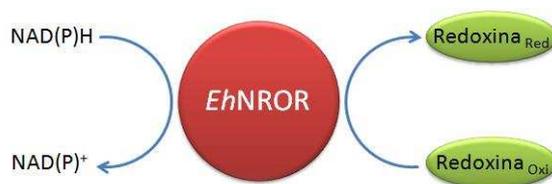


Figura 4.1.9: Actividad NADH rubredoxina reductasa de la *EhNROR*. Los ensayos se realizaron a pH 7,0, a 30 °C y en condiciones microaerobias. Se monitoreó la reducción de la *CpRd* a 492 nm. La mezcla de reacción contenía 200 μ M NADH, 100 μ M *CpRd* con (○) o sin (□) 20 nM de *EhNROR*.

Como se expuso previamente, algunas bacterias anaerobias desarrollaron sistemas antioxidantes peculiares. En estos sistemas, las enzimas efectoras, tales como las SOR, Rr o FDP, reciben los equivalentes de reducción por parte de una proteína de transferencia de electrones, la Rd. A su vez, esta proteína de bajo peso molecular es reducida por una flavoenzima (NROR) a expensas de NAD(P)H. En el genoma de *E. histolytica*, así como en el de otros parásitos anaerobios, no existen genes codificantes para Rbs (Loftus y col., 2005; Vicente y col., 2012). Por esta razón, no es trivial identificar el sustrato fisiológico de la *EhNROR*. Una alternativa razonable sería que la enzima pudiese actuar sobre otras redoxinas implicadas en fenómenos de transferencia de electrones como por ejemplo, ferredoxinas (Fd) o tiorredoxinas (Trx), presentes en abundancia en el parásito (Reeves y col., 1980; Arias y col., 2008). Para

evaluar esta posibilidad, se clonaron dos ferredoxinas de *E. histolytica* (sección 4.1.12) y se emplearon también dos tiorredoxinas homólogas. Sin embargo, no se detectó actividad redoxina reductasa cuando las Rd bacterianas fueron reemplazadas por redoxinas amebianas (*EhFd1*, *EhFd2*, *EhTrx8* o *EhTrx41*). Tampoco se detectó actividad utilizando otras redoxinas heterólogas, tales como ferredoxina de arveja (*PsFd*) y flavodoxina de *E. coli* (*EcFld*).



Co-sustrato	Sustrato	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} ·K _m ⁻¹ (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
NADH 300 μM	<i>PfRd</i>	5,2 ± 0,7	4166 ± 274	1,3·10 ⁷
	<i>CpRd</i>	4,3 ± 0,6	2158 ± 129	8,4·10 ⁶
	<i>EhFd1</i>		No Detectable	
	<i>EhFd2</i>		No Detectable	
	<i>EhTrx8</i>		No Detectable	
	<i>EhTrx41</i>		No Detectable	
	<i>PsFd</i>		No Detectable	
	<i>EcFld</i>		No Detectable	
NADPH 300 μM	<i>PfRd</i>	3,2 ± 0.2	574 ± 13	3,0·10 ⁶
	<i>CpRd</i>	2,8 ± 0.5	832 ± 63	5,0·10 ⁶

Tabla 4.1.4: Esquema y parámetros cinéticos para la reducción de distintas redoxinas, a expensas de NAD(P)H, mediada por la EhNROR (pH 7,0 y 30 °C).

4.1.7. Expresión y estudios bioquímicos de la EhRr.

Las rubreritinas (Rr) son ferro-proteínas no hemicas que poseen un dominio tipo-rubredoxina hacia el extremo C-terminal y un centro de hierro binuclear, con un plegamiento tipo-hemerythrina, hacia su porción N-terminal (figura 4.1.10) (LeGall y col., 1988). Se han reportado una serie de actividades enzimáticas asociadas a esta proteína, pero en la actualidad su función fisiológica más aceptada parece ser la de actuar como peroxidasa, detoxificando H₂O₂, en la defensa antioxidante de procariontes anaerobios (Weinberg y col., 2004). Durante el tiempo de desarrollo experimental de esta tesis, Maralikova y otros demostraron, utilizando un sistema heterólogo como dador de electrones, que la rubreritina de *E. histolytica* (*EhRr*) posee actividad peroxidasa. No obstante, dicha actividad fue sensiblemente menor a las reportadas

para sus homólogos. También acreditaron que en la *EhRr* se encuentran conservados todos los residuos necesarios para quelar los átomos de hierro (figura 4.1.10), pero no realizaron una cuantificación de los cofactores metálicos. Finalmente, evidenciaron que la enzima posee una localización subcelular mitocondrial (Maralikova y col., 2010).



Figura 4.1.10: Alineamiento de las secuencias primarias de distintas *Rrs*. *Eh*: *Entamoeba histolytica*; *Pf*: *Pyrococcus furiosus* (E7FH1); *Cp*: *Clostridium perfringens* (P51591); *Dv*: *Desulfovibrio vulgaris* (P24931); *Tv*: *Trichomonas vaginalis* (A2EHC4). Entre paréntesis se indica el código de identificación UniProt. Los * indican los residuos que participan en unir los átomos de hierro del dominio tipo-hemerythrina. Los * indican las cisteínas quelantes del átomo de hierro del dominio tipo-rubredoxina. También se indican las posiciones de ambos dominios. Todas las *Rrs* del alineamiento fueron confirmadas experimentalmente.

La información presente en la base de datos AmoebaDB indica que el gen *ehrr* (EHI_134810) tiene 570 pb y codifica para una proteína (*EhRr*) de 189 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 21,2 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,36. La *EhRr* comparte una alta identidad de secuencia con sus ortólogos experimentalmente caracterizados de *Desulfovibrio vulgaris* (GenBank: AAB20261; 35 % de identidad) (Coulter y col., 1999) y de *P. furiosus* (GenBank: AAL81407; 31% de identidad) (Weinberg y col., 2004). Con el objetivo de obtener la proteína de forma recombinante se diseñaron cebadores específicos que poseían los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III (marco de lectura +1). La secuencia codificante para la proteína fue amplificada a partir de ADN genómico mediante PCR. El producto de la reacción se ligó al vector pGEM-T *Easy* y la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competente de *E. coli* Top10 utilizando el método del CaCl₂. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico, a partir de clones individuales, y la secuencia

esperada para el inserto fue confirmada por secuenciación total. Finalmente, se utilizaron los sitios de restricción incluidos en los cebadores para sub-clonar los insertos en el vector pRSET-A y transformar con dichas construcciones, mediante el método de CaCl₂, células competentes de *E. coli* BL21(DE3).

Mediante ensayos de expresión se comprobó que la *EhRr* se expresaba en forma soluble, aunque se obtenían muy bajos rendimientos. Al analizar la secuencia de nucleótidos pudimos observar que la misma contiene 11 codones de uso infrecuente en *E. coli*, los cuales se dividen entre seis codones AGA (codificantes para arginina) y cinco codones GGA (codificantes para glicina). En total, estos comúnmente llamados codones raros, representan un 6 % de los tripletes codificantes para la *EhRr*. Es sabido que la presencia de codones raros en los genes heterólogos puede disminuir significativamente los niveles de expresión alcanzados por una proteína recombinante (Kurland y Gallant, 1996). Para sobrellevar estos inconvenientes se han desarrollado cepas que sobreexpresan los tRNA asociados a los tripletes infrecuentes. Al utilizar una de estas cepas, *E. coli* Rosetta(DE3), pudimos aumentar considerablemente el nivel de expresión soluble de la *EhRr*. Las condiciones finales elegidas para la producción de la *EhRr* recombinante se detallan en la tabla 4.1.5.

Condiciones de expresión <i>EhRr</i>	
Cepa	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)
Plásmido	pRSET-A
Medio	Lysogeny broth (LB)
Suplemento	23 µg/L Citrato férrico amoniacal
DO (al inducir)	0,6
Inductor	0,5 mM IPTG
Temperatura de inducción	28 °C
Tiempo de inducción	16 h

Tabla 4.1.5: Condiciones de expresión para la *EhRr*.

El proceso de purificación se realizó mediante IMAC a 8 °C con una columna *HiTrap chelating* de 1 ml (GE) cargada con Ni²⁺, utilizando un dispositivo *ÄKTAprime plus* (GE). Las fracciones coloreadas (rojo tenue) se unificaron y concentraron por ultrafiltración. Finalmente la proteína se acondicionó y se conservó alicuotada a -80 °C. Como se aprecia en la figura 4.1.11-A, el proceso de purificación resultó en una pureza superior al 90 %.

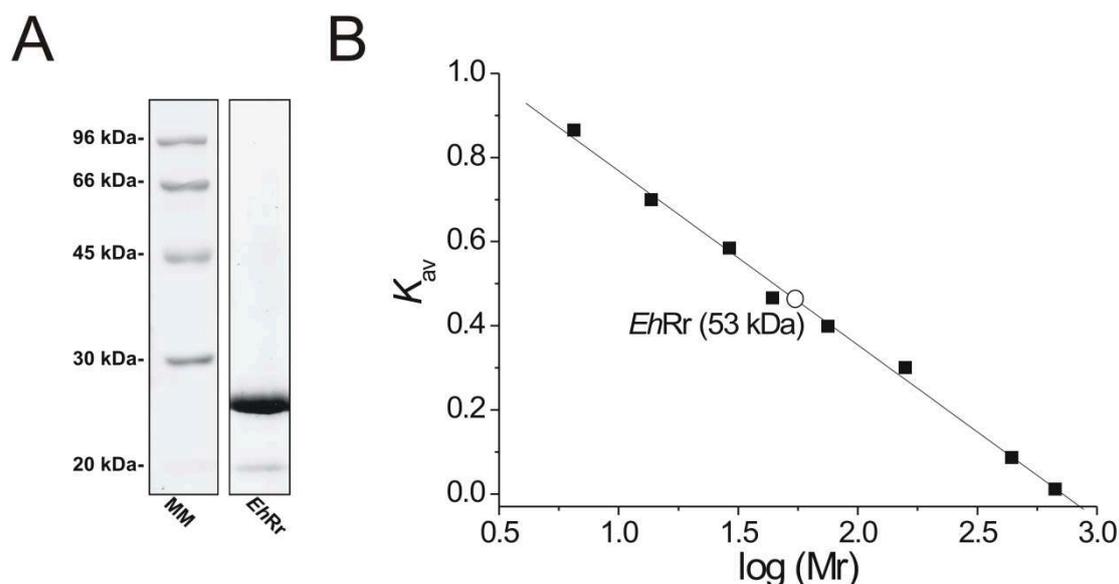


Figura 4.1.11: A) Análisis electroforético por SDS-PAGE de la EhRr purificada. La etiqueta MM indica los patrones de masa molecular. **B)** Análisis por cromatografía de filtración por geles en una columna Tricorn Superdex 200 HP. Gráfico de K_{av} vs $\log(M_r)$: (■) proteínas patrones (○) proteína recombinante. Todas las proteínas patrones pertenecen a GE (Filtration Calibration Kit): Tiroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Aldolasa (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Ribonucleasa A (13,7 kDa) y Aprotinina (6,5 kDa).

En geles SDS-PAGE reductores, la EhRr migró como una única banda de ~ 25 kDa, presumiblemente debido a la masa extra que le aporta la etiqueta de purificación (figura 4.1.11-A). Cuando se analizó la estructura cuaternaria de la enzima, mediante cromatografía de filtración por geles, la misma se comportó como un dímero (~ 53 kDa), lo que concuerda con la estructura reportada para otras Rrs de origen procarionta (figura 4.1.11-B) (Sieker y col., 2000). A su vez, se comprobó que la proteína recombinante contenía $3,4 \pm 0,6$ mol Fe / subunidad, indicando que los sitios metálicos se encuentran con ocupación plena.

La figura 4.1.12 expone el espectro de absorción de la EhRr oxidada y además muestra el cambio que se produce en el mismo, cuando la enzima es reducida con ditionito de sodio. Los picos de absorción a 494 y 580 nm se deben principalmente al centro tipo-rubredoxina, mientras que la señal a 370 nm representa las absorbancias combinadas del centro tipo-rubredoxina y del centro de hierro binuclear tipo-hemerythrina (Gupta y col., 1995).

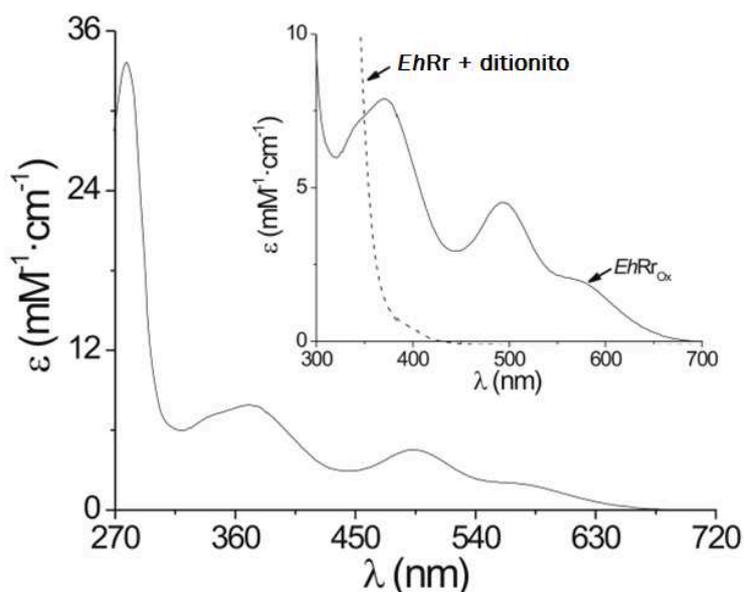


Figura 4.1.12: Espectro de absorción UV-visible de la EhRr purificada (25 °C y pH 7,0). Cuadro interior: Línea continua: EhRr oxidada; línea de trazos: EhRr + 100 μ M de ditionito de sodio.

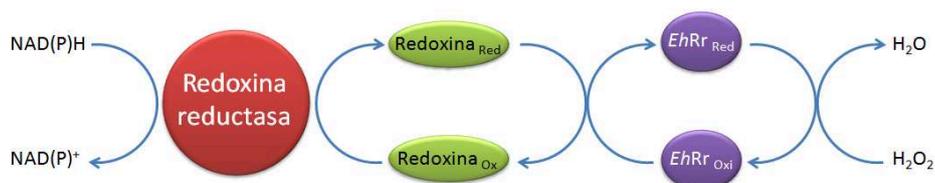
Resumiendo, siguiendo el protocolo indicado anteriormente, la EhRr pudo obtenerse de forma soluble, en cantidades apreciables y con incorporación total de átomos de hierro a su estructura. Se puntualiza en este aspecto porque las Rr estudiadas hasta el momento presentan diversos problemas en cuanto a su obtención de forma recombinante. La Rr de *D. vulgaris* se expresa de forma insoluble y necesita de un proceso de renaturalización, e incorporación de hierro, para ser activa (Gupta y col., 1995). Por otro lado, la Rr de *P. furiosus*, al ser obtenida de forma recombinante, incorpora zinc en algunos de sus sitios metálicos, lo que ocasiona que la enzima recombinante solo posea un 10% de la actividad presente en la PfRr obtenida de fuente (Weinberg y col., 2004). Las Rr son utilizadas habitualmente como modelos para estudios estructurales y espectroscópicos, por lo que la practicidad con la que se logró obtener la EhRr recombinante podría convertirla en un reemplazo conveniente para las Rr usadas corrientemente.

4.1.8. Análisis de la actividad peroxidasa de la EhRr.

Para iniciar la caracterización cinética de la actividad peroxidasa (redoxina dependiente) de la EhRr, se utilizaron varias redoxinas heterólogas (PfRd, PsFd y EcFId) como sustratos reductores, y se empleó H₂O₂ como aceptor final de electrones. En cada caso, las redoxinas fueron regeneradas utilizando una reductasa dependiente de NAD(P)H. Los valores calculados de k_{cat} aparente muestran que la EhRr es capaz de utilizar los tres tipos de redoxinas: PfRd (100,3 min⁻¹), PsFd (26,3 min⁻¹) y EcFId (17,5 min⁻¹). En cambio, no se detectó actividad peroxidasa cuando se

emplearon tioredoxinas como sustratos. Estos resultados evidencian que este tipo de redoxinas, pertenecientes a sistemas diferentes, pueden comportarse de forma menos estructurada de lo que habitualmente se cree, pudiendo ser intercambiadas entre sí cuando están presentes en un mismo organismo. Esta posibilidad quizá dependa de sus concentraciones relativas en cada condición particular de crecimiento.

Dada la abundancia y relevancia de las ferredoxinas en *E. histolytica*, y vistos los resultados anteriores, se propuso estudiar el comportamiento de la *EhRr* al utilizar como sustratos ferredoxinas provenientes del mismo organismo. Con este objetivo, se clonaron, expresaron y purificaron dos ferredoxinas (*EhFd1* y *EhFd2*) de *E. histolytica* (sección 4.1.12). Para regenerar las Fd amebianas, se acopló la reacción con una ferredoxina reductasa de arveja (*PsFNR*) y se siguió el cambio de absorbancia debido a la oxidación del NADPH mediada por la reductasa. Las Fd amebianas fueron capaces de ceder equivalentes de reducción a la *EhRr* con una eficiencia catalítica similar a la exhibida por la *PfRd*. La reducción de la *EhRr* por parte de las *EhFd1* y *EhFd2* siguió una cinética hiperbólica y en la tabla 4.1.6 se presentan los parámetros cinéticos calculados.



Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
H_2O_2 25 μM	<i>PfRd</i>	$3,7 \pm 0,5$	620 ± 40	$2,8 \cdot 10^6$
	<i>EhFd1</i>	$2,7 \pm 0,4$	432 ± 26	$2,7 \cdot 10^6$
	<i>EhFd2</i>	$1,3 \pm 0,2$	465 ± 30	$6,0 \cdot 10^6$
	<i>EhTrx8</i>		No Detectable	
	<i>EhTrx41</i>		No Detectable	
<i>PfRd</i> 10 μM	H_2O_2	$>25 \mu\text{M}$	No Determinado	$3,3 \cdot 10^5$
<i>EhFd1</i> 10 μM		$>25 \mu\text{M}$	No Determinado	$2,2 \cdot 10^5$
<i>EhFd2</i> 10 μM		$>25 \mu\text{M}$	No Determinado	$2,0 \cdot 10^5$

Tabla 4.1.6: Esquema y parámetros cinéticos para la *EhRr* a pH 7,0 y 30 °C.

Finalmente, para completar la caracterización de la *EhRr* se evaluó el comportamiento de la enzima hacia el sustrato reducible, H_2O_2 , utilizando tanto la *PfRd* como las *EhFds*. A diferencia de lo informado previamente (Maralikova y col., 2010), y como se puede verificar en la tabla 4.1.6, la *EhRr* mostró altos valores de eficiencia

catalítica para la reducción de H_2O_2 ($k_{\text{cat}} \cdot \text{K}_m^{-1} = 2,0 - 3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a 30°C y $\text{pH} = 7$) independientemente de cuál fuera la redoxina utilizada por la enzima. La eficiencia catalítica calculada es similar a los valores reportados para otras Rr bacterianas (Coulter y col., 1999) y diversas peroxirredoxinas (incluyendo la amebiana) (Arias y col., 2008), lo que indicó que la EhRr puede comportarse, *in vivo*, como una peroxidasa eficiente. Por otra parte, la enzima evidenció inhibición por sustrato a concentraciones mayores de $25 \mu\text{M}$, con una $K_i = 167 \pm 26 \mu\text{M}$ a 30°C y $\text{pH} = 7$ (figura 4.1.13).

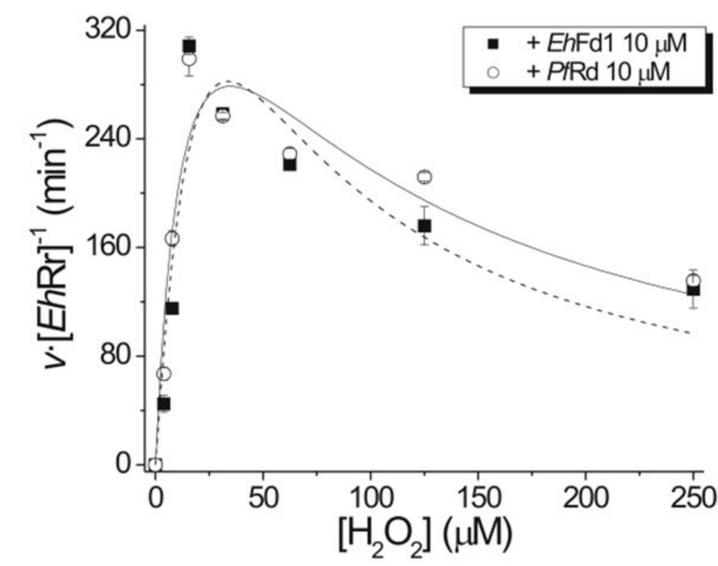


Figura 4.1.13: Cinética de la reducción de H_2O_2 por acción de la EhRr a $\text{pH} 7,0$ y 30°C . Los ensayos se realizaron monitoreando la oxidación de NAD(P)H a 340 nm con $0,01 - 0,5 \mu\text{M}$ de EhRr, diferentes concentraciones de H_2O_2 ($7 - 250 \mu\text{M}$) y distintos sistemas reductores: (■) $300 \mu\text{M}$ NADPH, $1 \mu\text{M}$ PsFNR y $10 \mu\text{M}$ EhFd1 o (○) $300 \mu\text{M}$ NADH, $1 \mu\text{M}$ TmNROR y $10 \mu\text{M}$ PfRd.

4.1.9. Antecedentes y análisis de la secuencia primaria de la EhFDPs.

La actividad O_2 reductasa observada en *E. histolytica* se ha considerado como una función accesoria manifestada por diferentes flavoenzimas, sin embargo la mayoría de estas generan H_2O_2 como producto de la reacción (incluida la EhNROR) (Lo y Reeves, 1980; Arias y col., 2007; Jeelani y col., 2010). En condiciones fisiológicas no se ha detectado, *in vivo*, la producción de dicho peróxido (Reeves, 1984). Teniendo en cuenta que *E. histolytica* tiene una elevada capacidad de “respiración” (Weinbach y Diamond, 1974), es esperable que existan enzimas alternativas que lleven adelante esta función de una forma segura, evitando la formación de especies reactivas.

Las FDPs constituyen una amplia familia de enzimas detoxificantes que actúan como O_2 y/o NO^* reductasas. Sin embargo, la preferencia por uno u otro sustrato no ha

sido comprendida a nivel estructural (Vicente y col., 2008). Genes codificantes para las FDPs han sido hallados principalmente en procariotas (generalmente anaerobios). Entre los pocos eucariotas donde se encontró este tipo de proteína, se encuentran los protozoos anaerobios *Giardia lamblia* (un gen) y *Trichomonas vaginalis* (cuatro homólogos). Estos genes aparentan haber sido adquiridos mediante transferencia horizontal de genes (THG) desde procariotas (Andersson y col., 2006). Se han estudiado con anterioridad, la FDP presente en *G. lamblia* (Di Matteo y col., 2008) y una de las copias de *T. vaginalis* (Smutna y col., 2009). En ambos casos las enzimas evidenciaron solo actividad O₂ reductasa, localizándose la enzima de *T. vaginalis* en los hidrogenosomas (posee un péptido de tránsito, figura 4.1.14). En este último caso los autores comprobaron, de forma cualitativa, que una ferredoxina hidrogenosomal sería su dador de electrones fisiológico, ya que, al igual que lo que ocurre en *E. histolytica*, no existen rubredoxinas codificadas en ninguno de los genomas de estos parásitos amitocondriados (Smutna y col., 2009).

En el genoma de *E. histolytica* existen cuatro genes codificantes para FDPs. Ensayos de microarreglos revelaron que dos de esos genes (*EhFDP1-2*) presentan altos niveles de transcritos bajo condiciones basales. Por otra parte, sus ARNm no aparentan estar modulados bajo condiciones de estrés oxidativo o nitrosativo (Vicente y col., 2009), ni por otros tipos de condiciones experimentales (Gilchrist y col., 2006; Weber y col., 2006). Es interesante observar que el gen codificante para *EhFDP1* exhibe niveles de mensajeros más altos en *E. histolytica* que en la especie no virulenta, *E. dispar* (MacFarlane y Singh, 2006).

Las cuatro isoformas de la *EhFDP* presentes en *E. histolytica* muestran una alta identidad de secuencia entre ellas (53 a 66%), mientras que la identidad con las FDP de otros protozoos anaerobios no es tan elevada (23 a 24% con la enzima de *G. lamblia* y 22 a 29% con la de *T. vaginalis*). Esto sugiere que, si bien todas las FDP probablemente fueron adquiridas mediante THG desde procariotas, provienen de fuentes filogenéticamente distantes. En el caso de las FDPs amebianas, los homólogos bacterianos más cercanos pertenecen al género *Clostridium* y promedian un 40% de identidad. Los alineamientos de las FDP amebianas muestran claramente la presencia de los dos dominios estructurales característicos de estas enzimas: un dominio C-terminal con un plegamiento tipo-flavodoxina (conteniendo un cofactor de flavina) y un dominio N-terminal con un plegamiento tipo-β-lactamasa (conteniendo el centro binuclear de hierro). También se puede distinguir que, en la secuencia aminoacídica de las FDP amebianas, se encuentran conservados todos los residuos

involucrados en la ligación de los centros metálicos, así como también los residuos que componen el sitio de unión a flavina (figura 4.1.14).

	[===== Tipo-β-lactamasa =====]
EhFDP1	-----MKALEVVKDELYWVGVFDKELRVFDLIMTTPY-GTSY
EhFDP2	-----MTSKVLEVLPGLYWVGVMQDYELKNYDVLYPAPY-GSTY
EhFDP3	-----MQNLAVKVDNLYWVGVFDLRLTFDVIIPTPF-GTTY
EhFDP4	-----MTLKALKVCENLYWVGALDNDLRVFDIIMSTPY-GTSY
CaFDP2	-----MPALKIKDNIFSVGVINPSLRIFDIIMKTEY-GTSY
MtFDP	-----MSQPVALTGTYWVGAVDWNTRYFHGPAFSTHRGTTY
DvFDP	-----MHPTEIKKDLFWVGVDHNSRDFHGYSLSPQ-GTTY
DgFDP	-----MQATKLIIDGFHLVGAIDWNSRDFHGYTLLSPM-GTTY
GlFDP	-----MSSKPKYVQDQEMIPGVYWVGIVDMMVRIFHGYHTDEG--SSY
TvFDPPh	MLSTSSARSES ALDLGVTKVADDVLWIGVNDWDLREFHSMQSPVG--TSY
	=====**=====
EhFDP1	NSFLIKSEKGNVLFETCKENFAGECLERIEDVIGKEGK-LDYIVLNHTEP
EhFDP2	NSYLIQIQEGNVLFETVKQEFANECCLKIEQVIGKEDC-IDYIIVDHSSE
EhFDP3	NSFLITINDGNVLFETVKPEFYQHHLERIENTENVIGKKGQ-TNYIILNHTEP
EhFDP4	NSFLITISEGNLFEFTVKENFAQECLSRVIDVIGESGK-IDYIVCNHTEP
CaFDP2	NAYLIKGGK-NVLIIDTVHGRFDEYLENFKSVIIP-SS-IDYVIMNHCEP
MtFDP	NAYLIVDDK-TALVDTVYEPFKEELAKLKQIKDP-VK-LDYLVVNHTEP
DvFDP	NAYVVKDEK-TVLFDTVKHDFTDTMLCRISRVVPEP-CK-IDYIVCNHLEP
DgFDP	NAYLVEDEK-TTLFDTVKAELYKGEELCGIASVIDP-KK-IDYIIVQHLEP
GlFDP	NSYFIIDDEC-PTVIDSVKYPFAEELSRIAACCPD-DK-IKYVVMNHAE
TvFDPPh	NSYLIQSSE-PTIVDAVKYTMASHAWIDRLKSLGGDDLKGIKRIIVQHAEP
	**=====
EhFDP1	DHSGSIVHILEKYPEATVIGTMAALNNIKYIGHIKENTKTLNSGKIKTLD
EhFDP2	DHSGSISPTLKRYPNATVIASAAALNNIQFIGHIRDDTKTINSVKTQQLN
EhFDP3	DHSGSINHILEKYPNATIATVAALNNLKFISHLSPPEVTKVCSIKLKSLQ
EhFDP4	DHSGSIVHILEKFPQATVIATFAALTNIKYIGHITKTKTKTIDSTKKNQFK
CaFDP2	DHSGSIARLYEVAQIKVIASNAGKIYLNITNKETLDVKAVKTN-DTLD
MtFDP	DHAGAFPATMELCPDAHVLCTQRAFDSLKAHYSHIDFNYTIVKGTG-TSVS
DvFDP	DHAGALPELILARCKPEKIFCSPMGLKAMEAHFDTTGWPVEVVKGTG-DSIS
DgFDP	DHAGALPALIEACQPEKIFTSLSLQKAMESHFHYKDWPVQVVKHG-ETLS
GlFDP	DHASSIKDHYHKEITNATFVCTKKCQEHKILYGMKATWLVVDDK-YTLK
TvFDPPh	DHSSGTAMLVKEAPHIEVVMIKQCYNTMARFYDVSKWNVKIVKLG-EKIN
	=====
EhFDP1	IGN-YHLKFLIQPFLHWPDTMMTVIEEMKVLVSCDVFQGHYADERVFNDDQ
EhFDP2	IGD-IHLKFLIQPFLHWPDTMTLIEEMNVLVTCDFSTHFADETRMFDL
EhFDP3	VGE-YHLKFLIQPFLHWPDTMMTVIEELKILLPCDFFAVHYAEPKLFDDQ
EhFDP4	IGQ-YILNFFIQPFLHWPDTMMTVIPELKVLLPCDFVGAHCA DPRVFENDE
CaFDP2	IGNGVLKFAIAPFLHWPDSMFTILEEDKIAFTCDFLGCHECEPRMFDTK
MtFDP	IGK-RSLTFIEAPMLHWPDSMFTYVPEEALLPNDAFGQHIATSVRFDQ
DvFDP	IGK-RTLHFVETRMHLHWPDSMVSYPEDKLLICNDAFGQNIASSTERYADE
DgFDP	IGK-RTVTFYETRMHLHWPDSMVSWFADEKVLISNDIFGQNIASERFSQ
GlFDP	IGK-RTLKFLPVPLHWPDSFTFYCPEDKILFSDGFGQHYATSRRWADE
TvFDPPh	IGD-RVAVMAGVPMHWPESAVTYLPAQKILFSSDFGQHIASNKRFVDE
	=====
EhFDP1	MMERIKDMDAYKHYFDCIFGPFKNYVIKGLDMIEQMGFPSPDELKAICC
EhFDP2	IVDRKDQYLQISYDYFNSVFGPFKRFVLKGIQTLENQPGFDLKNCKAICC
EhFDP3	IEGKEHIFKLYRHYFDVMSPFKSSVLKGVQLVETQMGFPVEELQVICC
EhFDP4	MTDRIKDLDAYKHYFDCIFGPTYTSFVLKGINILENDIGFPVDELKAICC
CaFDP2	IT-YMPKYKSEKYYDAIESPFKPYVVKGLDILDALD-----LDFIAT
MtFDP	VD--AGLIMDEAAKYYANILMPFENLITKKLDEIQKIN----LAKTIAP
DvFDP	ID--RSALFHAMKEYYHNIVLPSPIVLKTLAQIEQLG----LDIDMLAP
DgFDP	IP--VHTLERAMREYYANIVNPNYAPQTLKALETIVGAG----VAPEICP
GlFDP	CD--VSHVMHLKEYTANILGLFSAQMRKALEVASTVE-----IKYILS
TvFDPPh	VD--QGLFLTEIKSYANILQRLGKPVKALATASKLPG-----LDIVLP
	==*=====] [==== Tipo flavodoxina ===
EhFDP1	SHGPIVLR--THIKENIERYRQWAQPIA-LKNKVVIAVGSAYGYTQKMAEQ

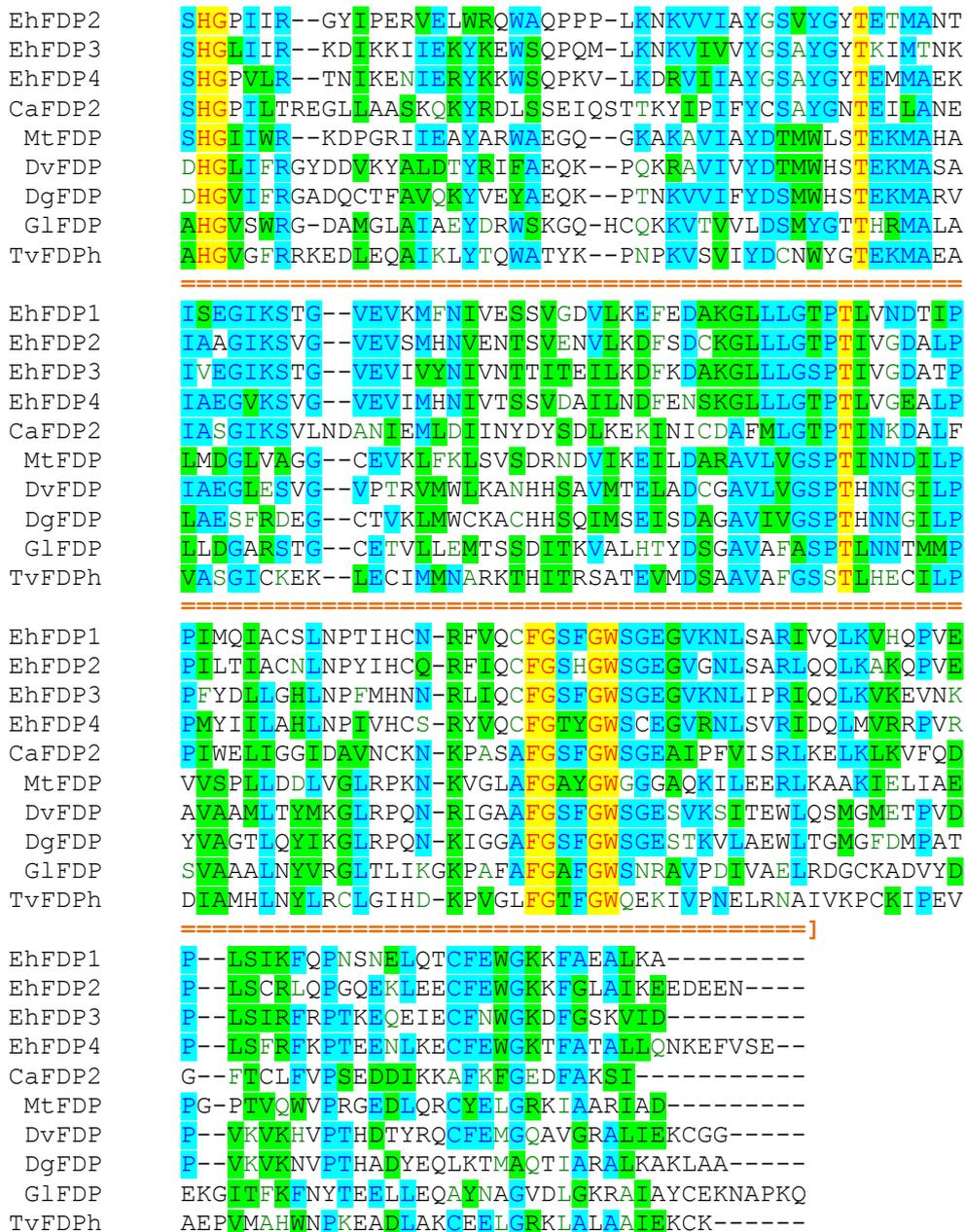


Figura 4.1.14: Alineamiento de las secuencias primarias de distintas FDPs. Eh: *Entamoeba histolytica*; Ca: *Clostridium acetobutylicum* (Q97GC0); Mt: *Moorella thermoacetica* (Q9FDN7); Dv: *Desulfovibrio vulgaris* (Q726B7); Dg: *Desulfovibrio gigas* (Q9F0J6); Gl: *Giardia lamblia* (Q86QZ1); Tv: *Trichomonas vaginalis* (Q6XKE2). Entre paréntesis se indica el código de identificación UniProt. Los * indican los residuos participantes de unir los átomos de hierro del dominio tipo-β-lactamasas. Se indican las posiciones de los dominios presentes en estas enzimas (tipo-β-lactamasas y tipo-flavodoxinas). En rojo se resalta el péptido N-terminal de direccionamiento al hidrogenosoma de la FDP de *T. vaginalis*. Todas las FDPs del alineamiento fueron confirmadas experimentalmente.

4.1.10. Expresión y estudios bioquímicos de la EhFDP1.

La información presente en la base de datos AmoebaDB indica que el gen *ehfdp1* (EH15A_235560) tiene 1221 pb y codifica para una proteína (*EhFDP1*) de 406 aminoácidos, con un masa molecular calculada de 46,028 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,24.

Con el objetivo de obtener la proteína en forma recombinante se diseñaron cebadores específicos que poseían los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I (marco de lectura +1). La secuencia codificante para la proteína fue amplificada a partir de ADN genómico mediante PCR. El producto de la reacción se ligó al vector pGEM-T *Easy* y la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competente de *E. coli* Top10 utilizando el método del CaCl₂. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico, a partir de clones individuales, confirmándose la identidad del gen por secuenciación. Finalmente, se preparó el sistema de expresión en base al vector pRSET-A y a las células *E. coli* BL21(DE3). La *EhFDP1* se expresó en forma soluble. Las condiciones finales elegidas para la producción de la enzima recombinante se detallan en la tabla 4.1.7.

Condiciones de expresión <i>EhFDP1</i>	
Cepa	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Plásmido	pRSET-A
Medio	<i>Lysogeny broth</i> (LB)
Suplemento	23 µg/L Citrato férrico amoniacal 100 µM Riboflavina
DO (al inducir)	0,6
Inductor	0,5 mM IPTG
Temperatura de inducción	28 °C
Tiempo de inducción	16 h

Tabla 4.1.7: Condiciones de expresión para la *EhFDP1*.

El proceso de purificación se realizó cromatográficamente (IMAC) a 8 °C con una columna *HiTrap chelating* de 1 ml (GE) cargada con Ni²⁺, utilizando un dispositivo *ÄKTApriime plus* (GE). Las fracciones coloreadas (anaranjado tenue) se unificaron y concentraron por ultrafiltración. Finalmente la proteína se acondicionó y se conservó alicuotada a -80 °C. Como se aprecia en la figura 4.1.15-A, el proceso de purificación resultó en una pureza superior al 90 %.

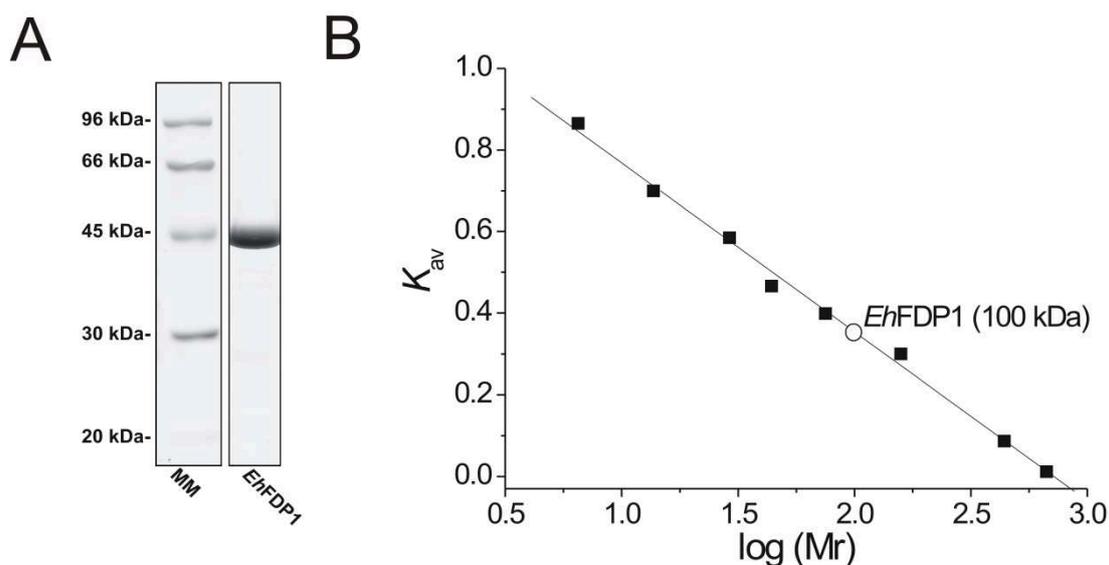


Figura 4.1.15: A) Análisis electroforético por SDS-PAGE de la EhFDP1 purificada. La etiqueta MM indica los patrones de masa molecular. B) Análisis por cromatografía de filtración por geles en una columna Tricorn Superdex 200 HP. Gráfico de K_{av} vs $\log (M)$: (■) proteínas patrones (○) proteína recombinante. Todas las proteínas patrones pertenecen a GE (Filtration Calibration Kit): Tiroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Aldolasa (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Ribonucleasa A (13,7 kDa) y Aprotinina (6,5 kDa).

En geles SDS-PAGE reductores, la EhFDP1 migró como una única banda de ~ 45 kDa (figura 4.1.15-A). Cuando se analizó la estructura cuaternaria de la enzima, mediante cromatografía de filtración por geles, la misma se comportó como un dímero (~ 100 kDa), lo que va en línea con los datos estructurales reportados para otras FDPs (figura 4.1.15-B) (Di Matteo y col., 2008; Vicente y col., 2008). A su vez, se comprobó que la proteína recombinante contenía $2,3 \pm 0,2$ mol Fe / subunidad, indicando que los sitios metálicos se encuentran con ocupación plena.

Mediante espectroscopia UV-visible se pudo comprobar la presencia de flavina en la EhFDP1. En la figura 4.1.16-B se muestran los espectros de absorción para la proteína oxidada y reducida, los cuales exhiben un perfil similar al de las FDPs bacterianas (picos a 457 y 380 nm). Luego de liberar la flavina por tratamiento térmico, un análisis de cromatografía en capa delgada indicó que la EhFDP1 contiene FMN como grupo prostético (figura 4.1.16-A). El contenido de flavina de la proteína recombinante resultó ser de $1,1 \pm 0,1$ mol de FMN / subunidad.

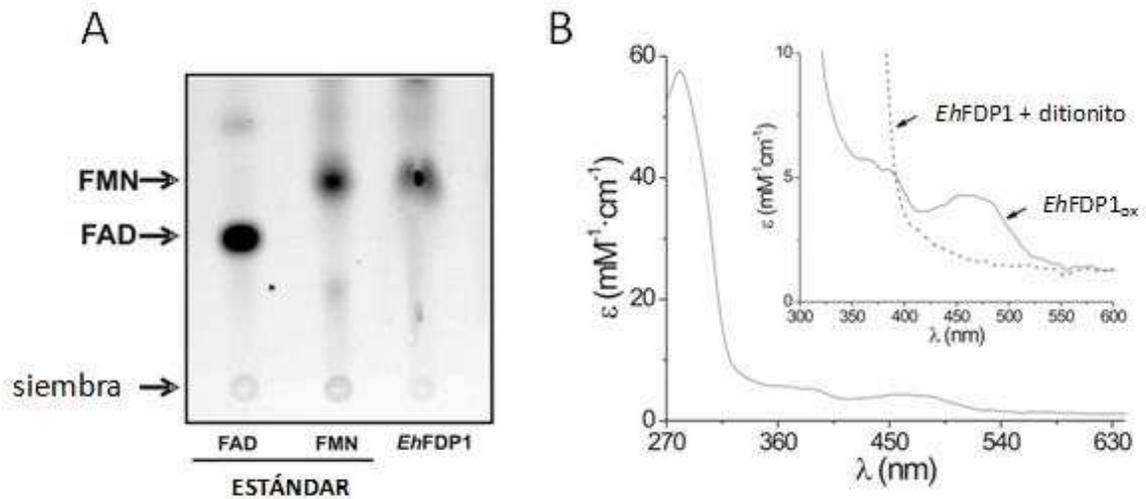
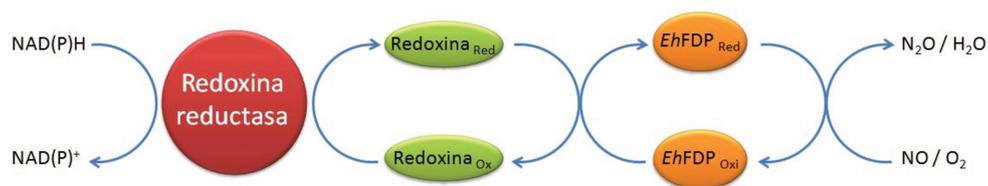


Figura 4.1.16: **A)** Determinación por TLC del tipo de flavina presente en la EhFDP1. La placa fue revelada en un escáner de fluorescencia Typhoon. **B)** Espectro de absorción UV-visible de la EhFDP1 purificada (25 °C y pH 7,0). Cuadro interior: Línea continua: EhFDP1 oxidada; línea de trazos: EhFDP1 + 100 μM de ditionito de sodio.

4.1.11. Análisis de las capacidades catalíticas de la EhFDP1.

Para entender la forma en que la EhFDP1 está conectada al metabolismo energético del parásito, evaluamos a las EhFd1-2 (sección 4.1.12) como posibles reductores fisiológicos. A su vez, a modo de comparación con los sistemas anaerobios clásicos, también empleamos la PfRd. En cada caso, las redoxinas fueron regeneradas utilizando una reductasa dependiente de NAD(P)H (PsFNR para las EhFd1-2 y NROR de *Thermotoga maritima* para la PfRd). En una primera instancia, bajo condiciones aerobias, se estudió la actividad O_2 reductasa de la EhFDP1. La figura 4.1.17 muestra que las Fds amebianas son capaces de transferir equivalentes de reducción, hacia la EhFDP1, con mayor eficiencia que la PfRd. La reducción de la EhFDP1 por parte de las Fd amebianas siguió una cinética hiperbólica. Por el contrario, la reducción de la enzima por parte de la PfRd no exhibió una cinética de saturación. En la tabla 4.1.8 se listan los parámetros cinéticos calculados. Es interesante observar que la ferredoxina de arveja se comportó de manera similar a las amebianas. En cambio, no se detectó actividad enzimática cuando se empleó la flavodoxina de *E. coli* como sustrato reductor. En su conjunto, estos resultados indican que la EhFDP1 se comporta de manera distinta a sus homólogos bacterianos, con una marcada preferencia por utilizar ferredoxinas en lugar de rubredoxinas. Este hecho podría entenderse como una adaptación de la enzima (adquirida por THG) al contexto metabólico del parásito.



Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
O_2 ~200 μM	<i>EhFd1</i>	$2,3 \pm 0,2$	716 ± 30	$5,2 \cdot 10^6$
	<i>EhFd2</i>	$3,0 \pm 0,3$	852 ± 42	$4,7 \cdot 10^6$
	<i>PfRd</i>	>10 μM	No Determinado	$8,0 \cdot 10^4$
<i>EhFd1</i> 10 μM	#NO•	102 ± 12	$17,2 \pm 0,6$	$2,8 \cdot 10^3$

Tabla 4.1.8: Esquema y parámetros cinéticos para la EhFDP1 a pH 7,0 y 30 °C. # Compuesto generado con MAHMA NONOato.

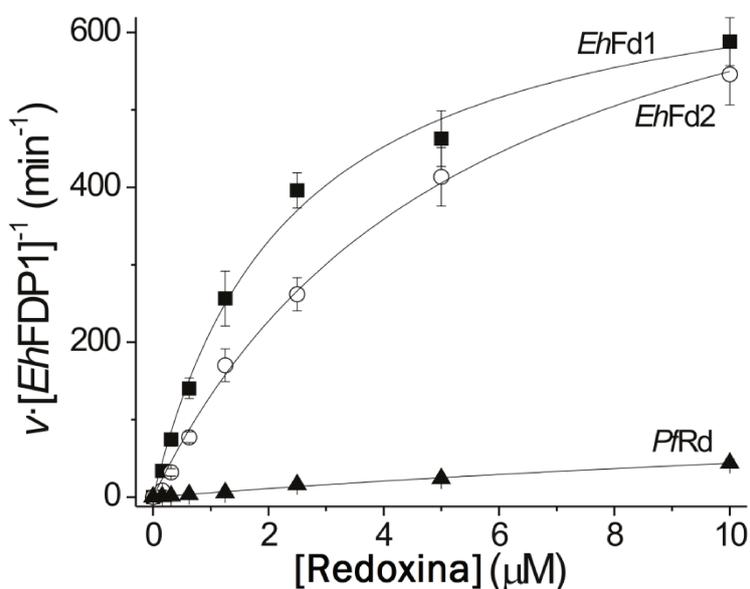


Figura 4.1.17: Reducción de la EhFDP1 por las Fds amebianas y la PfRd. La reducción de la EhFDP1 fue evaluada por medición de su actividad O_2 reductasa, utilizando diferentes proteínas redox como sustratos, bajo condiciones aerobias. El ensayo se realizó monitoreando la oxidación del NAD(P)H a 340 nm, a pH 7, 30 °C y 0,05 – 0,5 μM EhFDP1, con diferentes sistemas reductores: (■) 300 μM NADPH, 1 μM PsFNR y 0,1-10 μM EhFd1; (●) 300 μM NADPH, 1 μM PsFNR y 0,1-10 μM EhFd2 o (▲) 300 μM NADH, 1 μM TmNROR y 0,1-10 μM PfRd.

Dado que la capacidad de ciertas FDPs bacterianas para reducir óxido nítrico ha sido bien documentada (Vicente y col., 2008), decidimos probar la actividad NO• reductasa de la EhFDP1, utilizando la EhFd1 como sustrato reductor. El NO• fue generado químicamente utilizando MAHMA-NONOato como donador. A diferencia de las FDPs de *G. lamblia* (Di Matteo y col., 2008) y *T. vaginalis* (Smutna y col., 2009), la EhFDP1 demostró tener la capacidad de reducir NO• (k_{cat} $17,2 \pm 0,6 \text{ min}^{-1}$).

proteínas revela que las *EhFd1*, 3 y 4 tendrían dos centros tipo [4Fe4S], mientras que la *EhFd2* contaría con un centro tipo [4Fe4S] y otro tipo [3Fe4S]. Esto se debería a que en esta isoforma, un residuo de treonina sustituye a una de las cisteínas quelantes del segundo centro. La *EhFd3* posee una extensión N-terminal que podría constituir una señal de direccionamiento, sin embargo ninguno de los predictores utilizados detectó la presencia de un péptido señal (figura 4.1.19). Por último, las ferredoxinas generalmente son proteínas ácidas, lo que se cumple para las isoformas 1,2 y 4 (pI: 4.12, 4.40 y 4.65 respectivamente) pero no para la *EhFd3* que tiene un punto isoeléctrico teórico de 8.09.

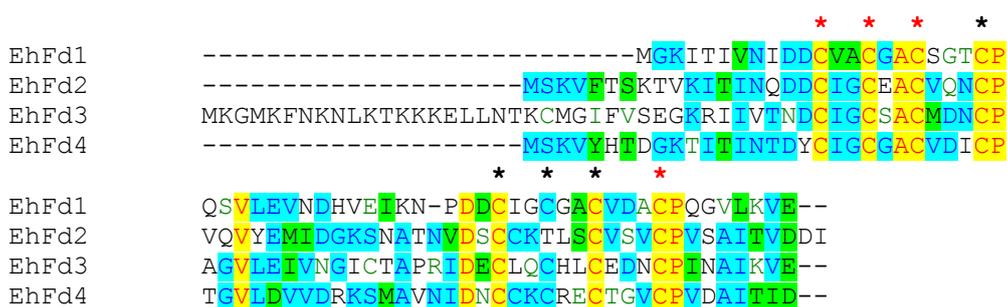


Figura 4.1.19: Alineamiento de las ferredoxinas presentes en *E. histolytica*. Los * indican las cisteínas participantes de la unión del primer centro de Fe-S y los * indican las cisteínas involucradas en la formación del segundo centro de Fe-S.

En diferentes organismos, particularmente en bacterias anaerobias, las ferredoxinas con centros 2[4Fe4S] cumplen con una gran cantidad de funciones, al actuar como transportadores electrónicos de bajo potencial de reducción. Son, por este motivo, las proteínas con centros de Fe-S más versátiles conocidas. Como se comentó en la sección 1.13.5-6, las ferredoxinas juegan un papel central en el metabolismo energético de *E. histolytica* ya que actúan como aceptores electrónicos durante el paso de decarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA (Reeves, 1984). Esa importancia se ve reflejada por su cantidad relativa, por ejemplo, se ha reportado que el ARNm de la *EhFd1* es tan abundante como el de la actina (Reeves y col., 1980). Por otra parte, el hierro presente en las ferredoxinas constituye entre un 10 y un 20% del hierro celular total (Reeves y col., 1980).

Para estudiar los procesos en los que podrían estar involucradas, se clonaron las secuencias codificantes para las ferredoxinas 1 y 2. La información presente en la base de datos AmoebaDB indica que el gen *ehfd1* (EHI5A_055540) posee 180 pb y codifica para una proteína (*EhFd1*) de 59 aminoácidos, con un masa molecular calculada de 6,052 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 3,93. Por otro lado, el gen *ehfd2* (EHI5A_067050) tiene 210 pb y codifica para una proteína (*EhFd2*) de 69 aminoácidos, con un masa molecular calculada de 7,368 kDa y un punto isoeléctrico

teórico de 4,22. Se diseñaron cebadores específicos para ambos genes incluyendo en los mismos los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III (marco de lectura +1). Las secuencias codificantes para las proteínas fueron amplificadas a partir de ADN genómico mediante PCR. Los productos de las reacciones se ligaron al vector pGEM-T *Easy* y las mezclas de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes de *E. coli* Top10 utilizando el método del CaCl₂. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico, a partir de clones individuales, y las secuencias esperadas para los insertos fueron confirmadas por secuenciación total. Finalmente, se utilizaron los sitios de restricción incluidos en los cebadores para sub-clonar los insertos en el vector pET-28a y transformar con dichas construcciones, mediante el método de CaCl₂, células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Mediante ensayos de expresión se comprobó que las proteínas se expresaban en forma soluble. Las condiciones finales elegidas para la producción de las ferredoxinas amebianas recombinantes se resumen en la tabla 4.1.10.

Condiciones de expresión <i>EhFds</i>	
Cepa	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Plásmido	pET-28a
Medio	<i>Lysogeny broth</i> (LB)
Suplemento	23 µg/L Citrato férrico amoniacal
DO (al inducir)	0,6
Inductor	0,5 mM IPTG
Temperatura de inducción	28 °C
Tiempo de inducción	16 h

Tabla 4.1.10: Condiciones de expresión de la *EhFds*.

El proceso de purificación se realizó mediante IMAC a 8 °C con una columna *HiTrap chelating* de 1 ml (GE) cargada con Ni²⁺, utilizando un dispositivo *ÄKTAprime plus* (GE). Las fracciones coloreadas (marrón tenue) se unificaron y concentraron por ultrafiltración. Finalmente las proteínas se acondicionaron y se conservaron alícuotadas a -80 °C. Como se aprecia en la figura 4.1.20-A, el proceso de purificación resultó en una pureza superior al 90 % en ambos casos.

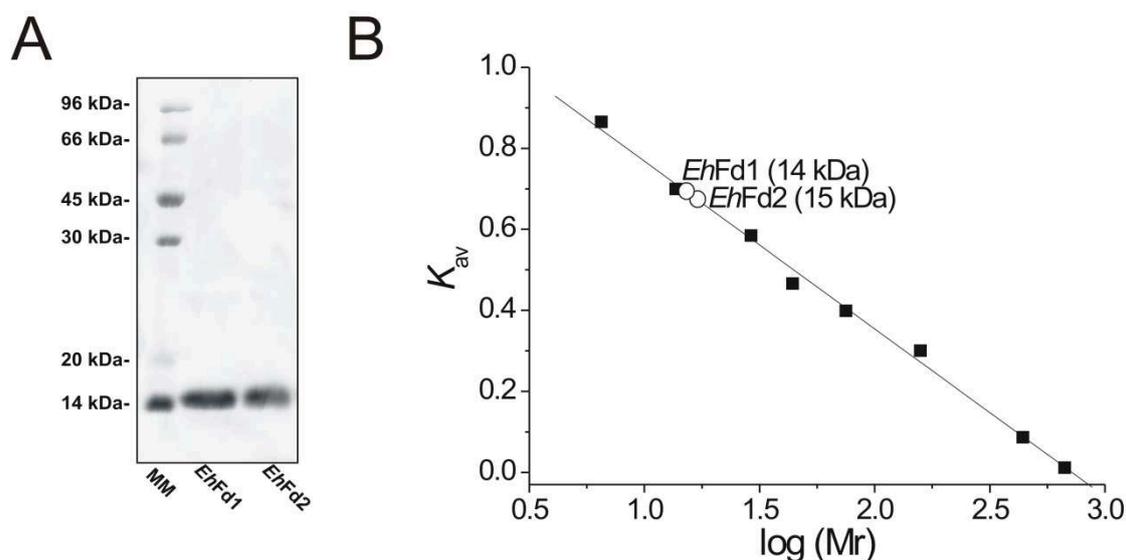


Figura 4.1.20: A) Análisis electroforético por SDS-PAGE de la EhFd1 y EhFd2 purificadas. La etiqueta MM indica los patrones de masa molecular. **B)** Análisis por cromatografía de filtración por geles en una columna Tricorn Superdex 200 HP. Gráfico de K_{av} vs log (M): (■) proteínas patrones (○) proteínas recombinantes. Todas las proteínas patrones pertenecen a GE (Filtration Calibration Kit): Tiroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Aldolasa (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Ribonucleasa A (13,7 kDa) y Aprotinina (6,5 kDa).

Considerando la masa agregada por las etiquetas de histidinas presentes en ambas proteínas recombinantes, sus pesos moleculares esperados son de 8,1 y 9,4 kDa. En geles SDS-PAGE reductores, ambas ferredoxinas migraron de forma anómala como una única banda de ~ 14 kDa (figura 4.1.20-A). Se presume que este comportamiento se debe a su bajo punto isoeléctrico. Estas proteínas al ser pequeñas, tienen una alta densidad de carga positiva y pocos sitios de unión para el detergente, como resultado migran menos y aparentan pesos moleculares mayores. Cabe destacar que el mismo comportamiento se ha reportado para una ferredoxina de 9,8 kDa de *T. vaginalis* (pI: 4,0) la cual migra con peso molecular aparente de 14 kDa (Vidakovic y col., 1996).

Cuando se analizó la estructura cuaternaria de las proteínas, mediante cromatografía de filtración por geles, la EhFd1 y la EhFd2 eluyeron en volúmenes que se corresponden con masas moleculares de 14 y 15 kDa respectivamente. Estas masas están cercanas a las esperadas para un dímero (figura 4.1.20-B). Sin embargo, en un estudio previo, una ferredoxina de *E. histolytica* purificada de fuente, pero no identificada (probablemente la EhFd1 por su abundancia), presentó un comportamiento anómalo durante la filtración por geles (Reeves y col., 1980). Para solucionar la inconsistencia, los autores del trabajo utilizaron ferredoxinas de estructuras cuaternarias conocidas para recalibrar la columna, y concluyeron entonces

que la proteína se comportaba como un monómero. Considerando este informe, es presumible que tanto la *EhFd1* como la *EhFd2* sean proteínas monoméricas.

Como se muestra en la figura 4.1.22, los espectros de absorción de la *EhFd1* y la *EhFd2* exhiben un hombro entre los 380 y los 500 nm, lo cual es característico de las ferredoxinas con centros de [4Fe4S] o [3Fe4S] (Busch y col., 2000). En ambos casos, luego del agregado de ditionito de sodio (en una proporción 1:100), se observó una disminución del 50% en la intensidad del hombro, indicando que se produjo la reducción química de los centros de Fe-S (no mostrado).

4.1.13. Susceptibilidad de *EhFd1* y *EhFd2* a especies reactivas.

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el NO[•], liberado por los macrófagos activados, desempeña un papel crítico en la eliminación de trofozoítos de *E. histolytica* (Lin y Chadee, 1992; Lin y col., 1994). También se ha reportado que la viabilidad de los parásitos se ve comprometida cuando son incubados con donadores de NO[•] como, por ejemplo, el nitroprusiato de sodio. En este caso se observó el desencadenamiento de un mecanismo de muerte celular semejante a la apoptosis (Ramos y col., 2007). Análisis bioquímicos evidenciaron que enzimas claves del metabolismo energético, como la PFOR y las ADHs, son fuertemente inhibidas por acción del NO[•], lo que llevaría a una disfunción de la vía glicolítica y finalmente a la muerte celular (Santi-Rocca y col., 2012). Una de las principales formas en que el NO[•] ejerce sus efectos tóxicos es a través de su reacción con proteínas que contienen centros de Fe-S, los cuales son particularmente sensibles a este radical. A pesar de esto, no todos los centros Fe-S son igualmente afectados por el NO[•], el deterioro de los mismos es dependiente del entorno proteico en donde se encuentren (Cooper, 1999).

Como se mencionó anteriormente, las ferredoxinas son unas de las proteínas más abundantes dentro del parásito. Por este motivo, nos interesó evaluar la acción del NO[•] sobre sus centros de Fe-S y el consecuente efecto sobre su capacidad de transferencia electrónica. A modo de comparación se empleó H₂O₂ como compuesto oxidante. Las *EhFd1-2* se sometieron al donador de NO[•] (MAHMA NONOato) o H₂O₂ en una relación 1:10 a pH = 7 y 30 °C, durante 30 min. Como control se incubaron ambas proteínas sin aditivos y en las mismas condiciones experimentales. Luego de desalar, para remover el exceso de reactivos, se evaluaron los espectros de absorción y la actividad redox remanente (acoplándolas a la reacción catalizada por la *EhFDP1*). Como se aprecia en la figura 4.1.21, las ferredoxinas tratadas con NO[•] presentan una marcada disminución en su capacidad de transferencia electrónica.

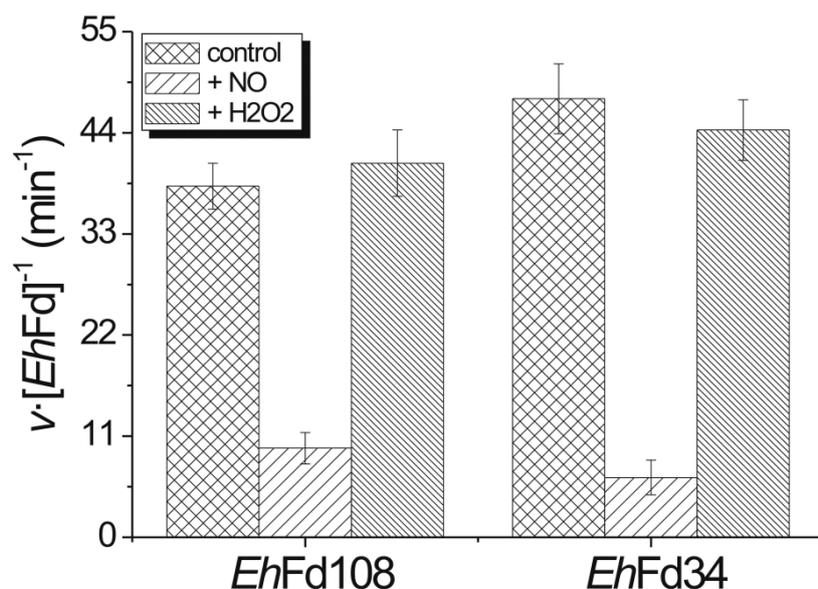


Figura 4.1.21: Actividad redox de las Fds amebianas (transferencia hacia la EhFDP1) luego de su incubación con NO* (usando MAHMA NONOato) o H₂O₂. Los ensayos se realizaron en condiciones aerobias monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm, a pH 7, 30 °C con 1 μM EhFDP1, 300 μM NADPH, 1 μM PsFNR y 0,1-10 μM EhFdp1 o EhFdp2 tratadas. Como control se incubaron las Fds en iguales condiciones pero sin exposición al MAHMA NONOato o H₂O₂.

Los cambios observados en sus espectros UV-visibles denotan que la estructura de sus centros de Fe-S se modificó y probablemente esta sea la causa de su inactivación (figura 4.1.22). Por el contrario, el H₂O₂ no causó modificaciones significativas, ya sea en los espectros o en la capacidad redox de las proteínas (figura 4.1.21 y 22). La modificación más común sobre los centros de [4Fe-4S], a causa del NO*, suele ser la formación de complejos de dinitrosil-hierro (DNICs) con la consecuente modificación del espectro de absorción (Tonzetich y col., 2010). En el caso del H₂O₂, si el daño es moderado, se produce la pérdida de uno de los átomos de hierro y el centro se convierte en [3Fe4S] (Djaman y col., 2004). Estos centros poseen un espectro UV-visible similar al del centro original, por otra parte, la función fisiológica puede verse afectada (o tal vez no). De este modo, el resultado obtenido con el H₂O₂ no necesariamente indica que no se haya producido una modificación estructural del centro de Fe-S, ya que la misma podría ser no observable mediante las técnicas empleadas.

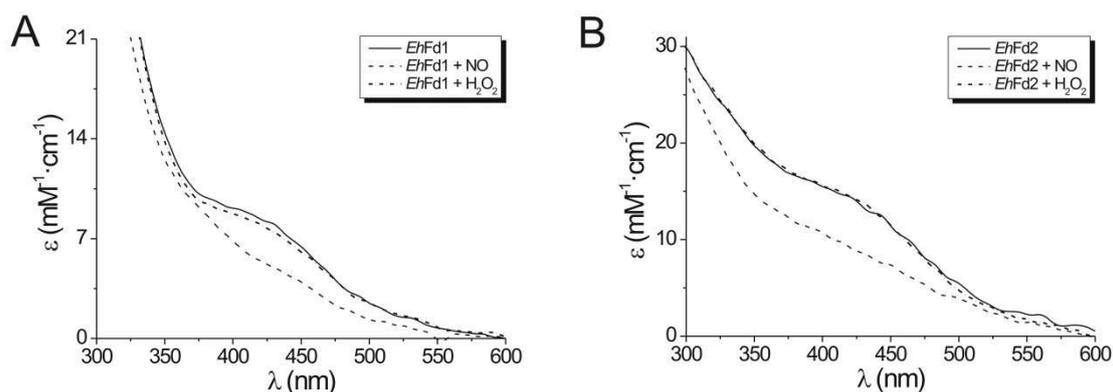


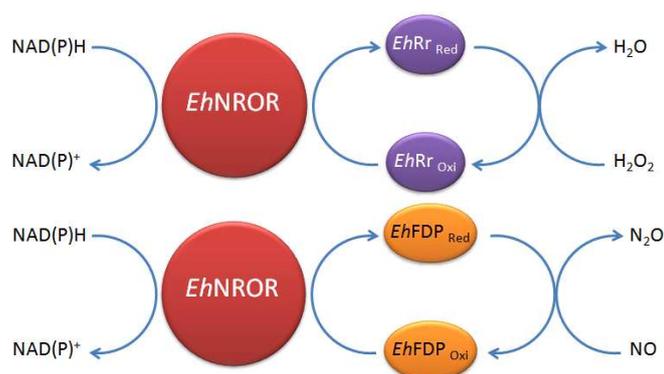
Figura 4.1.22: Sensibilidad de las Fds amebianas al H_2O_2 y NO^\bullet . Espectros UV-visible de las Fds amebianas (A) EhFd1 y (B) EhFd2 al ser incubadas con NO^\bullet (usando MAHMA NONOato) o H_2O_2 en relación 1:10, a pH 7 y 30 °C por 30 min. Como control las Fds fueron incubadas, sin aditivos, en iguales condiciones.

Dada la abundancia celular de las ferredoxinas es arriesgado aseverar que la formación de DNIC en ellas cause una disfunción en el flujo glicolítico, es más factible que sean otras enzimas de esa vía las que se vean afectadas. El NO^\bullet dentro de la célula puede tener varios destinos, entre ellos, ser detoxificado por enzimas específicas (ej. a través de las FDPs) o reaccionar con las biomoléculas (Robinson y Brynildsen, 2013). Este último caso puede representar un mecanismo de defensa *per se* cuando las moléculas afectadas no son esenciales o cuentan con mecanismos de reparación eficientes. En consecuencia, como se discutirá en la sección 4.1.18.3, se podría argumentar que este sistema podría representar una forma de resistencia en situación de estrés nitrosativo. De todas formas, para poder interpretar la relevancia de este resultado, en un contexto fisiológico, se necesitan realizar experiencias accesorias.

4.1.14. Estudio de la capacidad de la EhNROR de reducir a la EhRr y EhFDP1.

Como se explicó anteriormente (sección 4.1.6), la EhNROR no evidenció actividad ferredoxina, flavodoxina o tiorredoxina reductasa, aparentando ser específica para la reducción de rubredoxinas, aunque esta proteína no se encuentre presente en el parásito. A la luz de estos resultados, nos planteamos la posibilidad de que la EhNROR pudiese actuar de forma directa sobre las enzimas efectoras finales, evitándole al parásito la necesidad de contar con una rubredoxina. Para probar esta hipótesis, se evaluó la actividad peroxidasa (de la EhRr) y la actividad NO^\bullet reductasa (de la EhFDP1), utilizando a la EhNROR como donante de los equivalentes de reducción provenientes del NAD(P)H. No se ensayó la actividad O_2 reductasa de la

EhFDP1 debido a que la *EhNROR* posee la misma actividad intrínseca y de esta forma interfiere en la medición. En condiciones microaerofílicas, la *EhNROR* fue capaz de reducir a la *EhRr* y a la *EhFDP1*, sin la necesidad de utilizar una redoxina mediadora. Las reacciones presentaron una actividad máxima a pH 7 y siguieron una cinética de Michaelis-Menten. Las eficiencias catalíticas para la reducción de ambas proteínas, por parte de la *EhNROR*, fueron similares (tabla 4.1.11). A su vez, no se observaron diferencias en los parámetros cinéticos cuando se empleó NADH o NADPH como fuente inicial de poder reductor. Finalmente, a modo de control, no se detectó actividad enzimática cuando alguno de los componentes de la mezcla de reacción fue omitido.



Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
NADPH 300 μM	<i>EhRr</i> [#]	0,45 \pm 0,03	264 \pm 23	9,8 $\cdot 10^6$
	<i>EhFDP1</i> [*]	0,39 \pm 0,03	51 \pm 1	2,2 $\cdot 10^6$
NADH 300 μM	<i>EhRr</i> [#]	0,50 \pm 0,02	262 \pm 21	8,7 $\cdot 10^6$
	<i>EhFDP1</i> [*]	0,40 \pm 0,06	42 \pm 2	1,7 $\cdot 10^6$

Tabla 4.1.11: Esquema y parámetros cinéticos de la *EhNROR* a pH 7 y 30 °C. [#]Actividad peroxidasa con 25 μM H_2O_2 . ^{*}Actividad NO^+ reductasa con 1 mM MAHMA NONOato.

Como se mencionó anteriormente, al comparar la secuencia primaria de la *EhNROR* con la de ortólogos caracterizados bioquímicamente, se observó que la enzima de ameba presenta una extensión N-terminal. Esta región presenta homología con un plegamiento tipo-rubredoxina. No es extraño encontrar en la naturaleza este tipo de fusiones, donde ambos dominios representan proteínas que en otros organismos interactúan física o metabólicamente. Por ejemplo, un caso particular es la FDP de *E. coli*, que posee en su extremo N-terminal un dominio rubredoxina funcional (Gomes y col., 2002). En nuestro estudio, la *EhNROR* producida de forma recombinante no incorporó átomos de hierro en su estructura.

Como primera aproximación para evaluar el papel que desempeña dicha región, se midió la capacidad de la proteína de transferir electrones a la *EhRr* luego de ser

expuesta a un exceso molar de EDTA (y posterior desalado). Como era de esperar, no se observaron cambios en la actividad enzimática con respecto a la enzima sin tratar. En segunda instancia, se diseñó una versión trunca de la *EhNROR* donde se eliminaron sus primeros 47 aminoácidos (sección 4.1.1 y 2). La actividad NADPH oxidasa de la *EhNROR* Δ 47N ($130 \pm 5 \text{ min}^{-1}$ a pH 7 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$) permaneció en valores similares a los medidos para la *EhNROR* ($120 \pm 3 \text{ min}^{-1}$ a pH 7 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$). Por el contrario, su habilidad de transferir electrones a la *EhRr* (figura 4.1.23) o a la *EhFDP1* se vio disminuida, ya que el valor de k_{cat} de la *EhNROR* Δ 47N fue dos veces menor que el de la *EhNROR*, para ambas reacciones. En cambio, la afinidad hacia la *EhRr* o la *EhFDP1* no se vio alterada por la eliminación de la extensión N-terminal de la *EhNROR* (tabla 4.1.12).

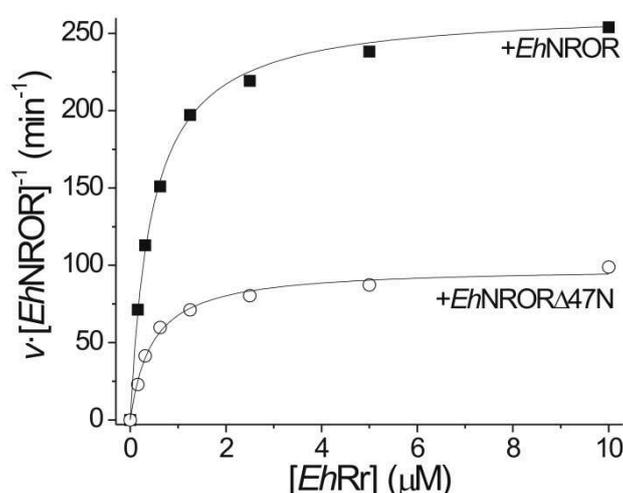


Figura 4.1.23: Cinética de la reducción directa de la *EhRr* por acción de la *EhNROR*. El ensayo se realizó en condiciones microaerobias (pH 7 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$) en presencia de $300 \text{ } \mu\text{M}$ NADPH, $25 \text{ } \mu\text{M}$ H_2O_2 , diferentes concentraciones de *EhRr* ($0,1$ a $10 \text{ } \mu\text{M}$) y (■) $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ *EhNROR* o (○) $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ *EhNROR* Δ 47N.

Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
NADPH $300 \text{ } \mu\text{M}$	<i>EhRr</i> [#]	$0,46 \pm 0,04$	99 ± 2	$3,6 \cdot 10^6$
	<i>EhFDP1</i> [*]	$0,44 \pm 0,03$	28 ± 2	$1,1 \cdot 10^6$

Tabla 4.1.12: Parámetros cinéticos de la *EhNROR* Δ 47N a pH 7 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$. [#]Actividad peroxidasa con $25 \text{ } \mu\text{M}$ H_2O_2 . ^{*}Actividad $\text{NO} \bullet$ reductasa con 1 mM MAHMA NONOato.

Finalmente, se realizó un ensayo de complementación *in vitro* sobre la actividad de transferencia electrónica de la *EhNROR* Δ 47N. Para esto se evaluó su capacidad de reducir a la *EhRr* cuando se incorporaba la *PfRd* a la mezcla de reacción en una relación molar 1:1. Como resultado se recompuso el valor original de la actividad enzimática de la *EhNROR* (figura 4.1.24). Por esto, a pesar que el extremo N-terminal de la *EhNROR* no está involucrado directamente en la transferencia de electrones (por la ausencia de hierro), cumple una función estructural necesaria. Es probable que su

presencia facilite el correcto posicionamiento de las proteínas interactuantes de modo tal que el paso de electrones se produzca más eficientemente. De todas formas, se debe tener en cuenta que la ausencia del cofactor metálico puede ser consecuencia de la incapacidad de la maquinaria celular, del huésped heterólogo, para incorporarlo.

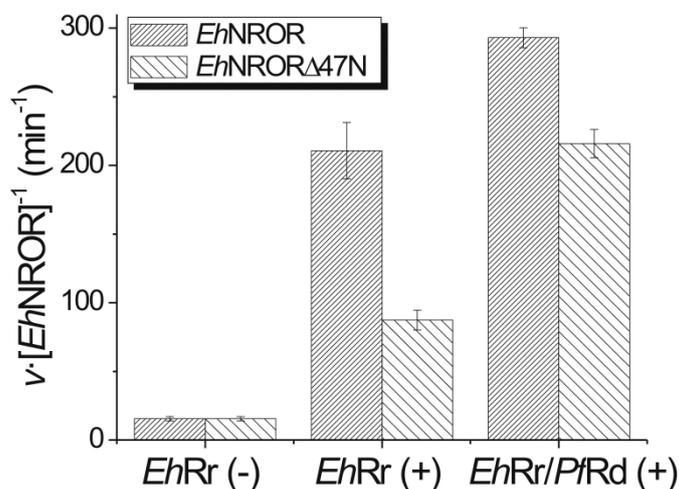


Figura 4.1.24: Complementación in vitro de la EhNRORΔ47N con la PfRd. Los ensayos se realizaron en condiciones microaerobias (pH 7 y 30 °C) en presencia de 300 μM NADPH, 25 μM H₂O₂, (con o sin) 5 μM EhRr, 0,1 μM EhNROR (o EhNRORΔ47N), (con o sin) PfRd 0,1 μM.

4.1.15. Profundización del estudio del efecto inhibitorio de las coenzimas oxidadas sobre la actividad oxidasa de la EhNROR.

En la sección 4.1.4 se evaluó la acción de distintos compuestos sobre la EhNROR (figura 4.1.7). Un resultado llamativo fue que las coenzimas oxidadas produjeron un efecto inhibitorio de la actividad oxidasa. Hasta donde sabemos, en la bibliografía consultada, no se ha reportado este tipo de comportamiento para otras NRORs caracterizadas. Por este motivo, se realizó un análisis más detallado de esta conducta.

En primer lugar, se evaluó la capacidad inhibitoria del NADP⁺ o el NAD⁺ sobre la actividad NAD(P)H oxidasa de la EhNROR, a concentraciones fijas del sustrato. Las titulaciones indicaron que, en general, la actividad NADH oxidasa no es muy sensible a las coenzimas oxidadas. Sin embargo, la actividad NADPH oxidasa resulto inhibible, especialmente por el NAD⁺ (tabla 4.1.13). Como control experimental, utilizando tio-NAD⁺, se pudo descartar que este comportamiento se deba a un artefacto, debido a una posible actividad transhidrogenasa de la EhNROR (la cual fue indetectable).

Co-sustrato	Sustrato ^{fijo}	Inhibidor ^{variable}	IC ₅₀ (μM)
O ₂ ~200 μM	NADH [#] 460 μM	NADP ⁺	>>1000
		NAD ⁺	1050
	NADPH [#] 90 μM	NADP ⁺	430
		NAD ⁺	0,5

Tabla 4.1.13: Determinación de los valores de IC₅₀ para la inhibición de la actividad NAD(P)H oxidasa de la EhNROR por acción de las coenzimas oxidadas. Cálculo realizado a concentraciones fijas de sustrato. [#] [Sustrato] / Km = 2,5

Este llamativo resultado generó interés por reevaluar la inhibición de la actividad NADPH oxidasa, a causa del NAD⁺, pero a concentraciones variables del sustrato. En este caso el perfil de inhibición fue similar al obtenido con anterioridad y, aparentemente, independiente de las concentraciones de NADPH (figura 4.1.25). Se comprobaría entonces que el NAD⁺ estaría actuando como un inhibidor no competitivo de la actividad NADPH oxidasa de la EhNROR. Este nuevo ensayo arrojó un IC₅₀ promedio de 0,23 ± 0,01 μM, el cual está muy cerca de la concentración de enzima utilizada en el ensayo (~0,1 μM). Esto indica que el NAD⁺ actúa como un inhibidor de alta afinidad, interactuando con la EhNROR casi en relación equimolar.

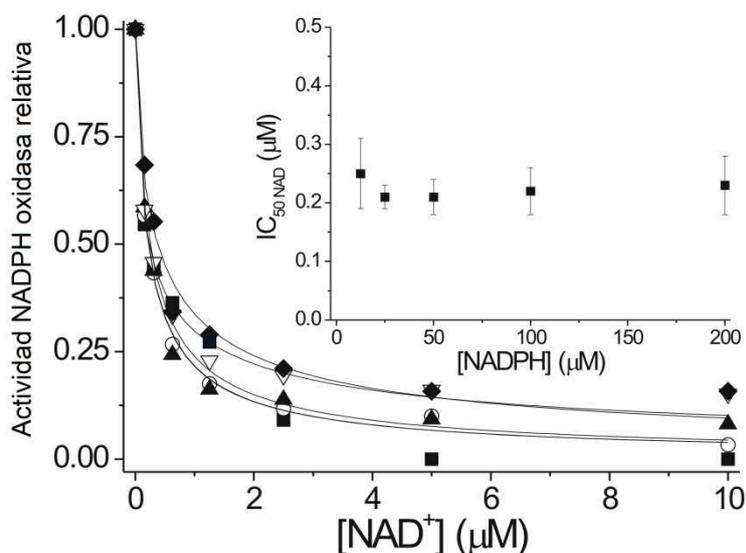


Figura 4.1.25: Curvas de inhibición de la actividad NADPH oxidasa de la EhNROR por acción del NAD⁺. Las curvas de titulación fueron realizadas bajo condiciones aerobias (pH 7 y 30 °C) con 0,1 μM EhNROR y diferentes concentraciones de NADPH: (■) 12,5 μM, (○) 25 μM, (▲) 50 μM, (▽) 100 μM y (◆) 200 μM. Cuadro interno: IC₅₀ NAD⁺ vs [NADPH].

Finalmente se planteó el interrogante de cuál sería el efecto del NAD⁺ sobre las otras actividades de transferencia electrónica identificadas en la EhNROR. Se evaluó si la presencia de la coenzima oxidada producía inhibición en la actividad ferricianuro reductasa, rubredoxina reductasa y en su capacidad de ceder electrones a la EhRr. En estos tres tipos de actividad se produce la reducción de un átomo de Fe³⁺, ya sea

acomplejado (ferricianuro) o formando parte de un centro metálico de una proteína (*PfRd* y *EhRr*). Ninguna de estas actividades se vio significativamente afectada por la presencia de NAD^+ ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$) (figura 4.1.26).

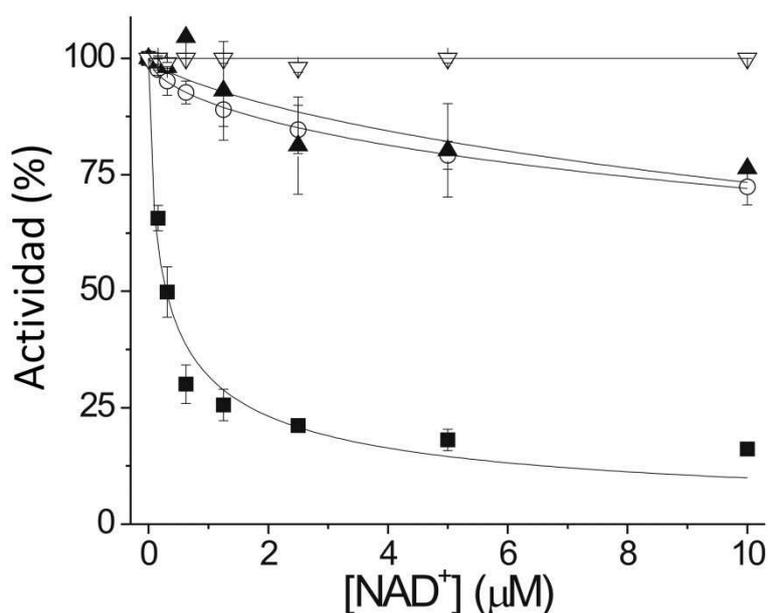


Figura 4.1.26: Inhibición de las distintas actividades de la EhNROR por el NAD^+ . Las curvas de titulación con NAD^+ fueron realizadas para las diferentes actividades de la EhNROR a pH 7 y 30 °C: (■) NADPH oxidasa (bajo condiciones aerobias con 200 μM NADPH), (○) actividad ferri-reductasa (bajo condiciones microaerobias con 200 μM NADPH y 250 μM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$), (▲) actividad de reducción de la EhRr (bajo condiciones microaerobias con 200 μM NADPH, 5 μM EhRr y 25 μM H_2O_2) y (▽) actividad rubredoxina reductasa (bajo condiciones microaerobias con 200 μM NADPH y 100 μM CpRd).

La interpretación de este comportamiento en el contexto fisiológico se torna complejo porque se desconocen las concentraciones intracelulares libres para cada una de las coenzimas. En células aerobias (levaduras) se asume que las mismas están en el rango milimolar (Belenky y col., 2007), sin embargo no existe consenso en la literatura acerca de las concentraciones exactas (Sun y col., 2012). A pesar de esto, se estima que en condiciones normales el equilibrio NAD^+/NADH se encuentra fuertemente desplazado hacia la versión oxidada de la coenzima. Esto tiene su correlato en la necesidad de contar con un aceptor de electrones no limitante en las reacciones oxidativas de producción energética (glucólisis) (Williamson y col., 1967). Para la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, se estima que la versión reducida es marcadamente más abundante, lo que se explica en la participación de esta coenzima en reacciones anabólicas (reductoras), las cuales generan los bloques de construcción de la célula (Veech y col., 1969). Es probable que en *E. histolytica* se produzca un escenario similar. Por todo esto, y considerando también que la afinidad de la EhNROR por el NADPH es cinco veces superior que por del NADH, es probable que la actividad oxidasa de la enzima se encuentre inhibida *in vivo*. Teniendo en cuenta que se

demonstró que el producto de esta reacción es H_2O_2 esto sería de utilidad para la célula, al evitar la producción de dicho compuesto nocivo. Para concluir, cabe destacar que sería interesante evaluar cuan extendido se encuentra este comportamiento en otras flavoenzimas de alta tasa de producción de peróxidos. Dicho mecanismo podría representar una forma eficaz de controlar esta actividad espuria (y perjudicial) de muchas enzimas metabólicas, sin afectar su función principal (como sucede para la *EhNROR*).

4.1.16. Estudio de expresión *in vivo*.

Con el objetivo de comprobar la expresión *in vivo* de las enzimas estudiadas, se realizaron ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos policlonales generados en conejos inmunizados contra la *EhNROR* y la *EhFDP1* recombinantes. En el caso de la *EhRr*, se emplearon dos ratones para la producción del suero hiperinmune. También se disponía en el laboratorio de un anticuerpo contra una peroxirredoxina amebiana (*EhPRX29*), elaborado con anterioridad.

Estudios transcriptómicos previos (microarreglos) (Vicente y col., 2009), indican que ninguno de los genes posiblemente involucrados en la defensa antioxidante del parásito, se encuentra regulado a nivel transcripcional durante un estrés oxidativo o nitrosativo. Estos resultados llevaron a los autores de dicho trabajo a argumentar que las defensas antioxidantes del parásito se encuentran activas de forma constitutiva, ya que los niveles de mensajeros para dichas enzimas son altos en estado basal. Este fue el caso para genes codificantes para enzimas ya caracterizadas como la SOD o las peroxirredoxinas. Tampoco hubo modificación de los transcritos de la *EhRr* o las *EhFDPs* (Vicente y col., 2009). Sin embargo, en otro trabajo, Akbar y col. reportan una fuerte inducción del nivel proteico de la *EhPRX29* durante un estrés oxidativo (Akbar y col., 2004). Esta discrepancia indicaría que existe una regulación post-transcripcional, por lo menos para el caso de esa peroxirredoxina. A la luz de este resultado se planteó evaluar el comportamiento de los niveles proteicos de la *EhRr*, *EhNROR* y la *EhFDP1* durante distintos tipos de estreses.

La figura 4.1.27-A expone los resultados obtenidos cuando cultivos axénicos de *E. histolytica* fueron sometidos a distintos tipos de condiciones experimentales. Al utilizar el anticuerpo anti-*EhPRX29*, a modo de control, se pudo observar que efectivamente los tratamientos provocaron estados estresantes. La *EhPRX29* fue casi indetectable en condiciones basales, pero se indujo fuertemente bajo distintas situaciones, especialmente por la presencia de oxígeno. La condición de estrés térmico se empleó porque, en diferentes organismos, dicho tratamiento genera un

desbalance generalizado que provoca la activación simultánea de varias vías de respuesta (Weber y col., 2006; Santi-Rocca y col., 2012).

Para el caso de la *EhFDP1*, la enzima se detectó en condiciones basales, pero se indujo bajo condiciones de estrés, aunque en menor medida que la *EhPRX29*. Este resultado concuerda con lo informado por Vicente y otros que describen una inducción de aproximadamente cinco veces en los niveles proteicos de la *EhFDP1* cuando los trofozoítos son expuestos al O_2 (Vicente y col., 2012). También es interesante remarcar que el nitroprusiato de sodio (SNP) logró inducir la expresión de la enzima, reforzando la idea que la misma estaría involucrada en la detoxificación de NO^* , a pesar de tener menor actividad frente a ese sustrato que hacia el O_2 (sección 4.1.11). En este aspecto, es de destacar que la abundancia relativa de la *EhFDP1*, ~0,15% de las proteínas totales, (figura 4.1.27-C) podría compensar esa limitación *in vivo*.

Con respecto a la *EhRr* se observa que la proteína se expresa al mismo nivel, tanto en condiciones control como en presencia de O_2 o SNP. Contrario a lo esperado, los niveles de esta peroxidasa disminuyen cuando las células son tratadas con H_2O_2 , así como también durante un estrés generalizado a causa de un tratamiento térmico. Dado que hasta el momento se conocen solo dos tipos de peroxidasas en el parásito (*EhRr* y las peroxirredoxinas) y basándonos en los resultados aquí obtenidos, sería razonable concluir que la *EhRr* es la encargada de detoxificar los peróxidos que se generaran durante condiciones fisiológicas normales, debido a pequeñas cantidades de oxígeno presentes en el medio. Por otro lado, las peroxirredoxinas adquirirían relevancia bajo condiciones de estrés, como por ejemplo en la defensa contra la respuesta inmune o durante la extravasación del parásito. Un argumento adicional es que la *EhRr* se inhibe a concentraciones altas de H_2O_2 (sección 4.1.8 y figura 4.1.13).

Finalmente, el tratamiento con 2 mM de H_2O_2 parece inducir la activación de vías proteolíticas. De forma análoga a lo que ocurre en *Giardia*, este proceso podría estar mediado por el proteosoma (Mastronicola y col., 2011). Este evento representaría, en sí, un posible método de defensa ya que los aminoácidos libres (aumentados) son más propensos a oxidarse que cuando están formando parte de una proteína. De esta forma, actúan como secuestradores de las especies oxidantes antes que puedan atacar otros blancos más críticos (Droge, 2002).

La figura 4.1.27-B revela la expresión de la *EhNROR* en condiciones normales de cultivo. Esta proteína presentó inconvenientes en cuanto a su transferencia hacia membranas de nitrocelulosa, ya sea utilizando extractos del parásito o la proteína

recombinante purificada. Por este motivo, los ensayos de estrés no presentaron resultados reproducibles y se omiten de este análisis.

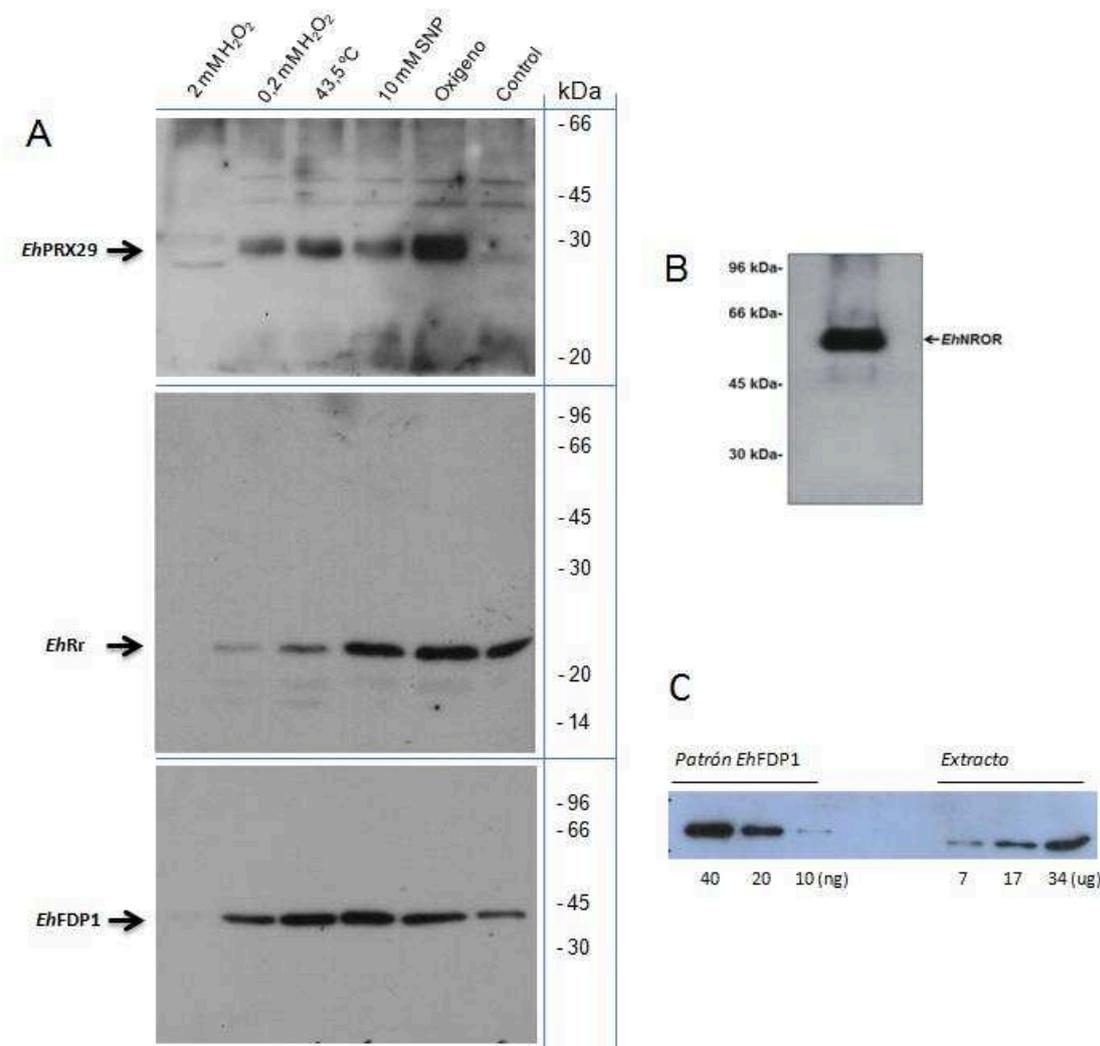


Figura 4.1.27: Detección de la expresión proteica mediante “western blot” en extractos totales de *E. histolytica*. **A)** Expresión de la EhPRX29, EhRr y EhFDP1 bajo condiciones normales de cultivo y frente a distintos estreses (dos horas de cada tratamiento). Siembra 80 µg. **B)** Detección de la expresión de la EhNROR en extractos totales (80 µg). **C)** Cuantificación de los niveles de expresión de la EhFDP1 en condiciones normales de cultivo.

4.1.17. Estudio de localización subcelular.

Habiendo comprobado la especificidad de los anticuerpos policlonales producidos, se procedió a realizar ensayos de localización celular. En la figura 4.1.28 se aprecia que la EhNROR y la EhRr colocalizan en pequeñas vesículas distribuidas a lo largo de toda la célula. Reportes previos habían indicado que la EhRr es una proteína mitocondrial (Dolezal y col., 2010; Maralíkova y col., 2010) y a la luz de los resultados aquí expuestos se puede afirmar que la EhNROR comparte ese estatus. Finalmente, habiendo demostrado la capacidad de interactuar funcionalmente *in*

vitro y la cohabitación espacial dentro del parásito de ambas proteínas, se podría concluir que la *EhNROR* sería el reductor fisiológico de la peroxidasa, dentro del mitocondrio.

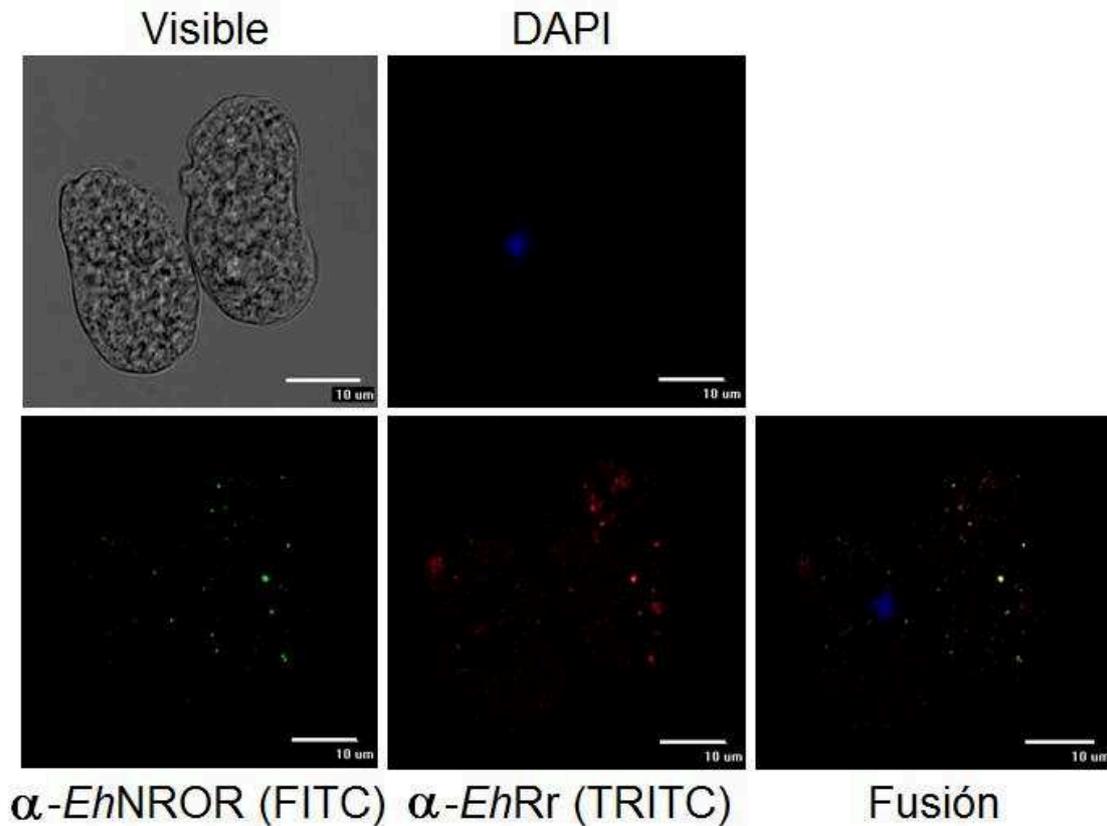


Figura 4.1.28: Microscopía confocal de trofozoítos de *E. histolytica*. Las células acondicionadas fueron tratadas con los anticuerpos primarios anti-EhRr (ratón) y anti-EhNROR (conejo). Luego fueron marcadas con dos anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos, anti-IgG de ratón-TRITC (rojo) y anti-IgG de conejo-FITC (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

En segundo lugar, la *EhFDP1* exhibió una localización citoplasmática, resultado que concuerda con datos informados previamente (Vicente y col., 2012). También hay que remarcar que la enzima aparenta acumularse preferentemente de forma adyacente a la membrana plasmática (figura 4.1.29). Esta ubicación ha sido reportada para otras enzimas involucradas en la detoxificación de EROs y podría representar una ventaja ya que la colocaría de forma estratégica, a modo de barrera, frente al O_2 que ingresa por difusión pasiva a la célula (Choi y col., 2005; Arias y col., 2008; Biller y col., 2014; Iyer y col., 2014). Las ferredoxinas amebianas fueron descritas como proteínas citoplasmáticas (Mai y col., 1999; Ghosh y col., 2000), es por esto que probablemente se comporten como los reductores fisiológicos de la *EhFDP1*. Dicha función pudo demostrarse *in vitro* en este trabajo.

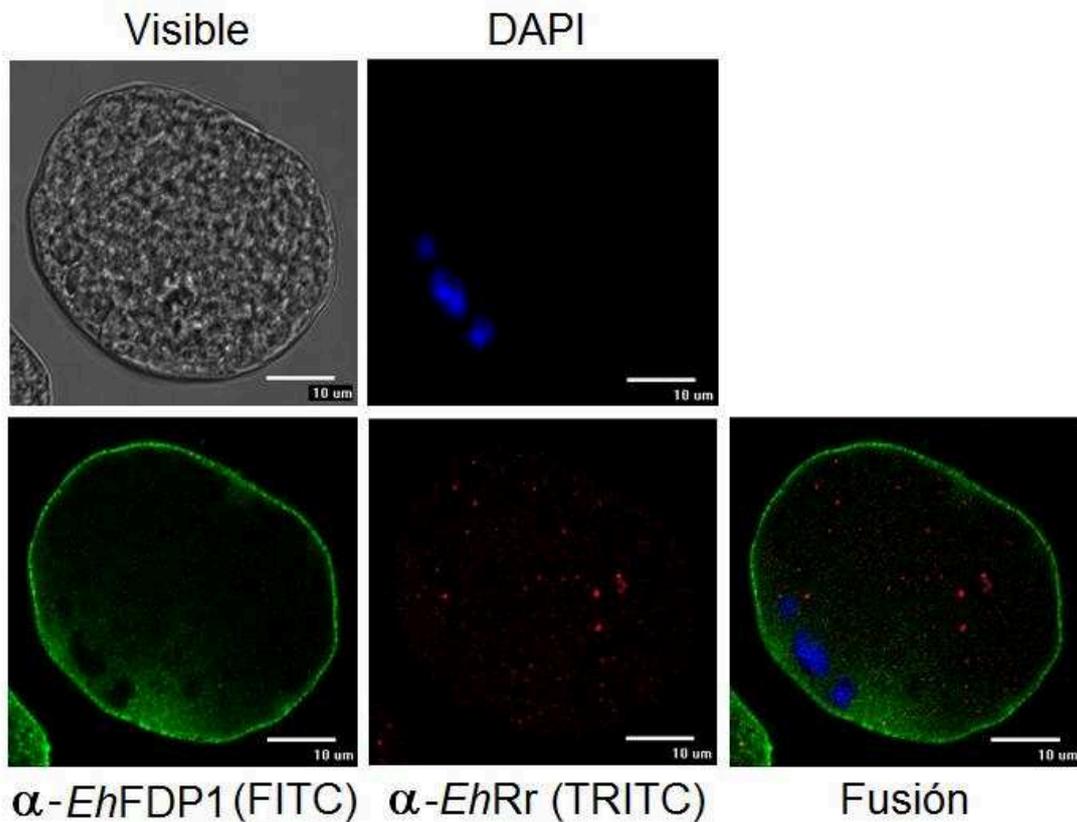


Figura 4.1.29: Microscopía confocal de un trofozoíto de *E. histolytica*. Las células acondicionadas fueron tratadas con los anticuerpos primarios anti-EhRr (ratón) y anti-EhFDP1 (conejo). Luego fueron marcadas con dos anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos, anti-IgG de ratón-TRITC (rojo) y anti-IgG de conejo-FITC (verde). No se aprecia colocalización de ambas proteínas. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

4.1.18. Discusión

Se han encontrado en *E. histolytica* diversos genes adquiridos por eventos de transferencia horizontal desde procariotas. Estos procesos se vieron favorecidos porque el parásito cohabita el mismo nicho ecológico que los organismos donantes, bacterias de géneros tales como *Clostridium* y *Bacteroides*, habituales habitantes de la flora colónica. Muchas de las proteínas transferidas están implicadas en rutas del metabolismo central y reemplazaron funcionalmente a las encontradas en organismos eucarióticos clásicos. Esta generalización puede aplicarse a varias de las enzimas de la vía glicolítica (Alsmark y col., 2009). Otro conjunto de enzimas, emparentadas con las partícipes en las vías de defensa antioxidativa de procariotas anaerobios, han sido identificadas en el genoma de *E. histolytica*. Análisis filogenéticos previos asumen que dichos genes se incorporaron por THG. Entre ellos se encuentran los codificantes para la EhRr, la EhFDP1 y la EhNROR (Nixon y col., 2002; Loftus y col., 2005; Putz y col., 2005; Andersson y col., 2006). Estas enzimas, típicamente, forman parte de cadenas de transporte electrónicas y necesitan de proteínas accesorias para desarrollar su

actividad. El hecho de que estos genes se hayan incorporado y mantenido, sugiere que su presencia debería de conferirle algún tipo de beneficio al parásito. Sin embargo, al momento, se desconocía si estas enzimas eran funcionales, principalmente por carecer de información sobre la naturaleza de sus compañeros redox, los cuales aparentemente no se han incorporado junto con ellos al genoma.

4.1.18.1. La *EhNROR* y la *EhRr* constituyen un sistema eficaz de detoxificación de H_2O_2 dentro del mitosoma.

Los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente no solo “respiran” sino que tienen una alta afinidad por el O_2 , comparable a la de organismos aerobios (Weinbach y Diamond, 1974). Esta respiración no tiene fines energéticos y se ha postulado que podría ser una forma de detoxificación de O_2 o de regeneración de cofactores oxidados, reducidos durante la glicólisis (Reeves, 1984). En *G. lamblia* el consumo de O_2 se asoció a la acción de una NADH oxidasa citoplasmática (Brown y col., 1996; Brown y col., 1998). Datos bibliográficos reportan que *E. histolytica* posee una enzima homóloga a la de *Giardia* (Nixon y col., 2002; Muller y col., 2012) y por este motivo se planteó realizar la caracterización bioquímica de la misma, con el fin de determinar si efectivamente dicha enzima cumple un rol similar en las amebas.

Mediante la obtención de la enzima recombinante, *EhNROR*, se comprobó que la misma presenta actividad oxidasa, pero a diferencia de la enzima de *Giardia*, su producto de reacción es H_2O_2 y no H_2O . Aún más, durante su ciclo de catálisis la enzima aparenta ser permeable a la pérdida de moléculas de O_2^- . La producción de estos metabolitos tóxicos, especialmente para una célula anaerobia, hacen pensar que la reducción de oxígeno difícilmente sea la función biológica de la *EhNROR*. A esa línea de pensamiento se suma el hecho de que la actividad oxidasa podría estar fuertemente inhibida *in vivo*, a causa de una inusual capacidad de la coenzima oxidada, especialmente NAD^+ , de actuar como un inhibidor no competitivo fuerte.

El análisis de la secuencia primaria permitió colocar a la *EhNROR* como un miembro de la familia FADPNR. Para intentar determinar la función biológica de la enzima se ensayaron varias actividades características de proteínas pertenecientes a dicha superfamilia. Se comprobó que la enzima posee actividad nitrorreductasa, ferrireductasa y en menor medida, S-nitrosotiol reductasa y disulfuro reductasa. Sin embargo, el comportamiento más significativo fue su capacidad de actuar, de manera muy eficiente, como rubredoxina reductasa. Este comportamiento no fue del todo inesperado ya que una búsqueda de homólogos identificó varias de estas enzimas

entre las asignaciones con mejor puntaje. Resta agregar que la actividad rubredoxina reductasa de la *EhNROR* no se vio afectada por la presencia de las coenzimas oxidadas, al contrario de lo observado para la actividad oxidasa.

El hecho de que *E. histolytica* carezca de rubredoxinas y de que la *EhNROR* no sea capaz de reducir otras redoxinas homólogas (ferredoxinas y tiorredoxinas) planteó el interrogante sobre cuál era su sustrato fisiológico. Finalmente, se pudo demostrar que la enzima es capaz de ceder equivalentes de reducción a las proteínas efectoras de forma directa. Habiendo identificado su función, restaba conocer su localización subcelular. Ensayos de inmunolocalización determinaron que la *EhNROR* es una proteína mitocondrial.

Por largo tiempo se pensó que *E. histolytica* representaba a uno de los descendientes de la primera célula eucariota, aquella que existió previo al evento de endosimbiosis de una α -proteobacteria que dio origen a la mitocondria (Cavalier-Smith, 1991). Sin embargo, en 1995 se encontró en el parásito una proteína homóloga a una chaperona mitocondrial, dando la primera evidencia, entre muchas otras que le siguieron, que este organismo en realidad sufrió la pérdida secundaria de dicha organela (Clark y Roger, 1995). Posteriormente pudieron identificarse pequeñas estructuras vesiculares y se comprobó que las mismas representan remanentes mitocondriales que se originaron debido a un proceso degenerativo, como consecuencia de la adaptación a un estilo de vida anaerobio (Mai y col., 1999; Aguilera y col., 2008). La razón por la que la célula todavía conserva dichas estructuras es desconocida (por lo menos en *Entamoeba*). En *T. vaginalis*, estos remanentes se conocen como hidrogenosomas y están involucrados en la obtención de energía, una función que aparentemente evolucionó por modificación de una mitocondria original, derivada de un endosimbionte bacteriano anaerobio facultativo (Makiuchi y Nozaki, 2014). Sin embargo, tanto en *Giardia* como en *Entamoeba*, los mitosomas no cumplen funciones energéticas y su función no se ha demostrado de forma concluyente. Entre los proteomas mitocondriales descritos, el de *E. histolytica* es el más simplificado y la única vía metabólica confirmada que tiene lugar dentro de los mismos es la activación del sulfato para la posterior producción de lípidos sulfatados (en el citoplasma) (Mi-ichi y col., 2009; Mi-ichi y col., 2011). Existe controversia acerca de si estas organelas contienen, o no, una vía de síntesis de centros de hierro-azufre. De todas formas se comprobó que las enzimas involucradas en ese proceso también están presentes en el citoplasma (Ali y Nozaki, 2013).

En los hidrogenosomas de *T. vaginales* se identificó una amplia gama de proteínas con capacidad de detoxificar especies reactivas: SOD, Rr, FDP,

peroxirredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina reductasa, OsmC (hidroperoxidasa) y HCP (*hibrid cluster protein*). Se cree que su presencia en dicha organela tiene como función proteger enzimas claves del metabolismo energético, tales como la PFOR o las hidrogenasas (Mentel y col., 2008; Schneider y col., 2012). Ambas enzimas cuentan con centros de hierro-azufre importantes para su actividad.

Dentro de los mitosomas de *E. histolytica* la protección hacia peróxidos se le atribuye a la *EhRr* (Maralikova y col., 2010), pero hasta el momento no se contaba con una caracterización cinética detallada de la enzima, ni tampoco se conocía cual era su reductor fisiológico. En este trabajo se pudo comprobar que la *EhRr* tiene capacidad de reducir H_2O_2 de forma eficiente y que aparenta tener una expresión constitutiva en condiciones normales de cultivo. Los niveles proteicos de la enzima disminuyen cuando la célula es tratada con concentraciones moderadas de H_2O_2 exógeno, por lo que su función principal sería eliminar peróxidos originados por la acción espuria de flavoenzimas sobre cantidades traza de O_2 presente en el medio. A diferencia de lo que ocurre en procariotas anaerobios, *E. histolytica* carece de rubredoxinas, el dador por defecto de electrones hacia la Rr en esos organismos.

Los ensayos aquí detallados revelan que la *EhNROR* puede reducir eficientemente a la *EhRr*, obviando la necesidad de contar de una proteína accesoria. Es notoria la alta afinidad que posee la *EhNROR* hacia la reducción de la *EhRr* ($K_m = 0,45 \mu M$). En comparación, el K_m para la reducción de la Rr de *P. furiosus* por parte de la rubredoxina de la misma fuente es de “solo” $70 \mu M$ (Weinberg y col., 2004). Si bien este hecho es llamativo, no es del todo inusual. En *C. acetobutylicum* la NROR es capaz de transferir electrones directamente a las distintas isoformas de Rr, si bien este hecho es poco resaltado porque dicha bacteria posee una rubredoxina. Sin embargo, es interesante observar que la presencia de dicha redoxina solo incrementa la eficiencia de la transferencia electrónica en 1,5 veces (Riebe y col., 2009). Esta capacidad podría conservarse en la *EhNROR* por haber sido adquirida por THG, probablemente desde una bacteria del género *Clostridium*.

Los mecanismos de importación de proteínas al mitosoma permanecen desconocidos, por lo pronto tanto la *EhRr* como la *EhNROR* carecen de posibles péptidos señales. Es interesante observar que la Rr de *T. vaginalis*, para la cual se ha demostrado su localización hidrogenosomal, tampoco posee una presecuencia (Putz y col., 2005).

Si bien se demostró la colocalización de la *EhRr* y la *EhNROR* dentro del mitosoma, resta determinar si la organela tiene capacidad de incorporar NAD(P)H. De

esta forma se contaría con todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reducción de H_2O_2 . La membrana interna mitocondrial es impermeable a estas coenzimas por lo que utiliza transportadores de la familia MCF (Todisco y col., 2006). Se han descrito dos de estos transportadores en la membrana mitocondrial, uno de los cuales incorpora ATP (Chan y col., 2005) y el otro exporta P_i (Dolezal y col., 2010), ambos necesarios para el proceso de activación del sulfato. Sin embargo, no se ha comprobado experimentalmente si alguno de estos transportadores también puede incorporar NAD(P)H. Al indagar entre las posibles proteínas mitocondriales reportadas (Mi-ichi y col., 2009), no encontramos otras enzimas candidatas a utilizar NAD(P)H. Claro está que de las 95 proteínas identificadas, solo 31 tienen una función asignada. Un trabajo previo, sobre el que existe cierta controversia, informa la presencia en el mitocondrio de la maquinaria de ensamblaje de centros de hierro azufre (Maralikova y col., 2010). Es sabido que dicho proceso también es NADH dependiente (Muhlenhoff y col., 2002).

En resumen, se ha demostrado la existencia de una posible vía de detoxificación de H_2O_2 en los mitocondrios. Al momento es la segunda asignación funcional para dicha organela. Resta conocer si existen en el mitocondrio otras vías celulares especialmente sensibles a EROs (o que las produzcan) que justifiquen esta compartimentalización. Por último, dado que en condiciones normales la *EhRr* se expresa en mayor abundancia que las peroxirredoxinas, sería interesante evaluar el peso relativo de esta enzima en la capacidad total de detoxificación de H_2O_2 de la célula.

4.1.18.2. Las ferredoxinas son reoxidadas, por acción directa de las FDPs, durante el proceso de “respiración”.

Las Fds juegan un papel central en el metabolismo energético de *E. histolytica* ya que actúan como aceptores electrónicos durante el paso de descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA (Reeves, 1984). En ese punto, trabajos previos, informan que el parásito puede adoptar dos escenarios metabólicos distintos (“aerobio” o anaerobio), siendo la tensión parcial de oxígeno la que determina la adopción de uno u otro camino (Montalvo y col., 1971).

Los productos finales del metabolismo anaerobio son CO_2 y etanol. El piruvato producido en la glicólisis es convertido en acetil-CoA y CO_2 por la *EhPFOR*, en este paso se liberan electrones que son aceptados por las Fds, reduciéndolas. Luego, el acetil-CoA es convertido a tiohemiactal y queda unido a la enzima, siendo posteriormente reducido a etanol. Estos últimos dos pasos son catalizados por una

aldehído-álcohol deshidrogenasa bifuncional NAD^+ dependiente (ADH2). Alternativamente, parte del tiohemiacetal puede hidrolizarse de forma no enzimática generando acetaldehído libre, que luego es reducido por una alcohol deshidrogenasa NADP^+ dependiente (ADH1). Tanto la ADH2 como la ADH1 reoxidan el NAD(P)H generado durante la glicólisis. Para que todo el proceso llegue a equilibrio redox, los electrones tomados por las Fds deben ser transferidos para que las mismas puedan ser reutilizadas. En los organismos que poseen hidrogenosomas, las Fds son reoxidadas mediante la producción de H_2 . En este proceso, los electrones son cedidos a las hidrogenasas que, a su vez, reducen H^+ generando hidrógeno molecular. *E. histolytica* no posee hidrogenosomas y tampoco produce H_2 cuando es cultivada axénicamente. Por esto, el proceso mediante el cual las Fds son reoxidadas constituía una incógnita (Reeves, 1984). En un trabajo publicado recientemente se caracterizó una enzima (*EhNO*) que puede funcionar como ferredoxina: NADP^+ reductasa (Jeelani y col., 2010). La existencia de este paso resuelve el problema ya que durante el proceso de catálisis se reoxidan las Fds y se genera NADPH , que finalmente es utilizado por la alcohol deshidrogenasa antes mencionada. Con la suma de todas estas reacciones se alcanzaría el equilibrio redox en un escenario anaerobio (figura 4.1.30).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la *EhNROR*, fue posible descartar a esta enzima como candidata a representar a la oxidasa terminal de *E. histolytica*. En este punto se comenzó con el estudio funcional de la isoforma más abundante de FDP del parásito (*EhFDP1*). Se comprobó que la enzima tiene actividad O_2 reductasa y que llamativamente tiene preferencia por utilizar Fds como sustratos reductores en lugar de rubredoxinas. Este aspecto es relevante ya que *E. histolytica* carece de rubredoxinas y este comportamiento podría representar una adaptación de la enzima al contexto metabólico del parásito. La *EhFDP1* aparenta incrementar sus niveles proteicos ante la presencia de O_2 . Finalmente, se comprobó que la enzima tiene localización citoplasmática, lo que es coherente con la propuesta de que las Fds son sus dadores de electrones fisiológicos. En ese aspecto vale recordar que el consenso general asigna a las rubredoxinas la función de ceder electrones a las FDPs. Sin embargo, en *P. furiosus*, donde la *PfFDP* es responsable del consumo de O_2 , se observó que una cepa mutante en la rubredoxina mantiene inalterada su capacidad de metabolizar el gas (Thorgersen y col., 2012). Los autores de este trabajo sugieren que debe existir otra molécula, probablemente una Fd, que es capaz de suplir la función de la redoxina faltante. El conjunto de todos los resultados obtenidos, sumado a los antecedentes bibliográficos, permiten especular que estos tipos de sistemas de transferencia electrónica, característicos de organismos anaerobios, no se comportan de forma lineal y que evidentemente existe una marcada plasticidad y redundancia en los mismos.

En conclusión, los resultados obtenidos podrían dar respuesta a dos de los interrogantes iniciales en relación al metabolismo “aerobio” de *E. histolytica*. En primer lugar, el consumo de O_2 observado sería consecuencia de la acción de las FDPs, que se conectarían al metabolismo central utilizando los equivalentes de reducción cedidos por las Fds. Y en segundo lugar, debido a esta transferencia electrónica, dichas redoxinas se reoxidarían estando disponibles nuevamente para aceptar los electrones provenientes de la oxidación del piruvato y evitando de esta forma el cese del flujo glicolítico. En este contexto, la reacción catalizada por la *EhNO* se torna dispensable (figura 4.1.31).

La relación de los parásitos anaerobios con el O_2 no deja de ser compleja y enigmática. No caben dudas que concentraciones atmosféricas del mismo les son tóxicas, sin embargo, niveles menores les podrían ser ventajosos. Se ha demostrado fehacientemente que *T. vaginalis* crece mejor en cultivo en presencia de niveles traza de O_2 (Paget y Lloyd, 1990). Con respecto a *E. histolytica*, no se encontraron datos bibliográficos en donde se hayan diseñados experimentos orientados a evaluar esa

posibilidad, sin embargo, existen algunos reportes preliminares que parecen indicar un comportamiento similar (Cedeno y Krogstad, 1983). Al respecto, podemos observar en la figura 4.1.31 que en presencia de O_2 parte del acetil-CoA es convertido a acetato por una acetil-CoA sintetasa (AcCoAS). Esto sucede porque la condición aerobia genera un déficit de equivalentes de reducción que impide la transformación del acetil-CoA a etanol. Gracias a la reacción catalizada por la AcCoAS se regenera el pool de CoA necesario para continuar con la glicólisis. Sin embargo, es de notar que en este proceso se sintetiza una molécula adicional de ATP. Desde un punto de vista energético este sería el escenario favorecido y quizás represente mas fidedignamente la condición de crecimiento en el nicho natural de los parásitos, ya que el colon o la vagina, en caso de *T. vaginalis*, ciertamente no son entornos estrictamente anóxicos.

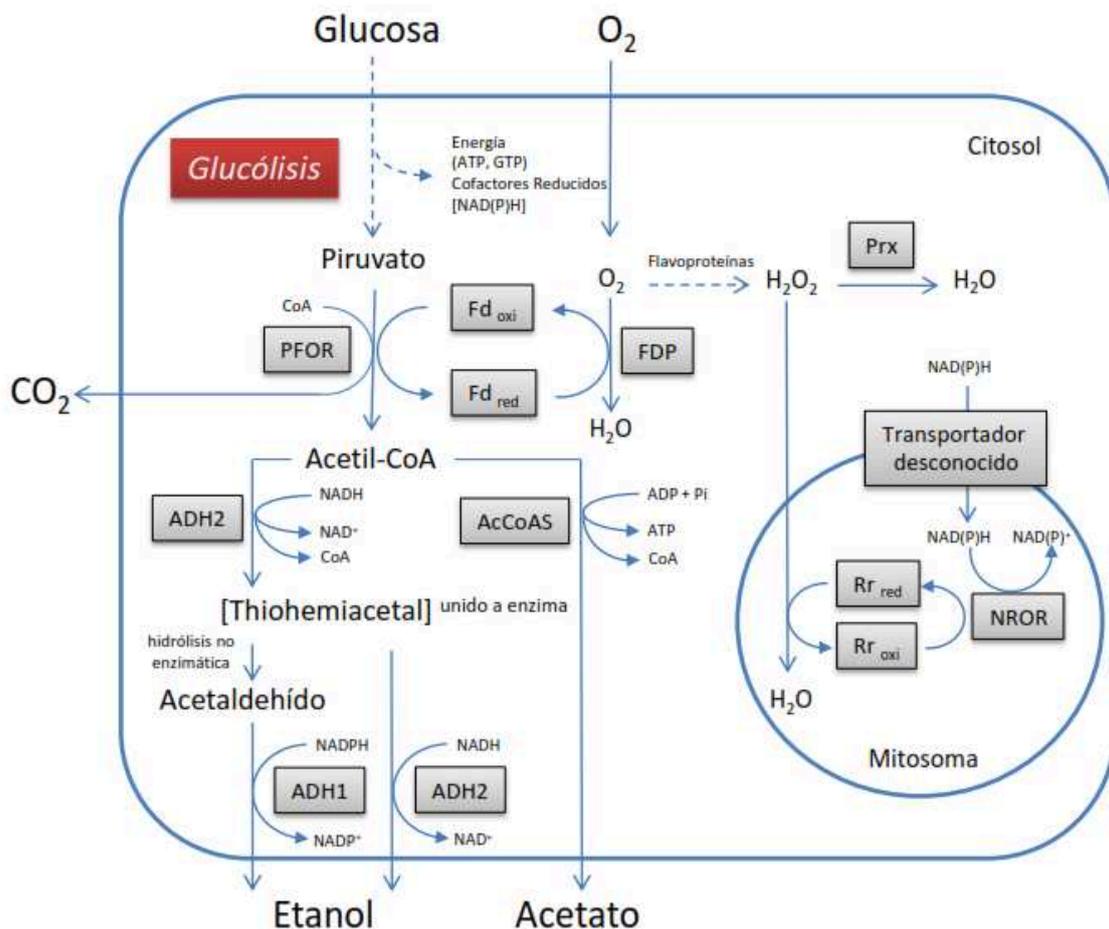


Figura 4.1.31: Reacciones metabólicas propuestas en presencia de O_2 . PFOR (piruvato:ferredoxina oxidoreductasa), Fd_{oxi} y Fd_{red} (formas oxidadas y reducidas de ferredoxina), ADH1 (alcohol deshidrogenasa $NADP^+$ dependiente), ADH2 (aldehído-alcohol deshidrogenasa NAD^+ dependiente), FDP (proteína flavodiférrica), AcCoAS (acetil-CoA sintetasa), Rr_{oxi} y Rr_{red} (formas oxidadas y reducidas de rubreritrina), NROR (rubredoxina reductasa), Prx (peroxirredoxina).

4.1.18.3. Las EhFDPs y las ferredoxinas podrían contribuir a la defensa contra especies reactivas del nitrógeno en el parásito.

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el NO^{*}, liberado por los macrófagos activados, desempeña un papel crítico en la eliminación de trofozoítos de *E. histolytica* (Lin y Chadee, 1992; Lin y col., 1994; Ramos y col., 2007). La capacidad de establecer infecciones denota que el parásito debe contar con defensas contra especies reactivas del nitrógeno. En comparación con los conocimientos que se han acumulado sobre los mecanismos moleculares que posee *E. histolytica* para lidiar contra las EROs, poco se sabe acerca de las posibles macromoléculas involucradas en la defensa contra el estrés nitrosativo. Se han realizado estudios transcriptómicos y se han identificado algunos genes que modulan su expresión bajo condiciones de estrés nitrosativo, pero hasta el momento no se conocen exactamente como ejercen su función defensiva, si es que poseen alguna (Vicente y col., 2009; Santi-Rocca y col., 2012).

Las únicas enzimas candidatas, presentes en el genoma de *E. histolytica*, que podrían actuar detoxificando NO^{*} son las FDPs (Loftus y col., 2005). Los resultados antes presentados parecen corroborar esa asignación. Por un lado, la EhFDP1 presenta actividad NO^{*} reductasa y además incrementa sus niveles en presencia de NO^{*}. Sin embargo, su actividad NO^{*} reductasa es sensiblemente inferior a la O₂ reductasa y además su desempeño está lejos de los valores informados para otras enzimas de ese tipo. Una posible forma de sobrellevar ese inconveniente sería contar con una gran cantidad de proteína, de forma tal que la actividad enzimática total dentro de la célula sea la adecuada. Al respecto, se pudo comprobar que la EhFDP1 se expresa abundantemente en condiciones normales ya que representa aproximadamente el 0,15% de las proteínas totales del parásito, cantidad que se incrementa en condiciones de estrés. En este punto sin embargo surge otro interrogante. Las EhFds que posiblemente sean los compañeros redox de las EhFDPs, son inactivadas por acción del NO^{*}. Cabe aclarar que en condiciones biológicas el destino de la vía dependerá de las concentraciones relativas de cada uno de los actores puestos en juego. A pesar de su potencialidad teórica, teniendo en cuenta lo planteado, por el momento no se puede afirmar terminantemente que las EhFDPs jueguen un papel central en la capacidad de detoxificación de NO^{*} del parásito, necesiándose realizar ensayos complementarios.

Otra alternativa factible es que existan caminos de detoxificación de NO^{*} aún desconocidos. Por ejemplo, en *E. coli* se han eliminado en una misma cepa todas las NO^{*} reductasas conocidas, y la bacteria aún conserva al menos un 50% de su

actividad NO[•] reductasa total (Vine y Cole, 2011). Una hipótesis que se maneja es que exista una posible vía alternativa de detoxificación que proceda en dos etapas. En una primera instancia se produce “daño” sobre las macromoléculas y luego la célula es capaz de reparar las mismas. Los centros de Fe-S, y sus vías de reparación, son los candidatos más probables. Se ha comprobado que para eliminar los DNICs de los centros de Fe-S “dañados” solo se requiere la presencia de cisteína y una desulfurasa (figura 4.1.32) (Yang y col., 2002). De esta forma, este mecanismo de reparación no requiere la síntesis *de novo* de todo el centro, lo que es energéticamente más demandante (Muhlenhoff y col., 2002). El resultado global de este proceso sería un aparente consumo de NO[•] por parte de la célula y podría representar la capacidad “fantasma” todavía no atribuida a ninguna enzima en particular.

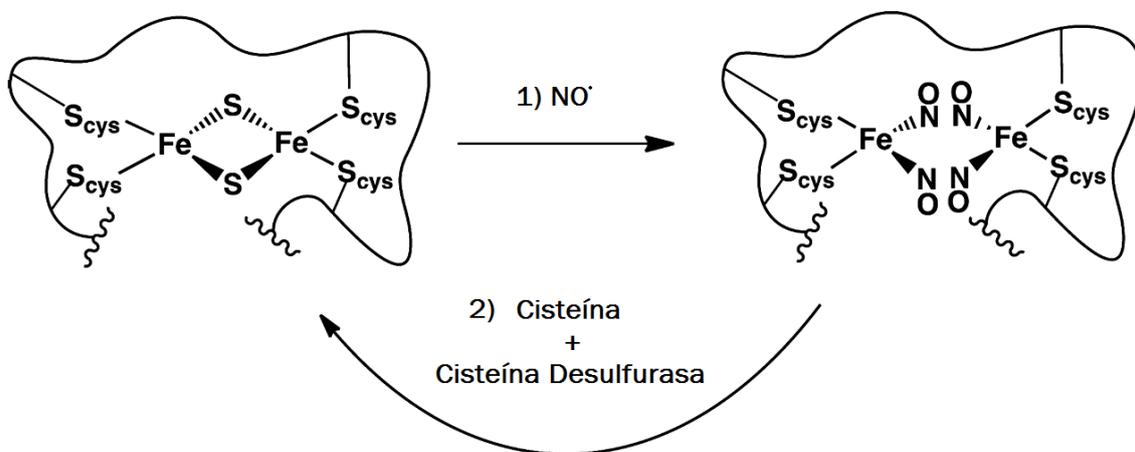


Figura 4.1.32: Mecanismo propuesto para la reparación de centros de Fe-S dañados por acción del NO[•]. Modificado de (Fitzpatrick y col., 2014)

Es interesante observar que cuando *E. histolytica* es tratada con NO[•] se produce la inducción de la enzima cisteína sintasa y de la NifS (una desulfurasa) lo que podría dar un indicio que se está activando la vía antes comentada (Santi-Rocca y col., 2012). En este contexto, se podría repensar el rol de las EhFds como un “buffer” de NO[•]. Estas proteínas de Fe-S, que representan el 20% de todos los centros de ese tipo en la célula (Reeves y col., 1980), podrían estar drenando el NO[•] para formar DNICs y luego actuar de sustrato de la vía de reparación, evitando de esta manera que se afecten otras moléculas menos abundantes y *por ende*, más esenciales.

4.2. CAPÍTULO 2: Trypanosoma cruzi

4.2.1. Antecedentes y análisis de la secuencia primaria de las fRMsr.

Es relativamente escaso el conocimiento acumulado con respecto a los sistemas de reparación de metioninas oxidadas en tripanosomátidos. En un trabajo previo realizado en nuestro grupo (Arias y col., 2011) se estudiaron las propiedades cinéticas y funcionales de las metioninas sulfóxido reductasas tipo A de *T. brucei* y *T. cruzi*. Por otro lado, Sansom y colaboradores (Sansom y col., 2013) hicieron lo propio con la MsrA de *Leishmania major*, determinando que la enzima participa en la defensa contra el estrés oxidativo y que es necesaria para la eficiente multiplicación del parásito dentro de los macrófagos infectados. Actualmente en el proyecto genoma de *T. cruzi* (y otros tripanosomátidos) solo se encuentran anotadas las MsrA. Mediante búsquedas informáticas se encontraron dos marcos abiertos de lectura, anotados como proteínas hipotéticas, que posiblemente representen las MSR restantes (MsrB y fRMsr). Con el presente trabajo se buscó completar el estudio de este sistema enzimático, caracterizando funcionalmente la fRMsr de *T. cruzi*.

En el año 2007, Lin y colaboradores identificaron por primera vez, en *E. coli*, una enzima que actuaba como reductasa, de forma específica, para el isómero R de la metionina sulfóxido no peptídica. En ese trabajo se realizó la descripción funcional de la proteína y se determinó su estructura terciaria, la cual consiste en un plegamiento tipo GAF (Lin y col., 2007). Los plegamientos GAF están presentes en enzimas como fosfodiesterasas, adenil ciclasas, quinasas, etc. y tienen la capacidad de unir diversas moléculas, como por ejemplo nucleótidos. La captación de estos ligandos produce cambios estructurales que modulan la función de los dominios a los cuales los GAFs están asociados. El estudio de la fRMsr de *E. coli* fue la primera descripción de un dominio GAF que existe de manera independiente y que además presenta actividad enzimática por sí mismo (Lin y col., 2007). Luego de ese reporte se estudiaron las fRMsr de *Saccharomyces cerevisiae* (Le y col., 2009), *Staphylococcus aureus* (Bong y col., 2010), *Neisseria meningitidis* (Gruez y col., 2010) y *Thermoplasma acidophilum* (Kim y col., 2014). Todas estas enzimas mantuvieron una estructura tridimensional muy conservada, constituida por el dominio GAF característico. Se propuso una clasificación dual para las fRMsr según se encuentren presentes 3 (tipo 1) o 2 (tipo 2) cisteínas en su sitio activo. Salvo la enzima de *T. acidophilum*, todas las fRMsr estudiadas al momento son de tipo 1 (Le y col., 2009).

El proyecto genoma de *T. cruzi* se realizó utilizando la cepa híbrida CL-Brener, por lo que existen dos copias alélicas para la mayoría de los genes del parásito. Los genes codificantes para las *TcfRMs* se encuentran en los cromosomas 22 (P y S) y presentan 10 cambios puntuales en sus secuencias primarias. La identidad de secuencia entre ambos alelos es de 98,2%. Cuando se los compara con sus homólogos en otros tripanosomátidos la identidad de secuencia ronda en torno al 42%. El análisis de los dominios presentes en las *TcfRMs* permite observar la presencia de un dominio GAF hacia el extremo N-terminal y un dominio tipo TIP41 hacia la zona C-terminal de estas proteínas. Esta organización de dominios esta conservada entre sus ortólogos en otros tripanosomátidos (figura 4.2.1), no así en otros microorganismos eucariotas, donde el dominio accesorio TIP41 constituye una proteína individual.

		[
TcfRMs _{rP}	(1)	MHADNSSVIPPCC--SKRELYTRLEAVRSFVELPSSMLTPHFNLMIGLS
TcfRMs _{rS}	(1)	MHADNSSVIPPCC--SKRELYTRLEAVRSFVEPPSSMLTPHFNLMIGLS
TbfRMs _r	(1)	MTESVGASTPTGGRSDKVFYYSRLVKEVQGVVEFPSSKRLAPANALINLS
LmfRMs _r	(1)	-MTLETPAPTFS--SKKELYDWLVKQVEALVHDMSSKRFTPQANLVIGLS
CffRMs _r	(1)	-MVHEPVAAPVFA--TKKAMYDWLEKQTTYLVEDMSSKRFTPQANLVIGLS
		===== Dominio GAF =====*
TcfRMs _{rP}	(49)	NVSALLFYELNRFANTNAMLSDLPINWLGFYLLQSPQRLV LGPFQGRPAC
TcfRMs _{rS}	(49)	NVSALLFYELNRFANTNAMLSDLPINWLGFYLLQSPQRLV LGPFQGRPAC
TbfRMs _r	(51)	NVAASLFYGLNRHANPEAVLQSPVYNWLGFYLMHGPELLALGPFQGRPAC
LmfRMs _r	(48)	NTAALCFYELNRFNCNPEAALEKLRVNWFGFYLFQAPGLLALGPFQGRPAC
CffRMs _r	(48)	NIAALCFYELNRFNSNPAPLEQLKVNWFQFYLLQAPGLLALGPFQGRPAC
		===== * =====*
TcfRMs _{rP}	(99)	IEVAMGRGVCGTAAQKGETLIVPDVHAFPGHIACDSLNSNSEIVVPIKTAK
TcfRMs _{rS}	(99)	IEVAMGRGVCGTAAQKGETLIVPDVHAFPGHIACDSLNSNSEIVVPIKTAK
TbfRMs _r	(101)	TEIKMGRGVCGTAAQAKTLVSDVHEFPGHIACDSASNSEIVVPIKSAA
LmfRMs _r	(98)	TEIRVGRGVCGTVAESGESMVVQSVEHFPFGHIACDSASKSEIAPVPLIEN
CffRMs _r	(98)	TEIRVGRGVCGTVAESGESLVVANVHDFPGHIACDSASESEVVIPILIEN
		===== * =====]
TcfRMs _{rP}	(149)	GHVVGVIDVDSTQREFFDAEDAQGLONTATVLSQNLFFPMACTLARNPLL
TcfRMs _{rS}	(149)	GHVVGVIDVDSTQREFFDAEDAQGLONTATVLSQNLFFPMACTLARNPLL
TbfRMs _r	(151)	GEVVGITDVDSTQLNFFDDVDAQGLQEVAEIVARHVDFSVFHQFCTQMP
LmfRMs _r	(148)	GSVVAVIDVDSTELGHFSEEDREGLERMAAVLAQHLDFFPMARALAVNPAL
CffRMs _r	(148)	GSVVGVIDVDSTVANHFTEEDKAGLERVAAVLVQHLEFFPMARALAVNPAL
TcfRMs _{rP}	(199)	ANAASIPSHNEAPFSLAGKDEDKVPTVEEA-----
TcfRMs _{rS}	(199)	ANAASIPSHNEAPFSLAGKDEDKVPTVEEA-----
TbfRMs _r	(201)	AGTG--PSAPKPTANVAGSETQPSVLPNSNDGTDKNIKDKVCLTGSAVA
LmfRMs _r	(198)	GLPG-----YSALAG-----
CffRMs _r	(198)	GLPG-----YSALAG-----
TcfRMs _{rP}	(229)	----AGSKAKGAFPPFSCTKMTAFVITRAPGTTPAKALTEVGEGASKQQR
TcfRMs _{rS}	(229)	----VSKAKGAFPPFSATKMAAFVITRAPGTTPATALTEVGEGASTQQR
TbfRMs _r	(249)	ALCASGLAAKAVTLPPSCKLSAATIMPLSNHAVQGREASLEGRPLVQA
LmfRMs _r	(208)	----GEKALQPHG-DAEAVPQATPVTTTTTTTPATVTAVTRIPFFKVEVKQ
CffRMs _r	(208)	----GEKALQEPA-QRAEEDTTAATAPAAAAPPTTTVTHIPYFKIEARL
TcfRMs _{rP}	(275)	S-QRFTHRVGWDFSVTELSRIITQPELLHYEEALGVSALEPIIPFAFNLT
TcfRMs _{rS}	(275)	S-QRFTHRVGWDFSVTELSRIITQPELLHYEEALGVSALEPIIPFAFNLT
TbfRMs _r	(299)	S-PRRWSVDISGWEFEGTDFTRILTQEELEKQYEEELGIGSIPELQFPFNLT
LmfRMs _r	(253)	P-DVTIKCVGWQFRTNLDRIIMTODETKQLQDSLGISALPEIAFQGKTL
CffRMs _r	(253)	P-DTTAKCVGWQFKTTLDRIMTQEEERKMEQALAISSFPEIAFRSNTF

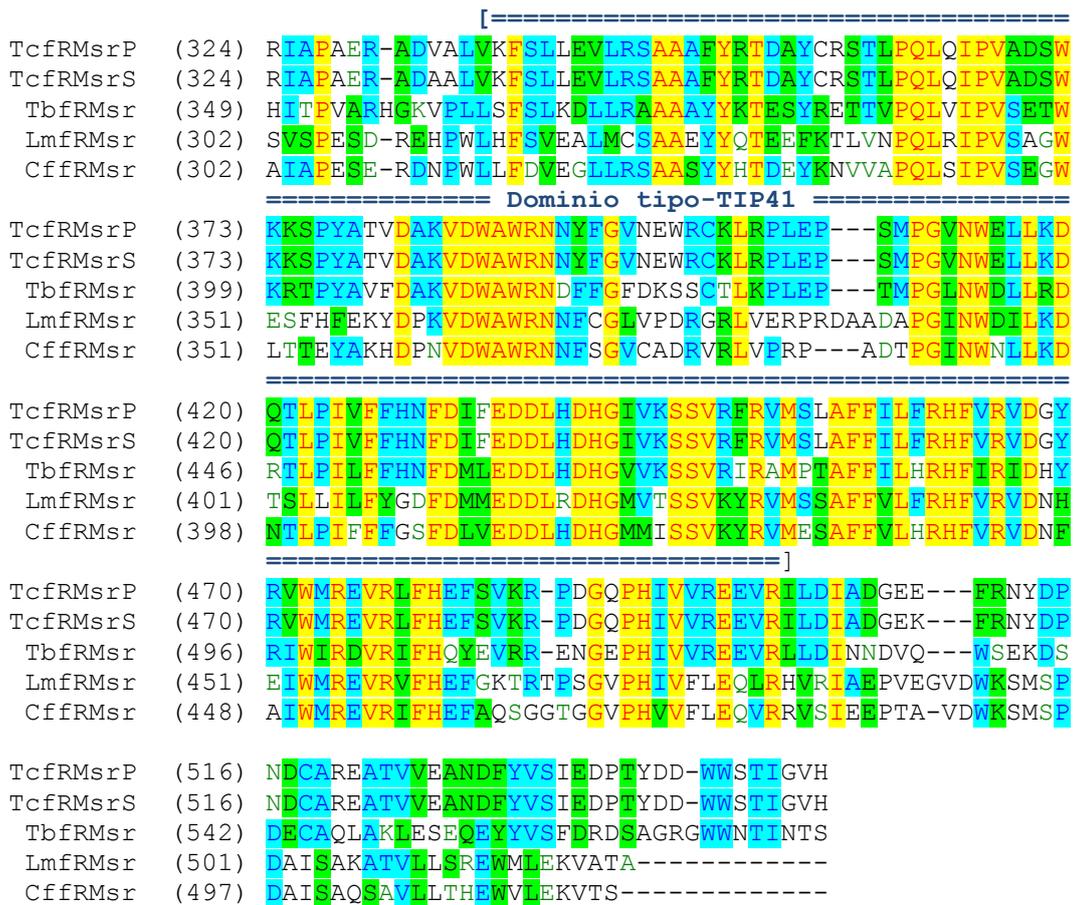


Figura 4.2.1: Alineamiento de las secuencias primarias de distintas fRMsr de tripanosomátidos. Tc: *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.509601.120; TcCLB.509767.120), Tb: *Trypanosoma brucei* (Tb927.5.1250), Lm: *Leishmania major* (LmjF.23.1460) y Cf: *Crithidia fasciculata* (CfaC1_22_2510). Entre paréntesis se indica el GENE ID de la base de datos TriTrypDB. En la figura se indica la posición de los dominios GAF y TIP41 de las proteínas de *T. cruzi*. Los * marcan las cisteínas conservadas, presentes en el sitio activo del dominio GAF.

En levaduras la proteína TIP41 participa en la regulación de la vía TOR. Este es un camino de señalización intracelular que se encuentra activo bajo condiciones favorables de crecimiento, como por ejemplo cuando existe plenitud de nutrientes. Cuando la vía TOR se inhibe, TIP41 se desfosforila y se une a TAP42. Esta unión genera que TAP42 se separe de ciertas fosfatasa, activándolas. Estas enzimas luego desfosforilan factores de transcripción, activándolos y produciendo la expresión de sus genes blancos (figura 4.2.2) (Jacinto y col., 2001).

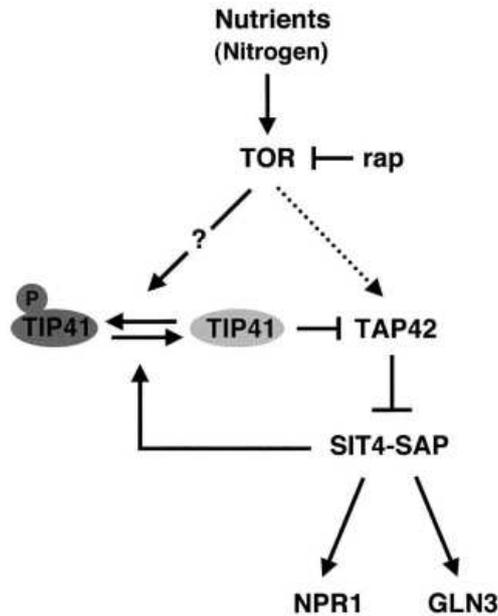


Figura 4.2.2: Modelo de la acción de TIP41 en la cascada de señalización TOR en *S. cerevisiae*. Imagen tomada de (Jacinto y col., 2001).

Al momento se han descrito algunos de los componentes iniciales de la vía TOR en tripanosomátidos, pero se desconoce si los procesos corriente abajo tienen alguna similitud con los reportados en levaduras (Saldivia y col., 2013). De estar presente esta vía en tripanosomátidos, es factible suponer que deben existir diferencias sustanciales en cuanto a la forma de activación de los productos finales del proceso, ya que en estos organismos no existe regulación a nivel de la expresión génica. Es interesante observar que esta vía se comporta de manera diferente en distintos tipos de células. En células de mamífero, TIPRL (el homólogo de TIP41), aparenta cumplir un rol activador de la vía TOR, al contrario de lo que ocurre en levaduras (Nakashima y col., 2013). Es por este motivo que difícilmente se puedan hacer inferencias acerca de la funcionalidad del dominio TIP41 de las *TcfRMs* solo por analogía con otros modelos biológicos.

En la figura 4.2.1 se observa que los dominios GAF y TIP41 de la *TcfRMs* se encuentran separados por una región conectora. La misma tiene una longitud variable y una baja conservación entre las *fRMs* de distintos tripanosomátidos. Sin embargo, en todos estos casos constituye una región reconocida como “de alto desorden” por parte de predictores estructurales como el POODLE-L (Hirose y col., 2007) (<http://mbs.cbrc.jp/poodle/poodle.html>) (figura 4.2.3). Este tipo de regiones no poseen un plegamiento preciso y definen zonas de alta movilidad en la cadena polipeptídica. La posibilidad de adoptar múltiples conformaciones y de poseer amplias zonas de contacto superficiales, les confiere la capacidad de interaccionar, de manera

específica, con múltiples compañeros proteicos y de esta forma pueden participar en procesos biológicos relevantes como ser la transducción de señales (Dunker y col., 2005).

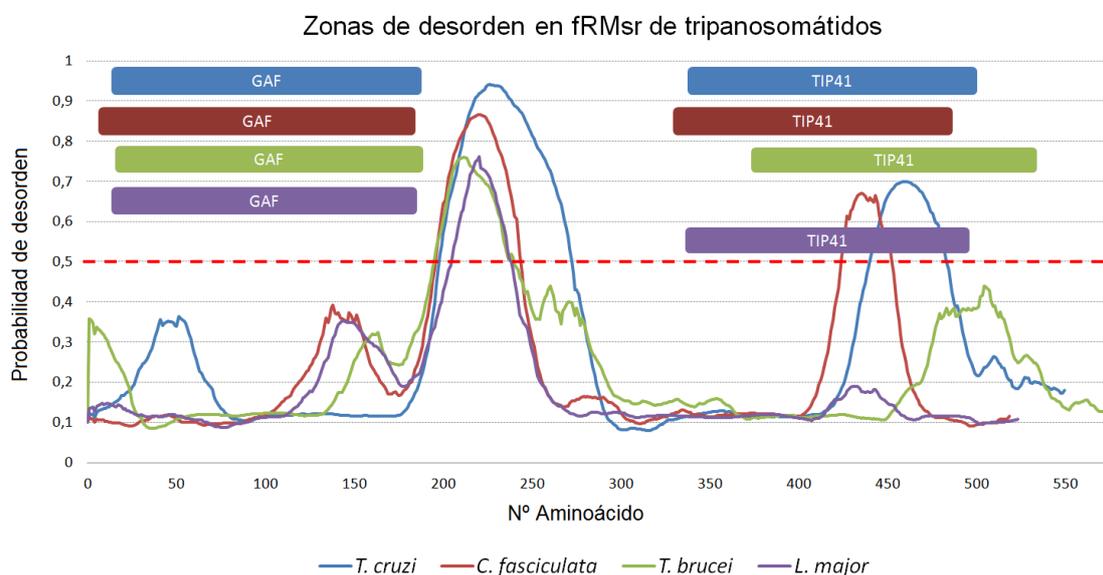


Figura 4.2.3: Análisis de regiones desordenadas en las fRMs de tripanosomátidos utilizando el algoritmo POODLE-L (Hirose y col., 2007). Las zonas con una probabilidad mayor a 0,5 se consideran desordenadas. Se indica de forma gráfica la localización, en la secuencia primaria, de los dominios presentes en las proteínas.

4.2.2. Ensayos de complementación en levadura

Para iniciar el estudio de la actividad de las *TcfRMs* se amplificó mediante PCR la secuencia codificante para uno de los alelos (*TcfRMsP*). La información para el diseño de los cebadores se obtuvo de la base de datos TriTrypDB (<http://www.tritrypdb.org>) donde el gen se encuentra bajo el número de identificación TcCLB.509601.120. El marco abierto de lectura fue clonado entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III del vector p425-GPD (Mumberg y col., 1995). La construcción fue introducida en células de *S. cerevisiae* GY202 deficientes en los genes codificantes para los tres tipos de Msr (*MATa his3 leu2 met15 ura3 ΔmsrA::URA3 ΔmsrB::KAN ΔfRmsr::HIS3*) (Le y col., 2009) mediante el método del acetato de litio. Las transformantes fueron seleccionadas por reversión de la auxotrofia de leucina. Los ensayos de complementación se realizaron en medio mínimo YNBD agarizado, en presencia de Met 100 μ M o Met-R,S-SO 200 μ M. Como control se utilizó la misma cepa de levadura transformada con el plásmido sin insertos.

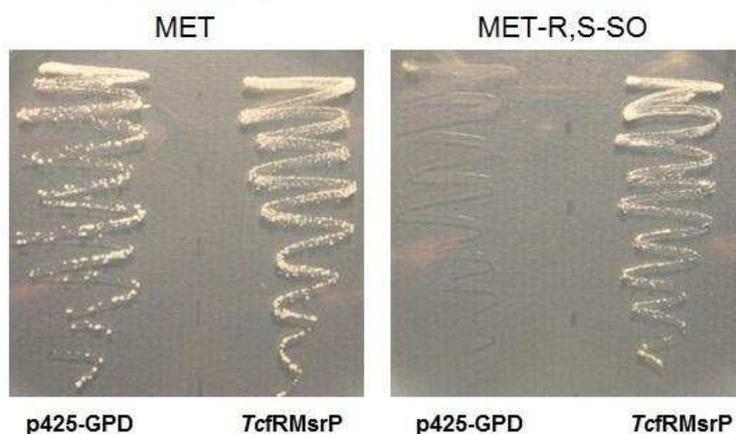


Figura 4.2.4: Complementación en la cepa GY202, mutante en las Msr endógenas de *S. cerevisiae*. La cepa se transformó con el plásmido p425-GPD vacío o conteniendo la TcfRMsP. Las células se estiraron en placas de YNBD agarizado, conteniendo Met 100 μ M o Met-R,S-SO 200 μ M.

La cepa GY202 es deficiente en los genes codificantes para sus Msr endógenas, pero además es auxótrofa para metionina y leucina. Es decir, es incapaz de sintetizar dichos aminoácidos y requiere de una fuente externa de los mismos. Al transformar las células con el vector p425-GPD, la auxotrofia por leucina es revertida. Esta es la base del principio de selección para las transformantes que contengan el plásmido. En esta instancia, las levaduras aún requieren el agregado de una fuente de metionina en el medio de cultivo. De existir dentro de la célula una Msr activa, frente a Met-SO no peptídica, dicho requerimiento puede suplantarse por la presencia de metionina sulfóxido. Como se observa en la figura 4.2.4, las levaduras transformadas con el plásmido vacío fueron incapaces de desarrollarse en un medio conteniendo Met-SO. Sin embargo, cuando el plásmido contuvo la TcfRMsP se apreció crecimiento en la placa. Este resultado confirma la presunción de que el gen TcCLB.509601.120, anotado como proteína hipotética, codifica para un tipo de metionina sulfóxido reductasa funcional.

El siguiente paso fue evaluar si el dominio TIP41 es necesario para la actividad Msr de la enzima. Para esto se amplificaron por PCR dos regiones de la proteína. La porción N-terminal, conteniendo el dominio GAF, se denominó TcfRMsP(G) y consistió de los aminoácidos 1 al 187. Por otro lado, la porción C-terminal, conteniendo la región conectora y el dominio TIP41, se denominó TcfRMsP(T) y consistió de los aminoácidos 188 al 549. Ambas regiones se introdujeron en el plásmido p425-GPD de forma similar a lo descrito anteriormente.

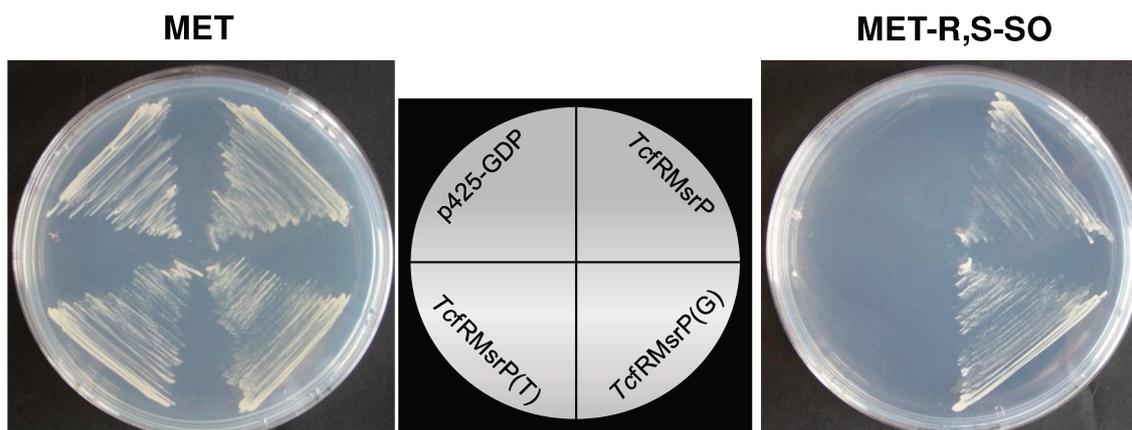


Figura 4.2.5: Complementación en la cepa GY202, mutante en las Msr endógenas de *S. cerevisiae*. La cepa se transformó con el plásmido p425-GPD vacío, con la TcfRMsP completa o con las regiones N-terminal₁₋₁₈₇ [TcfRMsP(G)] y C-terminal₁₈₈₋₅₄₉ [TcfRMsP(T)] de la enzima. Las células se estriaron en placas de YNBD agarizado, conteniendo Met 100 μ M o Met-R,S-SO 200 μ M.

Los resultados presentados en la figura 4.2.5 señalan que la región N-terminal de la enzima (aminoácidos 1-187) es la responsable *per se* de la actividad Msr de la proteína. Por otra parte, la región correspondiente al dominio TIP41 es incapaz de complementar el fenotipo de la levadura mutante. Este dominio, entonces, es dispensable para la actividad Msr, debiendo cumplir una función accesoria aún desconocida.

Finalmente, se pudo resolver la mezcla racémica mediante un protocolo basado en la precipitación diferencial de los isómeros R y S de la Met-SO con ácido pícrico (Lavine, 1947). El isómero S se obtuvo con una pureza adecuada como para ser utilizado en los ensayos de complementación. En la figura 4.2.6 se comprueba que la TcfRMsP es específica para la reducción del isómero R de la Met-SO ya que la cepa transformada con la proteína completa, así como con su dominio catalítico, creció en presencia de la mezcla racémica pero fue incapaz de hacerlo cuando la placa contenía solo el isómero S. En el mismo ensayo, se utilizó una construcción que expresa la TcMsrA (que actúa sobre el isómero S) la cual sí evidenció crecimiento en dicha condición, en concordancia con lo reportado previamente (Arias y col., 2011). Actuando en conjunto, la TcfRMsP y la TcMsrA son capaces de revertir completamente la oxidación sobre las metioninas libres, confiriendo al parásito una mayor biodisponibilidad de metionina para la síntesis de proteínas y diversos metabolitos.

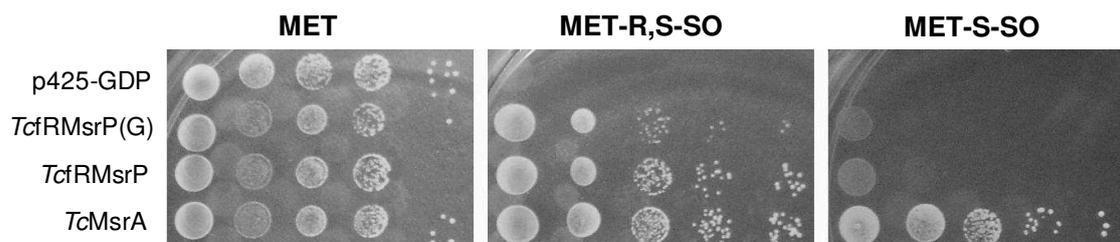


Figura 4.2.6: Complementación en la cepa GY202, mutante en las Msr endógenas de *S. cerevisiae*. La cepa se transformó con el plásmido p425-GPD vacío, con la región N-terminal₁₋₁₈₇ de la TcfRMsP [TcfRMsP(G)], con la TcfRMsP completa o con la TcMsA. Las células se depositaron en placas de YNBD agarizado, conteniendo Met 100 μ M, Met-R,S-SO 200 μ M o Met-S-SO 100 μ M. Los inóculos se normalizaron a una DO = 1, se realizaron diluciones seriadas al medio y se sembraron 10 μ l de cada una.

4.2.3. Detección de la TcfRMsP en extractos del parásito.

Como se detallará en la sección 4.2.5, la TcfRMsP se produjo de forma recombinante, fue purificada y se utilizó para la obtención de un antisuero policlonal de conejo. Los anticuerpos del suero se purificaron mediante un protocolo de afinidad. En dicho proceso, las versiones truncas de la proteína [TcfRMsP(G) y TcfRMsP(T)] se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa y se utilizaron para capturar los anticuerpos presentes en el suero. Los anticuerpos eluidos y concentrados, no evidenciaron reacción cruzada y resultaron específicos para cada uno de los dominios de la enzima (figura 4.2.7).

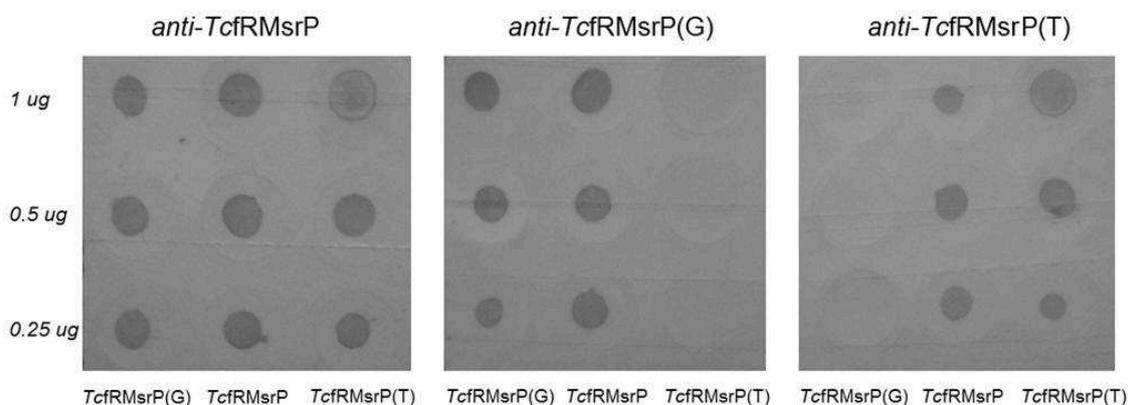


Figura 4.2.7: Especificidad de los anticuerpos purificados evaluada por "dot blot". La imagen muestra tres membranas donde se inmovilizaron distintas cantidades de la TcfRMsP recombinante o las regiones N-terminal₁₋₁₈₇ [TcfRMsP(G)] y C-terminal₁₈₈₋₅₄₉ [TcfRMsP(T)] de la enzima. Las membranas se enfrentaron al antisuero total (anti-TcfRMsP) o a los anticuerpos purificados contra cada región. Posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP y se reveló el ensayo por el método de precipitación de la diaminobenzidina.

Los anticuerpos obtenidos se utilizaron para evaluar el nivel de expresión de la TcfRMsP en distintos estadios del ciclo de vida del parásito. Como se observa en la figura 4.2.8 la mayor señal total se evidenció en amastigotes y epimastigotes, estadios replicativos en el mamífero y en el insecto vector respectivamente. La menor señal se detectó en tripomastigotes derivados de células. Este resultado concuerda con los

datos transcriptómicos, extraídos para esta proteína, del trabajo presentado por Minning y colaboradores (Minning y col., 2009). El peso molecular esperado para la *TcfRMsP* es de aproximadamente 62 kDa (figura 4.2.8 – panel izquierdo). En los *westerns* se aprecia una banda a dicha altura, la cual coincide con el patrón (proteína recombinante). Sin embargo, en epimastigotes y tripomastigotes se evidenciaron también bandas menores a 30 kDa. Al revelar la membrana utilizando los anticuerpos contra la región N-terminal dichas señales volvieron a identificarse (figura 4.2.8 - panel central). De manera opuesta, los anticuerpos contra la porción C terminal solo detectaron la banda de 62 kDa (figura 4.2.8 – panel derecho).

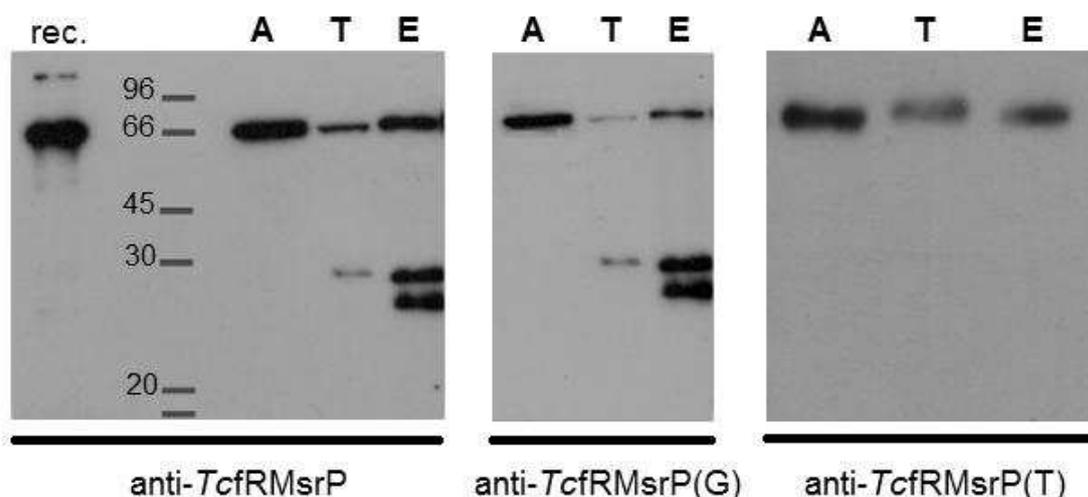


Figura 4.2.8: Detección de la *TcfRMsP* en distintos estadios de vida del parásito. (A) amastigote, (T) tripomastigote, (E) epimastigote y rec (proteína recombinante). Se sembraron 20 µg de extracto total por calle. Las membranas fueron incubadas con el antisuero policlonal o con los anticuerpos purificados contra cada dominio según se indica. Posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP y se reveló el ensayo por quimioluminiscencia.

Se realizaron numerosos ensayos, en epimastigotes, para evaluar la expresión de la proteína a lo largo de la curva de crecimiento y en distintas condiciones de estrés y de cultivo. La intensidad de la señal total no pareció alterarse, sin embargo, el patrón de aparición de las bandas de menor tamaño fue muy variable. Llamativamente el proceso de proteólisis parcial de la proteína fue poco reproducible, ya que ensayos desarrollados en condiciones similares brindaron resultados dispares. En ocasiones se obtuvo solo la banda de 66 kDa y otras veces solo la de 25 kDa. Al momento, no se pudo identificar el motivo (o señal) que desencadena este comportamiento. Se tomaron diversas medidas (inhibidor de proteasas, preparación *in situ* de las muestras) para descartar que este proceso se deba a una degradación de la proteína originada durante la preparación de los extractos. Resultados preliminares indicarían que la proteólisis está regulada por la fase de crecimiento y por la disponibilidad de nutrientes, sin embargo los ensayos no son concluyentes. En varias ocasiones se

obtuvo un patrón de bandas en escalera, de menor intensidad, entre las señales de 25 y 62 kDa, que se asemejan a las que aparecen cuando las proteínas son blanco de modificaciones postraduccionales, como ser la ubiquitinación o sumolización. Al respecto el predictor UbPred (<http://www.ubpred.org>) localiza 5 posibles sitios de ubiquitinación en la secuencia de la *TcfRMsP* (K15, K217, K221, K232 Y K234). De forma llamativa cuatro de estos sitios se encuentran formando parte de la región conectora, exactamente en la zona de mayor desorden de la misma (figura 4.2.2). Se ha reportado que el proteosoma suele iniciar la degradación en zonas desestructuradas de las proteínas, cerca de sitios de ubiquitinación (Inobe y col., 2011) y que este proceso también puede ocurrir en sitios internos presentes entre dos dominios con plegamiento definidos (Kraut y Matouschek, 2011). A pesar que la acción del proteosoma generalmente lleva a la degradación total de la proteína blanco, se han estudiado algunos eventos de proteólisis parcial, que forman parte de procesos de señalización celular (Rape y Jentsch, 2002). Sería interesante evaluar si la *TcfRMsP* podría estar sufriendo un procesamiento similar y cuál sería la función biológica de dicho evento. Al notar la posibilidad de que la enzima de *T. cruzi* se halle ubiquitinada se indagó en datos generados por estudios proteómicos en levaduras y se encontró que la *ScfRMsP* presenta dos sitios de ubiquitinación detectados experimentalmente (K98 y K175) (Swaney y col., 2013), sin embargo, no existen reportes acerca de su función. Es interesante comentar que los niveles de la enzima de levadura también aparentan estar regulados por su interacción con SUMO, ya sea directa o indirectamente (Srikumar y col., 2013). Al analizar la secuencia de la enzima de *T. cruzi* con un predictor de sitios de sumolización (<http://sumosp.biocuckoo.org>) detectamos dos regiones con una muy alta probabilidad de unión a SUMO (aminoácidos 118 a 122 y 499 a 503), por lo que es interesante a futuro evaluar también esa posibilidad.

Otras proteínas responsables de la proteólisis observada podrían ser las calpaínas. Estas enzimas son proteasas conocidas por participar en vías de señalización mediante proteólisis limitada de sus blancos, generando productos biológicamente activos. Al respecto, en células de mamífero, la proteína alpha4 (homólogo de TAP42), es sustrato de esta proteasa, evento que modifica su funcionalidad (Watkins y col., 2012). Recordando, en levaduras TAP41 interacciona con TAP42 inhibiendo la vía TOR. Predictores de sitios de corte de calpaínas (<http://www.ccd.biocuckoo.org>) identifican sitios con alta probabilidad de corte en la *TcfRMsP*, especialmente en la región conectora. El mayor puntaje se asigna al corte luego del aminoácido 235. En tripanosomátidos se encuentra presente un grupo

inusualmente extenso de calpaínas (Ersfeld y col., 2005), aunque no se han reportado si alguna funciona como proteasa, si se ha comprobado que participan en eventos como remodelación del citoesqueleto, diferenciación o ciclo celular (d'Avila-Levy y col., 2006; Liu y col., 2009; Olego-Fernandez y col., 2009; Sangenito y col., 2009; Ennes-Vidal y col., 2011; Marinho y col., 2014).

Finalmente, existe la posibilidad de que la *TcfRMs*r se encuentre regulada por el ciclo celular. Al respecto, en *Saccharomyces pombe*, TIP41 aparenta regular eventos del ciclo celular (Fenyvuesvolgyi y col., 2005). Por otro lado, análisis de gran escala utilizando microarreglos indican que en *S. cerevisiae* los niveles de la *ScfRMs*r se hallan regulados por este proceso (Pramila y col., 2006). Dicha enzima esta posicionada en el puesto número 137 entre todas las proteínas del organismo en lo que respecta a una posible regulación por ciclo celular (<http://webapps.fhcrc.org/labs/noble/cellcycle/getOrf.php?orf=YKL069W>).

Los resultados obtenidos, y los antecedentes en otros organismos, hacen pensar que la proteólisis parcial de la *TcfRMs*r se trataría de un proceso regulado, dinámico y multifactorial, originando resultados distintos de acuerdo a cual sea la condición celular al momento de iniciar la experiencia. Es probable que sea necesario simplificar algunas variables internas (inhibir la degradación proteica, transcripción o ciclo celular) para develar el mecanismo puesto en juego. Por último, como la organización de dominios en esta proteína está conservada entre los tripanosomátidos, se realizaron ensayos de *western blot* en *C. fasciculata*. Se obtuvo el mismo patrón de bandas y llamativamente la misma variación en cuanto a reproducibilidad de los resultados. Lo que indicaría que el proceso que afecta la proteólisis de la enzima podría estar conservado en kinetoplastidos. Hay que agregar, que *C. fasciculata* aparenta ser un mejor modelo para estudiar este proceso, ya que posee un tiempo de crecimiento más corto, existe la posibilidad de utilizar medios definidos y no requiere el agregado de suero. Este último punto es importante ya que no resulta necesario acondicionar los parásitos (lavado) y los extractos pueden obtenerse de forma directa, disminuyendo una posible causa de variabilidad.

4.2.3. Localización subcelular de la *TcfRMs*r.

En *S. cerevisiae*, *ScfRMs*r y TIP41 presentan una localización subcelular dual, encontrándose tanto en el citoplasma como en el núcleo (Huh y col., 2003). Incluso, la abundancia relativa de la *ScfRMs*r residente en el núcleo aparenta aumentar luego de un estrés asociado a la replicación del ADN (Tkach y col., 2012). Un ensayo de inmunolocalización en epimastigotes de *T. cruzi* aparentó indicar que la *TcfRMs*r tiene

localización citoplasmática. Sin embargo, dada la imposibilidad de controlar por el momento el evento de proteólisis de la proteína, este resultado no es concluyente y la señal observada probablemente constituya un promedio de las localizaciones de la proteína completa y sus dominios individuales. Para evaluar si las bandas obtenidas en los *western blot* presentaban una localización diferencial, se realizó un ensayo de permeabilización controlada con digitonina. En la figura 4.2.9 puede observarse que las bandas de mayor tamaño aparentan tener una localización citoplasmática, mientras que los productos de menor tamaño estarían dentro de estructuras vesiculares. Este resultado preliminar indicaría que el evento de proteólisis podría estar asociado a un cambio en la disposición de los dominios liberados.

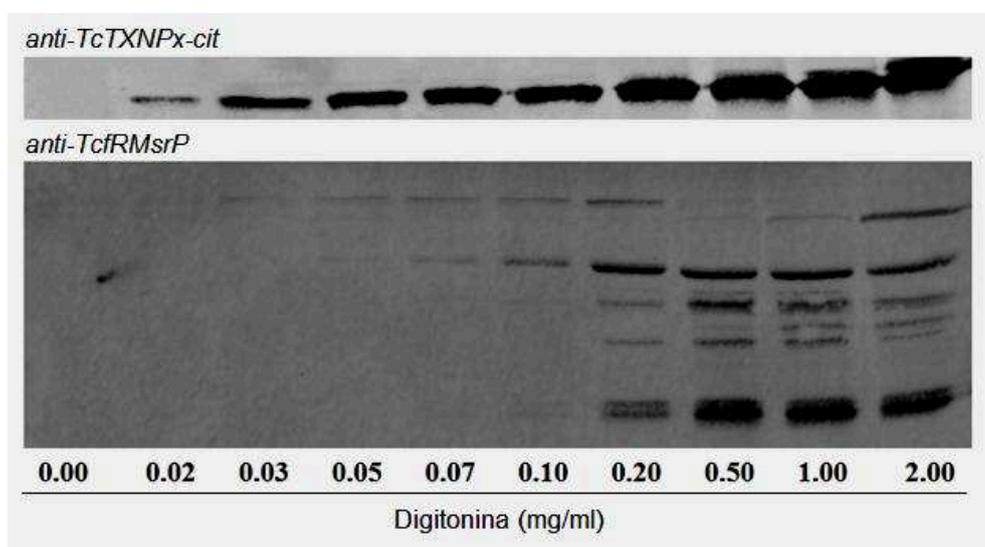


Figura 4.2.9: Ensayo de permeabilización con digitonina de epimastigotes de *T. cruzi*. El mismo número de células fue tratado con diferentes concentraciones de digitonina para producir una lisis selectiva (dosis dependiente) de las células y su sistema de endomembranas. Posteriormente cada tubo fue centrifugado y se sembró una alícuota del sobrenadante en cada calle del gel. Se realizó la transferencia y la membrana se incubó con un anticuerpo primario anti-TcfRMsP y uno secundario anti-IgG de conejo conjugado a FITC. El revelado se realizó en un escáner de fluorescencia. En forma paralela, se utilizó un anticuerpo anti-TcTXNPx para identificar la concentración de detergente necesaria para iniciar la liberación de las proteínas citoplasmáticas.

4.2.4. Fosforilación de la TcfRMsP.

Análisis a gran escala identificaron que en *S. cerevisiae* la proteína ScTIP41 se encuentra fosforilada en al menos cuatro residuos T6 (Smolka y col., 2007; Soulard y col., 2010), T55 (Albuquerque y col., 2008; Holt y col., 2009), S79 (Bodenmiller y col., 2010) y S169 (Helbig y col., 2010). Es interesante notar que la fosforilación en la T55 parece estar regulada por el ciclo celular (Holt y col., 2009). Como se mencionó anteriormente la ScTIP41 participa de la vía TOR y aparenta ser desfosforilada en respuesta a una inactivación de la misma, por ejemplo frente a una disminución de los nutrientes disponibles (Jacinto y col., 2001). Con respecto a la ScfRMs, no existen

reportes de que la enzima de levadura se encuentre fosforilada. A la vista de estos antecedentes se quiso evaluar si la *TcfRMsP* era blanco de dicha modificación postraduccional.

La *TcfRMsP* recombinante no pudo obtenerse de forma soluble a no ser que se encontrara fusionada a otra proteína solubilizante (sección 4.2.5). Por este motivo, luego de expresarla utilizando el vector pMAL, la enzima fue purificada como una fusión a la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP). Esta proteína de fusión se empleó para evaluar si extractos del parásito eran capaces de fosforilarla utilizando ATP marcado. Se utilizaron dos extractos, uno proveniente de epimastigotes cultivados en condiciones normales y otro de células mantenidas previamente en PBS-glucosa por 24 hs (estrés nutricional). Cuando las células fueron mantenidas en PBS-glucosa, las mismas se adhirieron fuertemente al frasco de cultivo. Se cree que esta conducta es la situación inicial del proceso de metaciclogénesis (Ferreira y col., 2008). En la figura 4.2.10, se observa que en la calle correspondiente a la fosforilación de las proteínas del extracto de epimastigotes cultivados en condiciones normales (calle 5) aparece una banda predominante, aproximadamente de 55 kDa. En trabajos anteriores, esta banda ha sido identificada como α -tubulina (Casas y col., 2002). Dicha señal desaparece en los extractos provenientes de parásitos estresados nutricionalmente (calle 11). Un comportamiento similar fue reportado cuando tripomastigotes derivados de células se ponen en contacto con superficies tratadas con fibronectina o laminina (Mattos y col., 2012). En lo referido a la *TcfRMsP*, la enzima se fosforila por acción de ambos extractos. Los controles realizados dan nota que la modificación se produce en la proteína de *T. cruzi* y no en la fusión (MBP). Además la fosforilación es dependiente de la presencia del extracto (no hay autofosforilación). Por otro lado, ambos extractos ensayados fosforilan la enzima con igual eficiencia. Se cree que la α -tubulina del parásito es fosforilada por una quinasa tipo-CK2 (Casas y col., 2002). Teniendo en cuenta que la *TcfRMsP* es fosforilada por extractos de células estresadas y la α -tubulina no, podemos descartar la participación de ese tipo de quinasas en la fosforilación de la enzima.

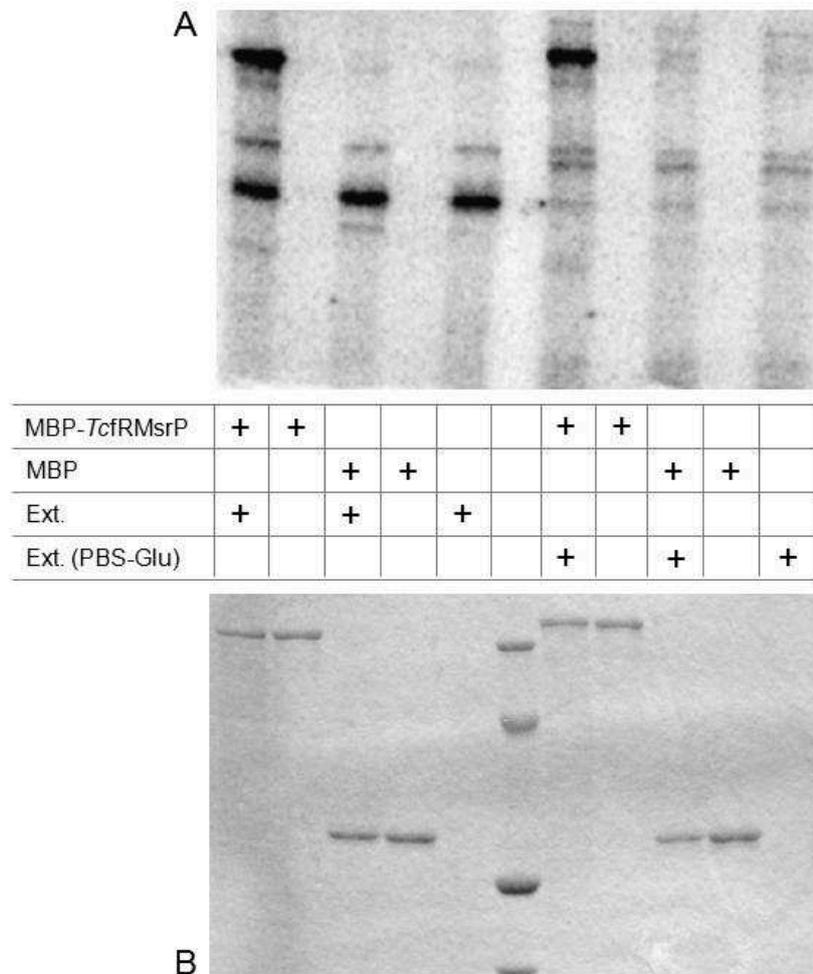


Figura 4.2.10: Fosforilación de la *TcfRMsP* mediada por extractos de epimastigotes. Se emplearon 2 μg totales de extracto y 2 μg de cada proteína recombinante. El volumen final de la reacción fue de 20 μl conteniendo las siguientes concentraciones finales: 50 mM Hepes (pH 7,2), 10 mM MgCl_2 y 100 μM [γ - ^{32}P]ATP (actividad específica \approx 6000 cpm/pmol). Las reacciones fueron incubadas por 20 min a 30 $^\circ\text{C}$ y terminadas hirviéndolas con buffer de SDS-PAGE 4X. Ext (extracto de células crecidas en condiciones normales), Ext (PBS-Glu) (extracto de células crecidas en condiciones normales y luego incubadas por 24 horas en buffer PBS-Glucosa). A) Se sembraron 10 μl de cada reacción en un gel SDS-PAGE al 10 %. La figura muestra la autoradiografía del gel utilizando una placa "storage phosphor" y un escáner Typhoon. B) Tinción por coomassie blue del mismo gel descrito en A.

En un segundo ensayo se busco evaluar en qué dominio de la *TcfRMsP* se producía la fosforilación. Con ese objetivo se expresaron los dominios GAF [*TcfRMsP*(G)] y TIP41 [*TcfRMsP*(T)] de forma separada, como proteínas fusionadas a la MBP. Como se observa en la figura 4.2.11, ambos dominios fueron fosforilados por el extracto del parásito. Este resultado indica que la enzima posee al menos dos sitios de fosforilación. Un estudio proteómico realizado de forma resiente identifica tres sitios de fosforilación en el homólogo de *T. brucei* (S4, T9 y S299) (Urbaniak y col., 2013). Si bien esos residuos no están conservados en la *TcfRMsP*, si están asociados a los dos dominios presentes en la proteína, lo que concuerda con los resultados obtenidos para la enzima de *T. cruzi*.

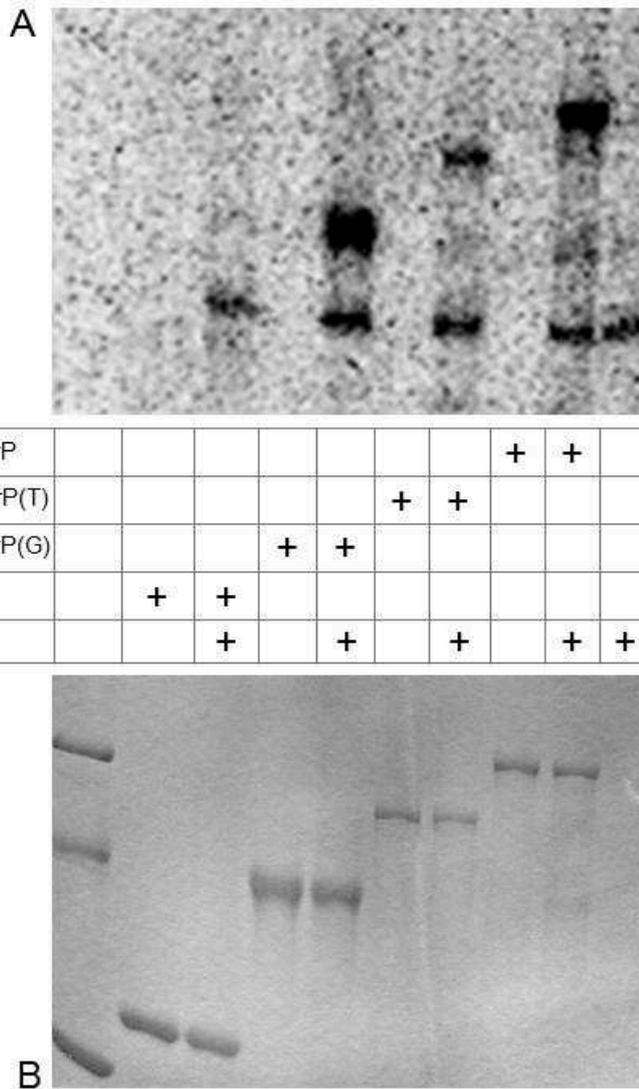


Figura 4.2.11: Fosforilación de la TcfRMsP y sus dominios individuales [TcfRMsP(G), región N-terminal₁₋₁₈₇ y TcfRMsP(T), región C-terminal₁₈₈₋₅₄₉]. Se emplearon 2 μ g totales de extracto y 2 μ g de cada proteína recombinante. El volumen final de la reacción fue de 20 μ l conteniendo las siguientes concentraciones finales: 50 mM HEPES (pH 7,2), 10 mM MgCl₂ y 100 μ M [γ -³²P]ATP (actividad específica \approx 6000 cpm/pmol). Las reacciones fueron incubadas por 20 min a 30 °C y terminadas hirviéndolas con buffer de SDS-PAGE 4X. Se empleó un extracto de células crecidas en condiciones normales. A) Se sembraron 10 μ l de cada reacción en un gel SDS-PAGE al 10 %. La figura muestra la autoradiografía del gel utilizando una placa "storage phosphor" y un escáner Typhoon. B) Tinción por coomassie blue del mismo gel descrito en A.

4.2.5. Obtención de distintas versiones de TcfRMsP recombinante.

La información presente en la base de datos TritypDB indica que el gen *tcfmsrP* (TcCLB.509601.120) tiene 1650 pb y codifica para una proteína (TcfRMsP) de 549 aminoácidos, con un masa molecular calculada de 61,410 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 5,61. Con el objetivo de obtener la proteína de forma recombinante se diseñaron cebadores específicos que poseían los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III (marco de lectura +1). La secuencia codificante para la proteína fue amplificada a partir de ADN genómico mediante PCR. El producto de la reacción se ligó al vector

pGEM-T Easy y la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de *E. coli* Top10 utilizando el método del CaCl₂. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico, a partir de clones individuales, y la secuencia esperada para el inserto fue confirmada por secuenciación total. Finalmente, se utilizaron los sitios de restricción incluidos en los cebadores para sub-clonar los insertos en el vector pRSET-A y transformar con dichas construcciones, mediante el método de CaCl₂, células competentes de *E. coli* BL21(DE3). La proteína se expresó de forma insoluble en todas las condiciones ensayadas. Por este motivo y sumado a que los resultados obtenidos indicarían que los dominios se encuentran de forma aislada dentro del parásito (al menos parcialmente), se decidió obtenerlos de forma individual. Se diseñaron oligonucleótidos para generar las construcciones descritas en la tabla 4.2.1, utilizando los mismos sitios de restricción que en el caso anterior.

Construcción	Descripción	Solubilidad / Uso
pRSET-A/TcfRMsP	Alelo P completo	Insoluble
pRSET-A/TcfRMsP(G)	Región N-terminal del alelo P. Aminoácidos 1-187 (Dominio GAF)	Soluble – Purificación de anticuerpos y ensayos catalíticos
pRSET-A/TcfRMsP(T)	Región C-terminal del alelo P. Aminoácidos 188-549 (conector y dominio TIP41)	Insoluble – Purificación de anticuerpos
pMAL-C2/TcfRMsP	Alelo P completo, fusionado a MBP	Soluble – Ensayos de fosforilación
pMAL-C2/TcfRMsP(G)	Región N-terminal del alelo P, fusionado a MBP. Aminoácidos 1-187 (Dominio GAF)	Soluble – Ensayos de fosforilación
pMAL-C2/TcfRMsP(T)	Región C-terminal del alelo P, fusionada a MBP. Aminoácidos 188-549 (conector y dominio TIP41)	Soluble – Ensayos de fosforilación
pRSET-A/TcfRMsS(G)	Región N-terminal del alelo S. Aminoácidos 1-187 (Dominio GAF)	Soluble – Ensayos catalíticos

Tabla 4.2.1: Listado de las distintas construcciones recombinantes realizadas para obtener la TcfRMsP o sus dominios individuales. En todos los casos se utilizó la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3) crecida en medio LB. La inducción se realizó a una DO: 0,6 con 0,5 mM IPTG durante 16 hs a 28 °C.

Las proteínas derivadas del vector pMAL-C2 se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columna de amilosa. La pureza de las proteínas obtenidas puede observarse en la figura 4.2.11.B. En los casos de las proteínas expresadas de forma soluble utilizando el vector pRSET-A, el proceso de purificación se realizó mediante IMAC a 8 °C con una columna *HiTrap chelating* de 1 ml (GE) cargada con Ni²⁺, utilizando un dispositivo *ÅKTAprime plus* (GE).

Para evaluar sus propiedades cinéticas de forma comparativa, también se obtuvo de forma aislada el dominio catalítico (GAF) del otro alelo de la enzima (TcCLB.509767.120). La figura 4.2.12 muestra la *TcfRMrP(G)* y la *TcfRMrS(G)* purificadas que se utilizaron en los ensayos catalíticos. El dominio GAF del alelo S se diferencia del P solo en dos cambios puntuales de su secuencia primaria. Estos corresponden a la aparición de prolinas en la posición de la L32 y la T64 del alelo P.

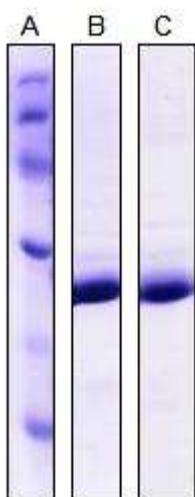


Figura 4.2.12: Análisis electroforético de los dominios GAF purificados para ambos alelos. **A)** Patrones de masa molecular (96, 66, 45, 30, 20 y 14 kDa). **B)** *TcfRMrP(G)*. **C)** *TcfRMrS(G)*

4.2.6. Ensayos de especificidad *in vitro*

Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* para comprobar que la *TcfRMrP(G)* y la *TcMrA* son capaces de revertir totalmente la oxidación de metioninas no peptídicas, actuando de forma complementaria sobre distintos isómeros de la Met-SO. Se iniciaron varias reacciones que luego fueron resueltas por cromatografía en capa delgada (TLC) y reveladas utilizando ninhidrina como reactivo cromogénico. Como se observa en la figura 4.2.13, ambas enzimas fueron incapaces, de forma separada, de convertir totalmente la mezcla racémica de Met-SO en metionina. Esto demuestra que estas proteínas utilizan diferentes sustratos. En cambio, en la calle correspondiente a la reacción donde estaban presentes ambas reductasas, solo se detectó la presencia de metionina, comprobando que el resultado anterior se debía a que las enzimas actúan sobre uno solo de los isómeros.

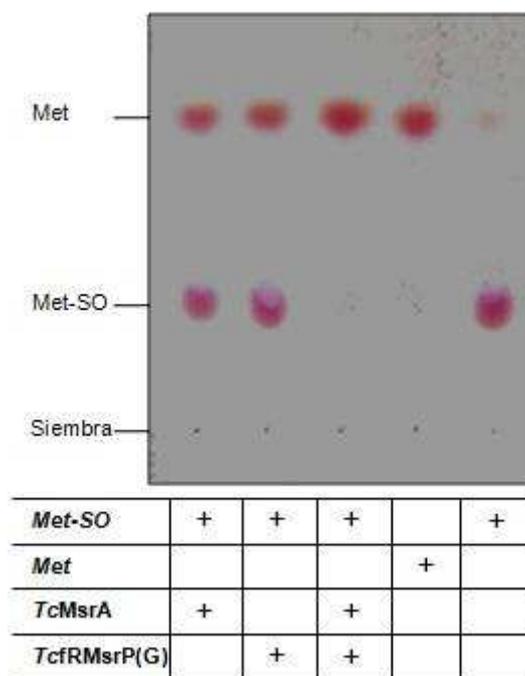


Figura 4.2.13: Actuación complementaria de la *TcfRMsP(G)* y la *TcMsrA*. Las diferentes reacciones se iniciaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo las siguientes concentraciones: 50 mM PBS (pH 7,5), 10 mM DTT, 1 mM Met-(R,S)-SO y 5 μ g de las proteínas recombinantes. La reacción se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 2 h. Finalmente se sembraron 6 μ l (3 x 2 μ l) de cada reacción en una placa de TLC. El solvente de corrida fue butanol/acido acético/agua (60/15/25). La placa se reveló mediante spray de ninhidrina. Los reactivos faltantes en cada reacción fueron reemplazados por el mismo volumen de PBS.

Para definir inequívocamente cual de los isómeros de la Met-SO es el sustrato de la *TcfRMsP*, se adaptó a las condiciones de laboratorio, una técnica de purificación para dichos compuestos (Lavine, 1947; Kumar y col., 2002). Se realizó un ensayo similar al descrito previamente pero utilizando los isómeros R y S purificados. La acción de las distintas Msr sobre su sustrato natural debería producir la desaparición de la señal correspondiente al sulfóxido y la aparición de una señal correspondiente a la metionina. En la figura 4.2.14 se aprecia claramente que este fue el caso cuando la *TcMsrA* se enfrentó al isómero S. Por otro lado, la *TcfRMsP(G)* tuvo un comportamiento análogo pero utilizando el isómero R como sustrato. Al igual que en el ensayo anterior, ninguna de las enzimas pudo, por separado, reducir completamente la mezcla racémica de Met-SO. Finalmente, ambas enzimas no denotan actividad residual cuando se alternan sus isómeros específicos, evidenciando de esta forma una alta selectividad.

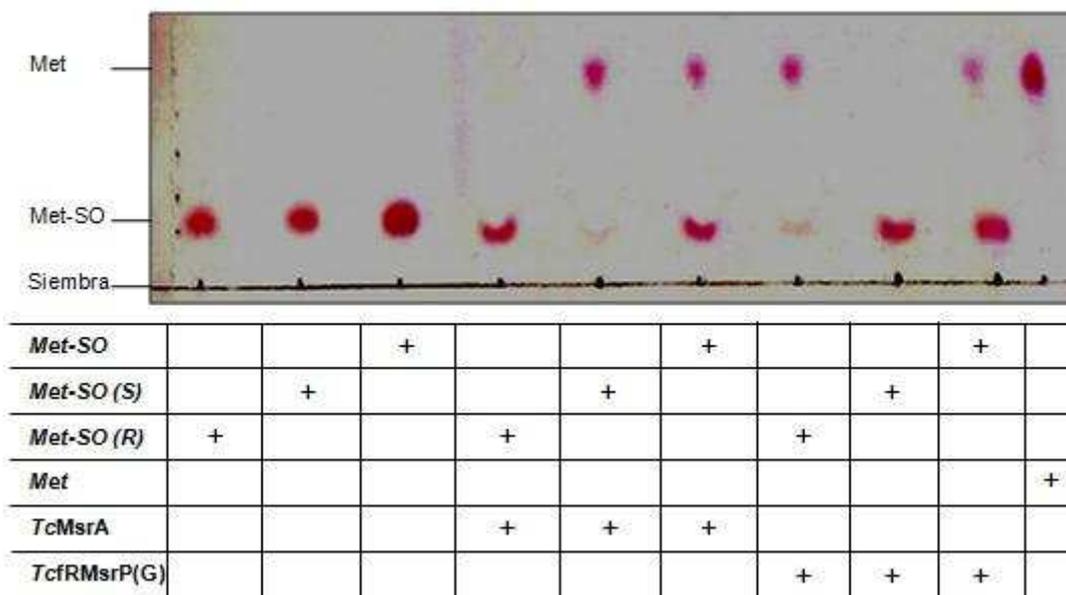


Figura 4.2.14: Especificidad de sustrato de las Msr de *T. cruzi*. Las diferentes reacciones se iniciaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo las siguientes concentraciones: 50 mM PBS (pH 7,5), 10 mM DTT, 1 mM Met-SO y 5 μ g de las proteínas recombinantes. La reacción se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 2 h. Finalmente se sembraron 6 μ l (3 x 2 μ l) de cada reacción en una placa de TLC. El solvente de corrida fue butanol/ácido acético/agua (60/15/25). La placa se reveló mediante spray de ninhidrina.

4.2.7. Ensayos cinéticos.

Con el fin de evaluar la actividad Met-R-SO reductasa de los dominios catalíticos de ambos alelos de la *TcfRMsP*, se empleó un sistema acoplado que permitió seguir la disminución de la absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADPH. Todos los componentes de la cascada de oxido-reducción empleada pertenecen al parásito, por lo que el proceso llevado a cabo *in vitro* sería una buena aproximación de los eventos que se producen de forma fisiológica. La cadena de transporte de electrones utilizada constó de cuatro etapas: 1) la reducción, dependiente de NADPH, de TS_2 a $T(SH)_2$ mediante la acción de la TR; 2) la reducción de *TcTXNI* a expensas de $T(SH)_2$; 3) reducción de la *TcfRMsP/S(G)* por la *TcTXNI* reducida y 4) reducción de Met-R-SO por acción de las enzimas estudiadas (figura 4.2.15).

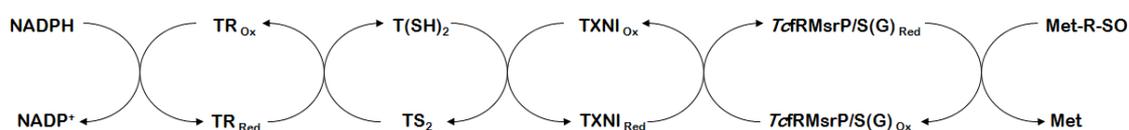


Figura: 4.2.15: Reacción acoplada utilizada para las medidas de actividad enzimática

Las actividades detectadas respondieron linealmente, dentro del rango evaluado, a la concentración de enzima utilizada en el ensayo (figura 4.2.16). No se detectó actividad cuando alguno de los componentes de la reacción fue omitido. Esto indica

que el sistema acoplado se comporta según lo esperado. Fue llamativo observar que a pesar de diferenciarse solo en dos aminoácidos, ambos alelos aparentaban tener un comportamiento diferente, siendo la *TcfRMsP(G)* marcadamente más activa.

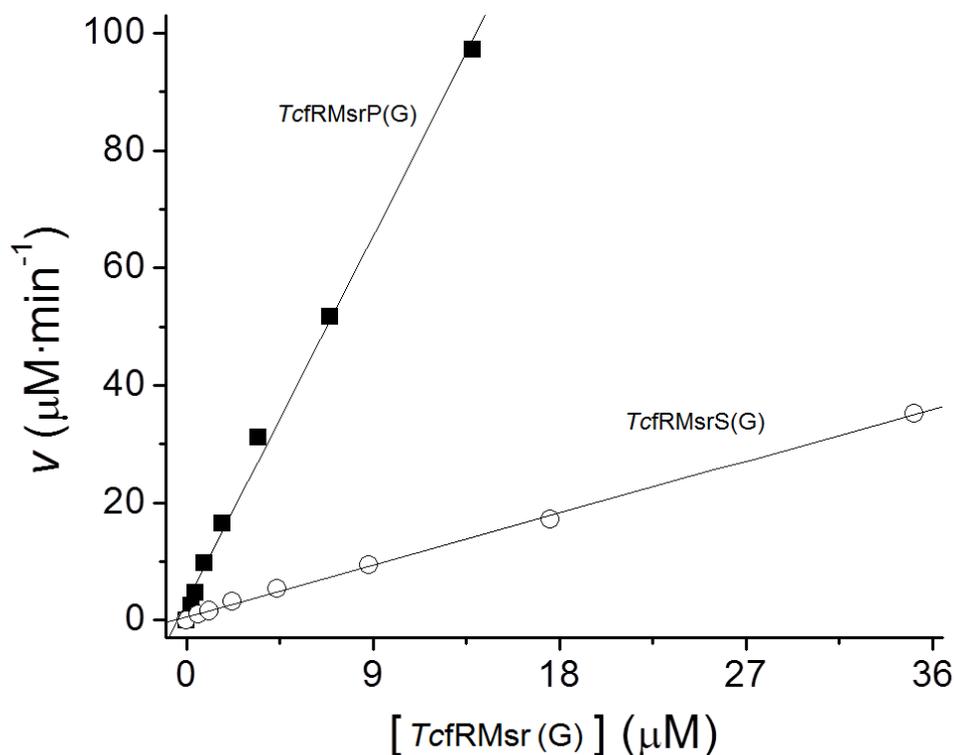


Figura 4.2.16: Respuesta a la concentración de enzima del sistema acoplado. Las medidas se realizaron a 30 °C en un volumen final de 50 μl, conteniendo: 100 mM TRIS-HCL (pH 7,5), 2 mM EDTA, 300 μM NADPH, 2 μM TcTR, 100 μM T(SH)₂, 8 μM TcTXNI, 5 mM Met-R-SO y distintas concentraciones de ambos dominios catalíticos. Los ensayos se realizaron monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm.

Para determinar los parámetros cinéticos de ambas enzimas se realizaron curvas variando la concentración de Met-R-SO (figura 4.2.17) y TcTXNI (4.2.18) de forma independiente. En la tabla 4.2.2 se listan los parámetros cinéticos calculados para ambos sustratos. La eficiencia catalítica del alelo P es comparable con los reportes previos para la fRMs de *E. coli* (Lin y col., 2007). Como se indicó anteriormente, la *TcfRMsP(G)* resultó más activa. La eficiencia catalítica frente a ambos sustratos fue aproximadamente 5 veces mayor para este alelo. Las diferencias de actividad se evidenciaron en los valores de k_{cat} , ya que la afinidad de las enzimas para ambos sustratos fue similar.

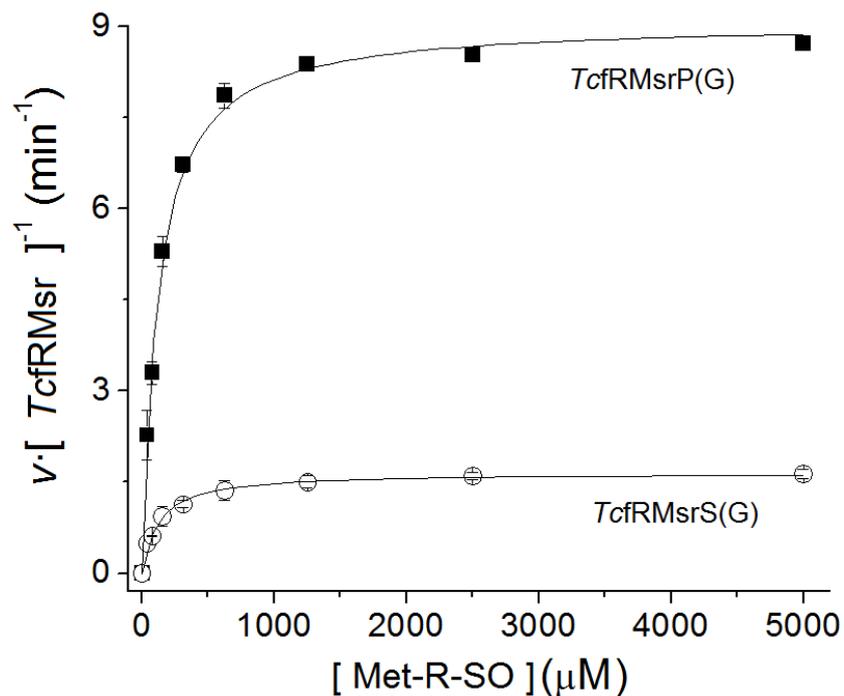


Figura 4.2.17: Cinética de la reducción de Met-R-SO para ambos dominios catalíticos de la TcfRMsP y la TcfRMsS. Las medidas se realizaron a 30 °C en un volumen final de 50 μl, conteniendo: 100 mM TRIS-HCL (pH 7,5), 2 mM EDTA, 300 μM NADPH, 2 μM TcTR, 100 μM T(SH)₂, 10 μM TcTXNI y distintas concentraciones de Met-R-SO. Los ensayos se realizaron monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm.

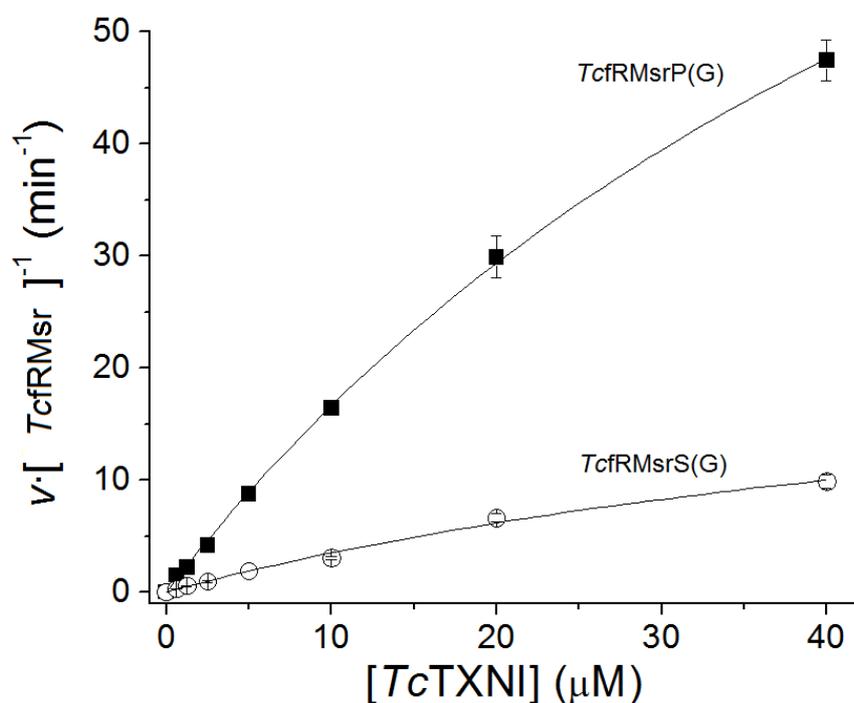


Figura 4.2.18: Cinética de la oxidación de TcTXNI para ambos dominios catalíticos de la TcfRMsP y la TcfRMsS. Las medidas se realizaron a 30 °C en un volumen final de 50 μl, conteniendo: 100 mM TRIS-HCL (pH 7,5), 2 mM EDTA, 300 μM NADPH, 2 μM TcTR, 100 μM T(SH)₂, 5 mM Met-R-SO y distintas concentraciones de TcTXNI. Los ensayos se realizaron monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm.

Enzima	Co-sustrato	Sustrato	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} · K _m ⁻¹ (M ⁻¹ · s ⁻¹)
TcfRMrP(G)	TcTXNI 10 μM	Met-R-SO	117 ± 7	9,1 ± 0,1	1,3 · 10 ³
TcfRMrS(G)			123 ± 16	1,65 ± 0,05	2,2 · 10 ²
TcfRMrP(G)	Met-R-SO 5 mM	TcTXNI	65 ± 4	125 ± 5	3,2 · 10 ⁴
TcfRMrS(G)			65 ± 10	26 ± 4	6,7 · 10 ³

Tabla 4.2.2: Parámetros cinéticos para los dominios catalíticos de ambos alelos de la *TcfRMr*

4.2.8. Titulación redox de la *TcfRMr*

Se realizó una titulación redox con el fin de comprobar si la diferencia de actividad entre ambos alelos se debía a cambios en sus propiedades termodinámicas. Durante su ciclo de catálisis las fRMr de tipo I reducen a la Met-R-SO por acción de su cisteína catalítica. En este proceso la cisteína pasa a un estado de ácido sulfénico, para finalmente formar un enlace disulfuro con la cisteína resolutive. Este puente disulfuro es estable y, en el caso de estar presente una redoxina, es reducido para regenerar la enzima y recomenzar el ciclo catalítico. Si las cisteínas catalítica y resolutive están lo suficientemente distanciadas, es posible identificar la presencia del puente disulfuro en geles SDS-PAGE no reductores. Cuando el polipéptido presenta el puente disulfuro su radio de stocks es menor y migra más rápido que la versión completamente reducida. Empleando esta característica y realizando incubaciones con distintos buffers redox, es posible calcular el potencial de reducción de este tipo de enzimas (Arias y col., 2011). En la *TcfRMr* la cisteína catalítica ocupa la posición 125 y la resolutive la posición 98. Como se observa en la figura 4.2.19, cuando se incubó la *TcfRMrP(G)* con buffers progresivamente más oxidantes, apareció preferencialmente una banda con una movilidad un poco mayor, correspondiente a la enzima oxidada (puente disulfuro intercatenario). En cambio, la oxidación de la *TcfRMrS(G)* causó la aparición de especies de mayor peso molecular, probablemente debido a la formación de puentes disulfuro intermoleculares. A pesar que los productos de la oxidación evidenciaron ser diferentes para ambos alelos, el potencial de reducción, evaluado densitométricamente con la fracción reducida, fue similar (figura 4.2.20).

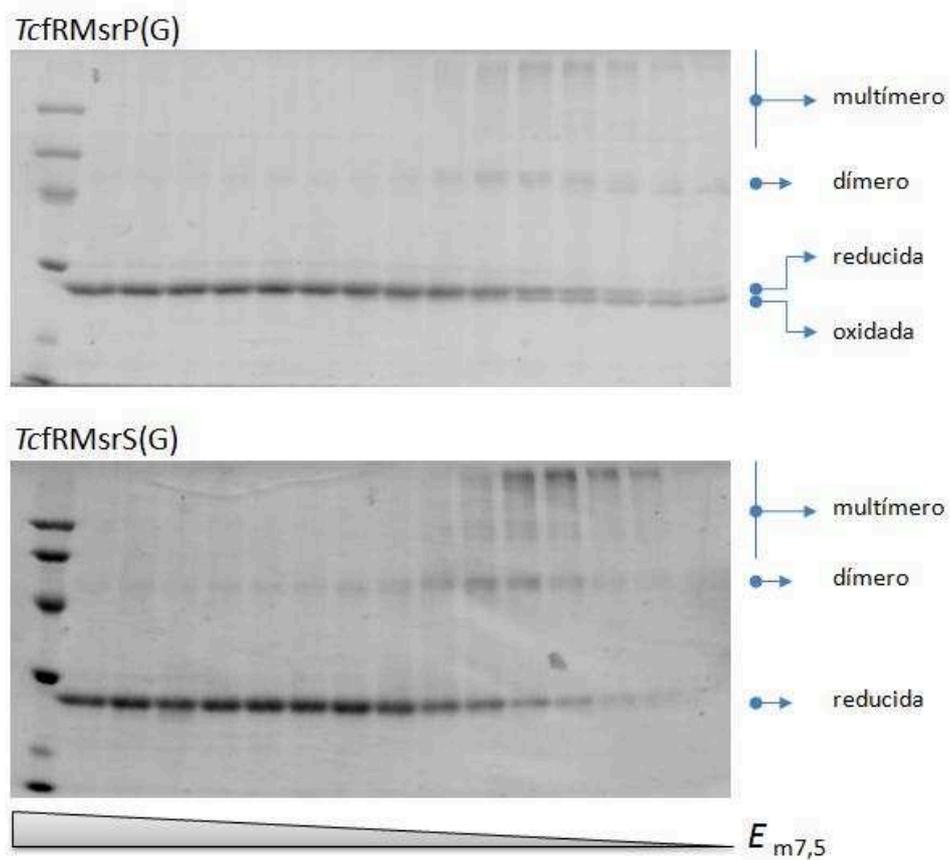


Figura 4.2.19: Perfil de titulación redox de las *TcfRMsrP(G)* revelado por SDS-PAGE no reductores. Las proteínas se incubaron con diferentes relaciones de 2β ME/HEDS a 25 °C y pH 7,5 durante 4 horas.

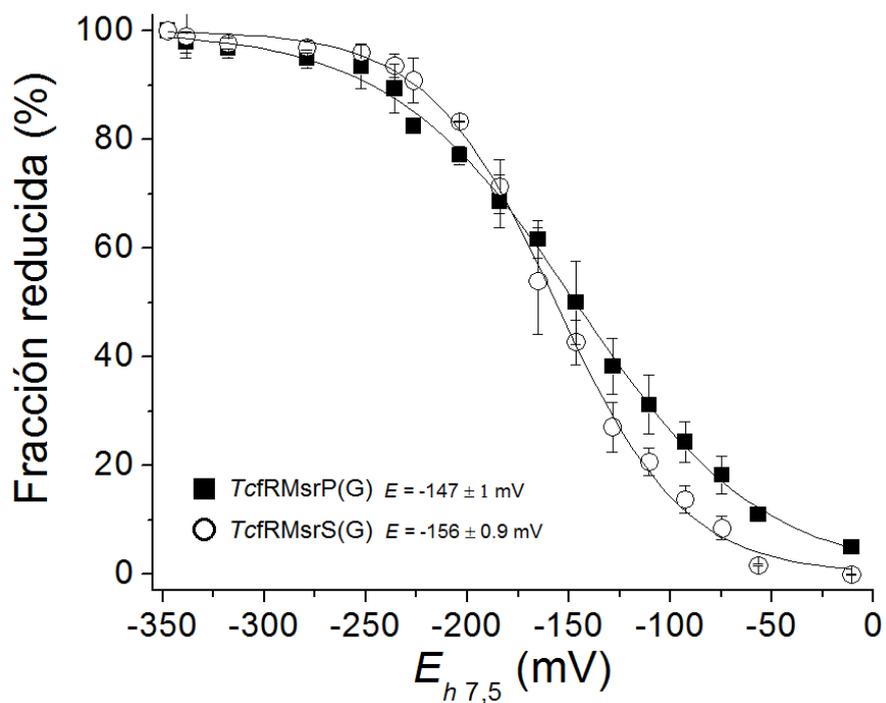


Figura 4.2.20: Curvas de titulación redox de la *TcfRMsrP(G)* y la *TcfRMsrS(G)* evaluadas densitométricamente utilizando la fracción reducida de cada enzima (observadas en los gels de la figura 4.2.19).

importante en la unión del sustrato (Kwak y col., 2010). Experimentalmente se detectó en la *TcfRMsr* la formación de enlaces disulfuro intercatenarios, especialmente en el alelo S. Según el modelo, la formación de este enlace sería entre la C12 y la C132 o C98 del otro monómero. En este caso la C12 podría estar actuando como la cisteína resolutive o se podría estar dando un proceso de isomerización del puente disulfuro formado previamente entre la C132 y la C98.

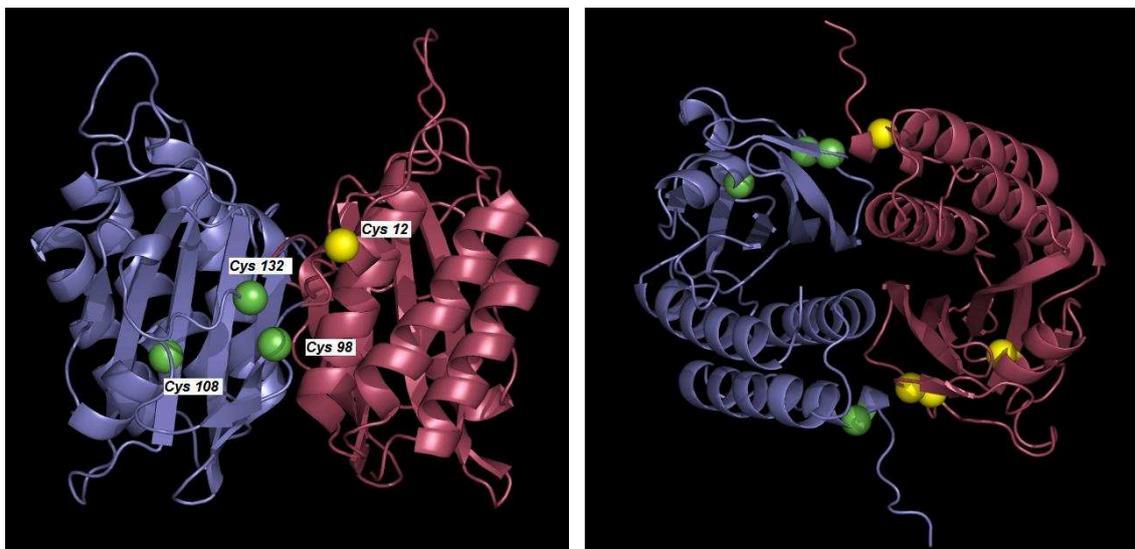


Figura 4.2.22: Modelo del dímero de la *TcfRMsrP(G)*. El panel izquierdo muestra la posición espacial de uno de los grupos de cisteínas. Como esferas verdes se indican las cisteínas del sitio activo de un monómero y como una esfera amarilla la de la cisteína de la región N terminal del otro monómero. El panel derecho corresponde a la rotación en 90 ° sobre el eje “y” de la figura anterior.

La distancia entre la C12 y las cisteínas catalíticas del otro monómero es de aproximadamente 11,6 Å (figura 4.2.23). Si bien esta distancia es considerable, no es incompatible con la formación de un enlace disulfuro intracatenario. Por ejemplo, en la estructura tridimensional de la *fRMsr* de *S. aureus* (la única resuelta en sus formas oxidada y reducida) las cisteínas catalítica y resolutive, previo a la formación del enlace disulfuro, se encuentran separadas por aproximadamente 10 Å (Bong y col., 2010). Esto es posible porque el *loop* donde se encuentra la cisteína catalítica aparenta poseer cierto grado de libertad conformacional.

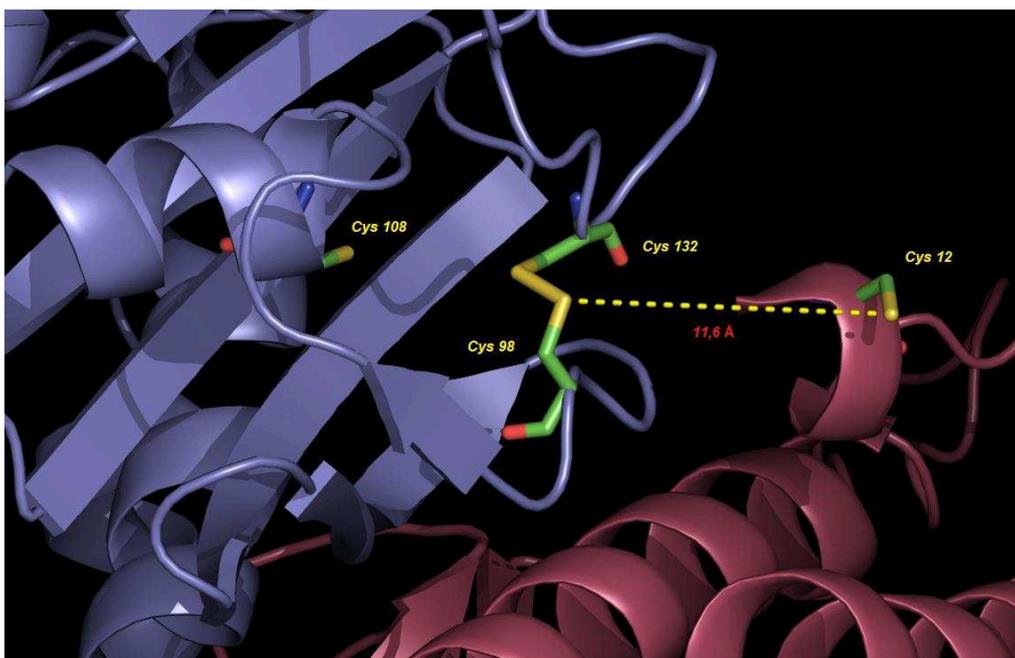


Figura 4.2.23: Acercamiento a la zona del sitio activo de uno de los monómeros. La estructura corresponde a la forma oxidada de la enzima. Se indica la distancia de la Cys12 de uno de los monómeros al puente disulfuro intracatenario del otro monómero.

Para intentar comprender las bases estructurales de las diferencias de actividad entre los dominios catalíticos de ambos alelos de la *TcfRMs*r, se ubicaron en el modelo los aminoácidos permutados (figura 4.2.24). A saber, en el alelo S aparecen dos prolina en las posiciones correspondientes a la L32 y la T64. El cambio en esta última posición no aparenta tener demasiadas implicancias ya que se encuentra en un *loop*, lejos de zonas tales como el sitio activo o la interface del dímero. En cambio, la posición 32 forma parte de una alfa hélice. La leucina presente en dicha locación aparenta establecer una interacción con la G13 perteneciente a una zona estructurada de la región N-terminal de la enzima, la cual contiene a la C12. Por otro lado, es conocido que las prolina desestabilizan las estructuras secundarias, por lo que el cambio podría estar afectando otras interacciones entre las hélices (Richardson, 1981; Gray y col., 1996). Para evaluar si ese es el caso, sería necesario realizar estudios de dinámica molecular. De todas formas, como se observa en la figura 4.2.25, a pesar que el modelado por homología es menos sensible a los cambios posicionales de las cadenas laterales, la aparición de la prolina en la posición 32 modifica la posición de la cadena lateral de la M36, afectando la interface de contacto del dímero. En resumen, el cambio L32P podría estar originando una mayor libertad de la región N-terminal y por lo tanto permitir el acercamiento de la C12 hacia el sitio activo de la otra cadena, facilitando la formación (o isomerización) del enlace disulfuro. Esto podría explicar porque no es posible detectar la presencia de un enlace intracatenario en el dominio catalítico del alelo S (figura 4.2.19 – gel inferior). En lo que respecta a la actividad, la

TcTXNI podría ser menos eficiente en la reducción del enlace disulfuro intermolecular, originando la menor eficiencia catalítica de la *TcfRMsS(G)* en comparación con la de la *TcfRMsP(G)*. Si bien este comportamiento explicaría la presencia de los dímeros en los SDS-PAGE no reductores, la aparición de multímeros sugiere la existencia de eventos adicionales.

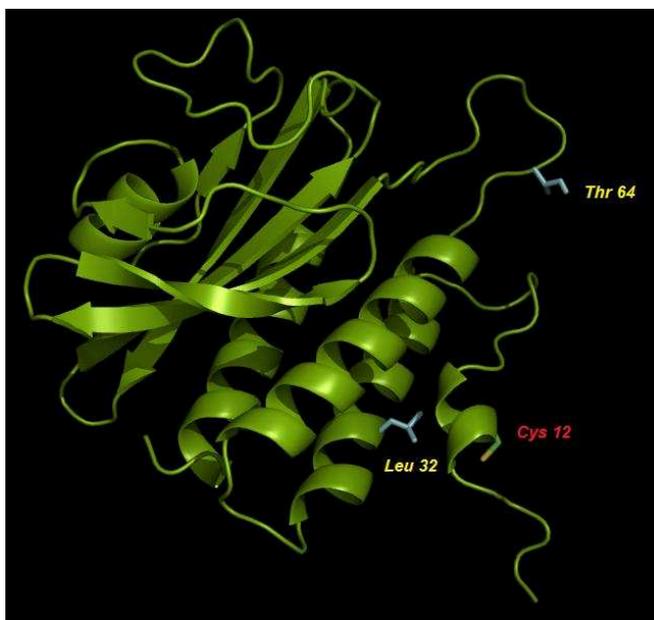


Figura 4.2.24: Localización de la Leu32 y la Thr64 en la *TcfRMsP(G)*. Ambos aminoácidos son reemplazados por prolina en la *TcfRMsS(G)*.

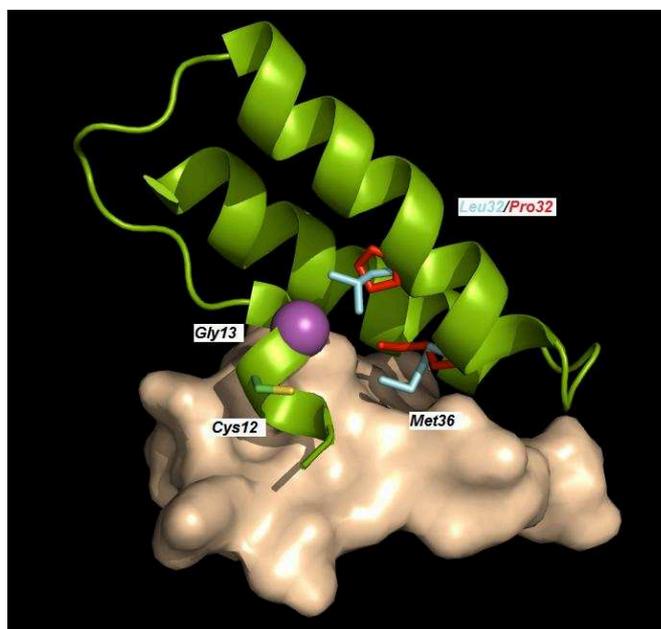


Figura 4.2.25: Ampliación de la zona de contacto de los aminoácidos 10-60 de un monómero (verde) con parte de la otra cadena (superficie blanca). Se indica la posición de la Gly13 (esfera lila) y la Cys12. Se muestra la posición de la Leu32 del alelo P (celeste) que esta cambiada por una prolina en el alelo S. En la figura se observa el cambio de la posición de la cadena lateral de la Met36 en el alelo S (rojo) en relación al alelo P (celeste).

4.2.10. Discusión

La metionina es un aminoácido esencial no sólo por su papel en la síntesis de proteínas, sino también por actuar como sustrato en la producción de S-adenosilmetionina (AdoMet). En los tripanosomas, una vez incorporada a la célula, la metionina se convierte rápidamente en AdoMet por acción de una AdoMet sintetasa (MAT), en una reacción de adenilación que requiere ATP. La reacción directa de la MAT es 2×10^5 veces mayor que la reacción inversa y por lo tanto no es reversible (Yarlett y col., 1993). La MAT de tripanosomas no aparenta estar regulada, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde esta enzima es inhibida por su producto (Hoffman, 1980; Eloranta y Kajander, 1984). Por este motivo, la AdoMet se acumula en el citosol (25 % del azufre soluble) para su utilización por varias vías y como reserva metabólica de metionina (a través de reacciones de reciclaje) (Bacchi y col., 1995). En tripanosomas, la AdoMet se utiliza parcialmente como donante de grupos metilos para la transmetilación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La AdoMet, después de su conversión a AdoMet decarboxilada (dcAdoMet), es el donante aminopropil para la síntesis de poliaminas (Goldberg y col., 2000). Mediante el camino metabólico conocido como trans-sulfuración, la metionina puede ser convertida en cisteína y su derivado, el glutatión. Finalmente, los tripanosomátidos conjugan el glutatión y las poliaminas para producir tripanotión, un metabolito esencial del metabolismo redox y la respuesta antioxidante del parásito (Ariyanayagam y col., 2003). La importancia de la metionina también se aprecia por la existencia de vías de salvataje. Tanto la metiltioadenosina, coproducto de la síntesis de poliaminas, como la S-adenosilhomocisteína, coproducto de las reacciones de transmetilación, son recicladas y reconvertidas a metionina por distintos mecanismos (Goldberg y col., 2000). Otra vía de rescate de metionina la llevan a cabo las metionina aminopeptidasas, recuperando dicho aminoácido luego de cumplida su función en la iniciación de la síntesis proteica (Dummitt y col., 2003).

Los tripanosomátidos son incapaces de producir metionina *de novo* y necesitan adquirirla del medio extracelular a través de transportadores de membrana (Hasne y Barrett, 2000). La metionina es un sustrato limitante para diversos organismos. Los tripanosomátidos adquieren dicho aminoácido de su hospedero, ya sea mamífero o invertebrado. En el caso de *T. cruzi*, el insecto vector pertenece a los triatominos, hematófagos obligados, por lo que en última instancia el alimento termina proviniendo preferencialmente de un animal homeotermo. En el suero humano, la metionina se encuentra en concentraciones relativamente bajas (30 μM) y aproximadamente el 10 % de la misma se halla como Met-SO (Mashima y col., 2003). Es más, se ha

informado que en el plasma de los mamíferos solo se detecta el isómero R de la Met-SO (Lee y col., 2008). Recientemente se ha reportado que las Msrs realizan una contribución apreciable al requerimiento nutricional de metionina en ratones, especialmente en condiciones naturales (Zhao y col., 2012). De forma similar, otro grupo trabajando con *Saccharomyces pombe*, postuló la idea de que la principal función de las Msrs es la de revertir la oxidación de metioninas libres y que esto es especialmente relevante para organismos incapaces de sintetizar metionina *de novo*, más aún si están sujetos a condiciones oxidantes (García-Santamarina y col., 2013).

En este trabajo se pudo comprobar la existencia de una fRMsr en *T. cruzi*. La enzima posee una disposición inusual de dominios, presentando el característico plegamiento GAF de estas enzimas hacia el extremo N terminal y un dominio TIP41 en la porción C terminal de la proteína. Este arreglo de dominios está conservado entre los tripanosomátidos y al momento no es posible identificar cual puede ser la relevancia fisiológica de esta fusión. La enzima se expresa durante todo el ciclo de vida del parásito, aunque aparentemente sus niveles son mayores en los estadios replicativos. Se comprobó que la proteína sufre diversas modificaciones postraduccionales como ser un corte proteolítico en la zona conectora de ambos dominios. Luego de este procesamiento la localización subcelular de los productos de clivaje parece alterarse. Estos eventos aparentan estar regulados, pero los ensayos destinados a determinar cuál es la señal que los desencadenan no fueron concluyentes. También se demostró que la enzima se fosforila, tanto en el dominio GAF como en el dominio TIP41. Es probable que la enzima también sea blanco de otras modificaciones, tales como ubiquitinación o sumonilación. En su conjunto, la complejidad de los procesos que aparentan afectar a la *TcfRMsr* hace pensar que probablemente la proteína participe en otros caminos metabólicos o vías de señalización celular y que posea entonces otra funcionalidad accesoria a su actividad como metionina sulfóxido reductasa. Sería interesante evaluar también si alguna de estas modificaciones varía o regula la actividad Msr *per se*.

En lo que respecta propiamente a la actividad enzimática, se pudo comprobar que el dominio catalítico se encuentra en la porción N-terminal de la proteína. Esta región (dominio GAF) fue capaz de complementar el fenotipo de una levadura mutante en todas sus Msr endógenas. La proteína de *T. cruzi* fue lo suficientemente activa *in vivo* como para conferirle a la levadura (auxótrofa para metionina) la capacidad de crecer utilizando metionina sulfóxido, específicamente mediante la reducción del isómero R. Este resultado sugiere que la *TcfRMsr* brinda al parásito una ventaja metabólica, ya que le posibilita utilizar Met-R-SO proveniente del suero del hospedero.

Ya que los mamíferos no tienen la capacidad de utilizar dicho compuesto, el parásito no tendría competencia en cuanto al aprovechamiento del recurso y podría utilizarlo para aumentar su *pool* de metionina.

Los ensayos catalíticos con la proteína recombinante confirmaron los resultados obtenidos *in vivo* en cuanto a la especificidad de la enzima hacia el isómero R de la Met-SO. Por otra parte, la enzima fue capaz de acoplarse a una cadena de transferencia de equivalentes de reducción compuesta por metabolitos y proteínas provenientes del parásito. Al respecto, la enzima aceptó eficientemente electrones provenientes de la *TcTXNI*, por lo que se enmarca dentro del grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo dependiente de tripanotión, característico de tripanosomátidos.

Resultó interesante comprobar que los alelos presentes en la cepa híbrida CL-Brener ostentan un comportamiento diferencial. El alelo P aparenta formar preferencialmente un puente disulfuro intracatenario durante su ciclo de catálisis, mientras que dicho evento no se detectó para el alelo S. Para este caso, la realización de un modelo permitió suponer que el cambio de una leucina por prolina en la posición 32, favorecería una mayor libertad del extremo N-terminal de la proteína y con esto la formación de un puente disulfuro intercatenario entre la C12 (presente en dicha región) y alguna de las cisteínas del sitio activo del otro monómero. El alelo P presenta una actividad enzimática 5 veces superior a la estimada para el alelo S. Es posible que la reducción del puente disulfuro intracatenario por parte de la *TcTXNI* sea más eficiente y origine la diferencia de actividad. Llamativamente un comportamiento similar se ha reportado para la *TcMsrA*, donde ambos alelos de la enzima también difieren en sus eficiencias catalíticas (Arias y col., 2011).

T. cruzi presenta una población heterogénea compuesta de cepas que circulan en los denominados ciclos selváticos y domésticos. Basados en una serie de marcadores moleculares el taxón se ha dividido inicialmente en dos grupos, los llamados linajes I y II (Momen, 1999). Estudios más recientes sugieren la existencia de seis unidades discretas de tipificación (Zingales y col., 2009). A pesar que la población de *T. cruzi* es predominantemente clonal, se ha identificado la existencia de algunas cepas híbridas, incluyendo el clon CL Brener, el cual fue elegido como cepa de referencia para el proyecto genoma (El-Sayed y col., 2005). El elevado polimorfismo (a nivel poblacional) en el genoma del parásito probablemente sea la causa de que diferentes cepas varíen en cuanto a su índice de parasitemia, severidad de la fase aguda, síntomas crónicos (cardíaco vs gastrointestinal), resistencia a estrés oxidativo y particularmente su resistencia a drogas (Filardi y Brener, 1987; Murta y col., 1998;

Mielniczki-Pereira y col., 2007; Piacenza y col., 2009). La base molecular de estos fenotipos diferenciales es poco conocida. Aunque escasos, existen algunos reportes acerca de diferencias catalíticas o regulatorias para enzimas codificadas por diferentes alelos, ya sea presentes en cepas híbridas o a nivel poblacional (Campos y col., 2011; Cherkesova y col., 2014).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo indican que en *T. cruzi* existen alelos menos activos tanto para la *TcMsrA* como para la *TcfRMsr*. Si bien es una hipótesis que hay que corroborar, es probable que las cepas que contengan dicha combinación de alelos se encuentren limitadas en su capacidad de utilizar Met-SO en reacciones de salvataje de metionina. Dada la importancia de la metionina para el metabolismo de los tripanosomátidos, y su relativa escases en el suero humano, dicha desventaja puede resultar significativa. Esta condición puede exacerbarse especialmente durante eventos de estrés oxidativo, como los que puede imponer la respuesta inmune del hospedero. Lo expuesto podría representar una de las bases moleculares de las diferencias fenotípicas entre cepas.

Si bien históricamente se ha hecho hincapié en el estudio de los procesos de reparación de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, etc), el avance de los estudios metabolómicos ha dejado en evidencia la existencia e importancia de diversas vías de reparación de metabolitos dañados. Al respecto, las Msrs forman parte de un selecto grupo de enzimas reparadoras que se están erigiendo como una prometedora área de estudio (Linster y col., 2013).

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

E. histolytica

- La *EhNROR* recombinante presentó actividad NAD(P)H oxidasa, generando H_2O_2 como producto. Sin embargo, *in vivo*, esta actividad podría estar fuertemente inhibida por acción del NAD^+ .
- Los resultados obtenidos indicarían que la función fisiológica de la *EhNROR* es la de actuar como rubredoxina reductasa. En *E. histolytica*, la ausencia del sustrato típico para este tipo de enzimas (rubredoxinas) es sobrellevada por la capacidad de la *EhNROR* de ceder electrones de forma directa a las proteínas efectoras (*EhRr* y *EhFDP*).
- Se pudo comprobar que la *EhRr* tiene capacidad de reducir H_2O_2 de forma eficiente y que aparenta tener una expresión constitutiva en condiciones normales de cultivo. Estudios previos indican que esta proteína posee localización mitocondrial.
- Ensayos de inmunolocalización determinaron que la *EhNROR* es una proteína mitocondrial, en consecuencia, la *EhNROR* y la *EhRr* constituyen un sistema eficaz de detoxificación de H_2O_2 dentro de los mitocondrios.
- La *EhFDP1* presenta actividad O_2 reductasa y tiene preferencia por utilizar Fds como sustratos reductores en lugar de rubredoxinas. Este aspecto es relevante ya que este comportamiento podría representar una adaptación de la enzima al contexto metabólico del parásito.
- Se comprobó que la *EhFDP1* tiene localización citoplasmática, lo que es coherente con la propuesta de que las Fds son sus donadores de electrones fisiológicos.
- El consumo de O_2 observado durante el metabolismo "aerobio" de *E. histolytica* sería consecuencia de la acción de las FDPs, que se conectarían al metabolismo central utilizando los equivalentes de reducción cedidos por las Fds. Debido a esta transferencia electrónica, dichas redoxinas se reoxidarían estando disponibles nuevamente para aceptar los electrones provenientes de la oxidación del piruvato y evitando de esta forma el cese del flujo glicolítico.
- La *EhFDP1* presenta una baja actividad NO^* reductasa, sin embargo, su alta abundancia podría compensar, *in vivo*, esa deficiencia.

- Las ferredoxinas amebianas son inactivadas por acción del NO^{*}. Una hipótesis atractiva, dada la alta abundancia de estas proteínas, sería que actuaran como “buffers” de contención de NO^{*}, siendo luego reparadas por los mecanismos celulares.

T. cruzi

- Se pudo comprobar la existencia de una fRMsr en *T. cruzi*. La enzima posee una disposición inusual de dominios, presentando el característico plegamiento GAF de estas enzimas hacia el extremo N terminal y un dominio TIP41 en la porción C terminal de la proteína. Este arreglo de dominios está conservado entre los tripanosomátidos y al momento no fue posible identificar cual puede ser la relevancia fisiológica de esta fusión.
- La TcfRMsr se expresa durante todo el ciclo de vida del parásito, aunque aparentemente sus niveles son mayores en los estadios replicativos.
- Se comprobó que la TcfRMsr sufre un corte proteolítico en la zona conectora de ambos dominios. Luego de este procesamiento, la localización subcelular de los productos de clivaje parece alterarse.
- Se demostró que la TcfRMsr se fosforila, tanto en el dominio GAF como en el dominio TIP41.
- Se pudo comprobar que el dominio catalítico de la TcfRMsr se encuentra en la porción N-terminal de la proteína. Esta región (dominio GAF) fue capaz de complementar el fenotipo de una levadura mutante en todas sus Msr endógenas.
- Los ensayos catalíticos con la TcfRMsr(G) recombinante confirmaron los resultados obtenidos *in vivo* en cuanto a la especificidad de la enzima hacia el isómero R de la Met-SO.
- La TcfRMsr(G) aceptó eficientemente electrones provenientes de la TcTXNI, por lo que se enmarca dentro del grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo dependiente de tripanotión, característico de tripanosomátidos.
- El alelo P de la TcfRMsr(G) aparenta formar preferencialmente un puente disulfuro intracatenario durante su ciclo de catálisis, mientras que dicho evento no se detectó para el alelo S. Un modelo permitió suponer que el cambio de una leucina por prolina en la posición 32 del alelo S, favorecería una mayor libertad del extremo N-terminal de la proteína y con esto la formación de un puente

disulfuro intercatenario entre la C12 (presente en dicha región) y alguna de las cisteínas del sitio activo del otro monómero.

- El alelo P de la *TcfRMs*r(G) presenta una actividad enzimática 5 veces superior a la estimada para el alelo S. Es posible que la reducción del puente disulfuro intracatenario por parte de la *TcTXN*I sea más eficiente y origine la diferencia de actividad.
- La *TcfRMs*r brindaría al parásito una ventaja metabólica, ya que le posibilitaría utilizar Met-R-SO proveniente del suero del hospedero. Ya que los mamíferos no tienen la capacidad de utilizar dicho compuesto, el parásito no tendría competencia en cuanto al aprovechamiento del recurso y podría utilizarlo para aumentar su *pool* de metionina.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, P.; Barry, T. y Tovar, J. (2008). *Entamoeba histolytica* mitosomes: Organelles in search of a function. *Exp Parasitol* 118(1): 10-6.
- Akbar, M.A.; Chatterjee, N.S.; Sen, P.; Debnath, A.; Pal, A.; Bera, T. y Das, P. (2004). *Genes induced by a high-oxygen environment in entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 133(2): 187-96.
- Albuquerque, C.P.; Smolka, M.B.; Payne, S.H.; Bafna, V.; Eng, J. y Zhou, H. (2008). *A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis*. *Mol Cell Proteomics* 7(7): 1389-96.
- Ali, V. y Nozaki, T. (2007). *Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "Amitochondriate" Protozoan parasites*. *Clin Microbiol Rev* 20(1): 164-87.
- Ali, V. y Nozaki, T. (2013). *Iron-sulphur clusters, their biosynthesis, and biological functions in protozoan parasites*. *Adv Parasitol* 83: 1-92.
- Aliverti, A.; Curti, B. y Vanoni, M.A. (1999). *Identifying and quantitating fad and fmn in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins*. *Methods Mol Biol* 131: 9-23.
- Alsmark, U.C.; Sicheritz-Ponten, T.; Foster, P.G.; Hirt, R.P. y Embley, T.M. (2009). *Horizontal gene transfer in eukaryotic parasites: A case study of entamoeba histolytica and trichomonas vaginalis*. *Methods Mol Biol* 532: 489-500.
- Allaoui, A.; Francois, C.; Zemzoumi, K.; Guilvard, E. y Ouaisi, A. (1999). *Intracellular growth and metacyclogenesis defects in trypanosoma cruzi carrying a targeted deletion of a tc52 protein-encoding allele*. *Mol Microbiol* 32(6): 1273-86.
- Allen, J.E. y Maizels, R.M. (2011). *Diversity and dialogue in immunity to helminths*. *Nat Rev Immunol* 11(6): 375-88.
- Anderson, I.J. y Loftus, B.J. (2005). *Entamoeba histolytica: Observations on metabolism based on the genome sequence*. *Exp Parasitol* 110(3): 173-7.
- Andersson, J.O.; Hirt, R.P.; Foster, P.G. y Roger, A.J. (2006). *Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: Influx of genes into protist genomes*. *BMC Evol Biol* 6: 27.
- Andrews, N.W. y Colli, W. (1982). *Adhesion and interiorization of trypanosoma cruzi in mammalian cells*. *J Protozool* 29(2): 264-9.
- Arhets, P.; Gounon, P.; Sansonetti, P. y Guillen, N. (1995). *Myosin ii is involved in capping and uroid formation in the human pathogen entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 63(11): 4358-67.
- Arias, D.G.; Cabeza, M.S.; Erben, E.D.; Carranza, P.G.; Lujan, H.D.; Tellez Inon, M.T.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2011). *Functional characterization of methionine sulfoxide reductase a from trypanosoma spp*. *Free Radic Biol Med* 50(1): 37-46.
- Arias, D.G.; Carranza, P.G.; Lujan, H.D.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2008). *Immunolocalization and enzymatic functional characterization of the thioredoxin system in entamoeba histolytica*. *Free Radic Biol Med* 45(1): 32-9.
- Arias, D.G.; Gutierrez, C.E.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2007). *Thioredoxin-linked metabolism in entamoeba histolytica*. *Free Radic Biol Med* 42(10): 1496-505.

- Arias, D.G.; Marquez, V.E.; Chiribao, M.L.; Gadelha, F.R.; Robello, C.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2013). *Redox metabolism in trypanosoma cruzi: Functional characterization of tryparedoxins revisited*. Free Radic Biol Med 63: 65-77.
- Arias, D.G.; Regner, E.L.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2012). *Entamoeba histolytica thioredoxin reductase: Molecular and functional characterization of its atypical properties*. Biochim Biophys Acta 1820(12): 1859-66.
- Ariyanayagam, M.R.; Oza, S.L.; Mehlert, A. y Fairlamb, A.H. (2003). *Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in trypanosoma cruzi*. J Biol Chem 278(30): 27612-9.
- Avila, H.A.; Pereira, J.B.; Thiemann, O.; De Paiva, E.; Degrave, W.; Morel, C.M. y Simpson, L. (1993). *Detection of trypanosoma cruzi in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis*. J Clin Microbiol 31(9): 2421-6.
- Bacchi, C.J.; Goldberg, B.; Garofalo-Hannan, J.; Rattendi, D.; Lyte, P. y Yarlett, N. (1995). *Fate of soluble methionine in african trypanosomes: Effects of metabolic inhibitors*. Biochem J 309 (Pt 3): 737-43.
- Bailey, G.B.; Day, D.B. y Mccoomer, N.E. (1992). *Entamoeba motility: Dynamics of cytoplasmic streaming, locomotion and translocation of surface-bound particles, and organization of the actin cytoskeleton in entamoeba invadens*. J Protozool 39(2): 267-72.
- Bakker, B.M.; Walsh, M.C.; Ter Kuile, B.H.; Mensonides, F.I.; Michels, P.A.; Opperdoes, F.R. y Westerhoff, H.V. (1999). *Contribution of glucose transport to the control of the glycolytic flux in trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(18): 10098-103.
- Band, R.N. y Cirrito, H. (1979). *Growth response of axenic entamoeba histolytica to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen*. J Protozool 26(2): 282-6.
- Banerjee, R. (2008). *Redox metabolism and life*. Redox biochemistry. R. Banerjee, D. F. Becker, M. B. Dickman, V. N. Gladyshev and S. W. Ragsdale. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons: 1-9.
- Belenky, P.; Racette, F.G.; Bogan, K.L.; McClure, J.M.; Smith, J.S. y Brenner, C. (2007). *Nicotinamide riboside promotes sir2 silencing and extends lifespan via nrk and urh1/pnp1/meu1 pathways to nad+*. Cell 129(3): 473-84.
- Biller, L.; Matthiesen, J.; Kuhne, V.; Lotter, H.; Handal, G.; Nozaki, T.; Saito-Nakano, Y.; Schumann, M.; Roeder, T.; Tannich, E.; Krause, E. y Bruchhaus, I. (2014). *The cell surface proteome of entamoeba histolytica*. Mol Cell Proteomics 13(1): 132-44.
- Bindoli, A.; Fukuto, J.M. y Forman, H.J. (2008). *Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling*. Antioxid Redox Signal 10(9): 1549-64.
- Blake, P.R.; Park, J.B.; Bryant, F.O.; Aono, S.; Magnuson, J.K.; Eccleston, E.; Howard, J.B.; Summers, M.F. y Adams, M.W. (1991). *Determinants of protein hyperthermostability: Purification and amino acid sequence of rubredoxin from the hyperthermophilic archaeobacterium pyrococcus furiosus and secondary structure of the zinc adduct by nmr*. Biochemistry 30(45): 10885-95.
- Blankenship, R.E. (2010). *Early evolution of photosynthesis*. Plant Physiol 154(2): 434-8.
- Bodenmiller, B.; Wanka, S.; Kraft, C.; Urban, J.; Campbell, D.; Pedrioli, P.G.; Gerrits, B.; Picotti, P.; Lam, H.; Vitek, O.; Brusniak, M.Y.; Roschitzki, B.; Zhang, C.;

- Shokat, K.M.; Schlapbach, R.; Colman-Lerner, A.; Nolan, G.P.; Nesvizhskii, A.I.; Peter, M.; Loewith, R.; Von Mering, C. y Aebersold, R. (2010). *Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast*. *Sci Signal* 3(153): rs4.
- Bong, S.M.; Kwak, G.H.; Moon, J.H.; Lee, K.S.; Kim, H.S.; Kim, H.Y. y Chi, Y.M. (2010). *Structural and kinetic analysis of free methionine-r-sulfoxide reductase from staphylococcus aureus: Conformational changes during catalysis and implications for the catalytic and inhibitory mechanisms*. *J Biol Chem* 285(32): 25044-52.
- Boschi-Muller, S.; Gand, A. y Branlant, G. (2008). *The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities*. *Arch Biochem Biophys* 474(2): 266-73.
- Box, H.C.; Dawidzik, J.B. y Budzinski, E.E. (2001). *Free radical-induced double lesions in DNA*. *Free Radic Biol Med* 31(7): 856-68.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brandt, H. y Tamayo, R.P. (1970). *Pathology of human amebiasis*. *Hum Pathol* 1(3): 351-85.
- Bredeston, L.M.; Caffaro, C.E.; Samuelson, J. y Hirschberg, C.B. (2005). *Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 280(37): 32168-76.
- Brioukhanov, A.L. y Netrusov, A.I. (2004). *Catalase and superoxide dismutase: Distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes*. *Biochemistry (Mosc)* 69(9): 949-62.
- Briukhanov, A.L. (2008). *[non-heme iron proteins as an alternative system of antioxidant defense in the cells of strictly anaerobic microorganisms: A review]*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 44(4): 373-86.
- Brown, D.M.; Upcroft, J.A.; Edwards, M.R. y Upcroft, P. (1998). *Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote giardia duodenalis*. *Int J Parasitol* 28(1): 149-64.
- Brown, D.M.; Upcroft, J.A. y Upcroft, P. (1996). *A h₂o-producing nadh oxidase from the protozoan parasite giardia duodenalis*. *Eur J Biochem* 241(1): 155-61.
- Bruchhaus, I.; Brattig, N.W. y Tannich, E. (1992). *Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23(2): 27-9.
- Bruchhaus, I.; Richter, S. y Tannich, E. (1997). *Removal of hydrogen peroxide by the 29 kda protein of entamoeba histolytica*. *Biochem J* 326 (Pt 3): 785-9.
- Bruchhaus, I. y Tannich, E. (1994). *Purification and molecular characterization of the nad(+)-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from entamoeba histolytica*. *Biochem J* 303 (Pt 3): 743-8.
- Buchmann, K. (2014). *Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals*. *Front Immunol* 5: 459.
- Burleigh, B.A. (2005). *Host cell signaling and trypanosoma cruzi invasion: Do all roads lead to lysosomes?* *Sci STKE* 2005(293): pe36.
- Busch, J.L.; Breton, J.L.; Davy, S.L.; James, R.; Moore, G.R.; Armstrong, F.A. y Thomson, A.J. (2000). *Ferredoxin iii of desulfovibrio africanus: Sequencing of*

- the native gene and characterization of a histidine-tagged form.* Biochem J 346 Pt 2: 375-84.
- Caldwell, P.; Luk, D.C.; Weissbach, H. y Brot, N. (1978). *Oxidation of the methionine residues of escherichia coli ribosomal protein I12 decreases the protein's biological activity.* Proc Natl Acad Sci U S A 75(11): 5349-52.
- Campos, P.C.; Silva, V.G.; Furtado, C.; Machado-Silva, A.; Darocha, W.D.; Peloso, E.F.; Gadelha, F.R.; Medeiros, M.H.; Lana Gde, C.; Chen, Y.; Barnes, R.L.; Passos-Silva, D.G.; Mcculloch, R.; Machado, C.R. y Teixeira, S.M. (2011). *Trypanosoma cruzi msh2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response.* Mol Biochem Parasitol 176(1): 8-16.
- Casas, B.; Calabokis, M.; Kurz, L.; Galan-Caridad, J.M.; Bubis, J. y Gonzatti, M.I. (2002). *Trypanosoma cruzi: In vitro phosphorylation of tubulin by a protein kinase ck2-like enzyme.* Exp Parasitol 101(2-3): 129-37.
- Cavalier-Smith, T. (1991). *Archamoebae: The ancestral eukaryotes?* Biosystems 25(1-2): 25-38.
- Cavalier-Smith, T. (2002). *The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa.* Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 2): 297-354.
- Cazzulo, J.J.; Cazzulo Franke, M.C. y Franke De Cazzulo, B.M. (1989). *On the regulatory properties of the pyruvate kinase from trypanosoma cruzi epimastigotes.* FEMS Microbiol Lett 50(3): 259-63.
- Cedeno, J.R. y Krogstad, D.J. (1983). *Susceptibility testing of entamoeba histolytica.* J Infect Dis 148(6): 1090-5.
- Clark, C.G.; Alsmark, U.C.; Tazreiter, M.; Saito-Nakano, Y.; Ali, V.; Marion, S.; Weber, C.; Mukherjee, C.; Bruchhaus, I.; Tannich, E.; Leippe, M.; Sicheritz-Ponten, T.; Foster, P.G.; Samuelson, J.; Noel, C.J.; Hirt, R.P.; Embley, T.M.; Gilchrist, C.A.; Mann, B.J.; Singh, U.; Ackers, J.P.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A.; Lohia, A.; Guillen, N.; Duchene, M.; Nozaki, T. y Hall, N. (2007). *Structure and content of the entamoeba histolytica genome.* Adv Parasitol 65: 51-190.
- Clark, C.G. y Roger, A.J. (1995). *Direct evidence for secondary loss of mitochondria in entamoeba histolytica.* Proc Natl Acad Sci U S A 92(14): 6518-21.
- Cooper, C.E. (1999). *Nitric oxide and iron proteins.* Biochim Biophys Acta 1411(2-3): 290-309.
- Coulter, E.D.; Shenvi, N.V. y Kurtz, D.M., Jr. (1999). *Nadh peroxidase activity of rubrerythrin.* Biochem Biophys Res Commun 255(2): 317-23.
- Coura, J.R. (2007). *Chagas disease: What is known and what is needed--a background article.* Mem Inst Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 113-22.
- Cox, F.E.G.; Wakelin, D.; Gillespie, S.H. y Despomier, D.D. (2005). *Topeley and wilson's microbiology and microbial infections,* ASM Press.
- Chaiyen, P.; Fraaije, M.W. y Mattevi, A. (2012). *The enigmatic reaction of flavins with oxygen.* Trends Biochem Sci 37(9): 373-80.
- Chan, K.W.; Slotboom, D.J.; Cox, S.; Embley, T.M.; Fabre, O.; Van Der Giezen, M.; Harding, M.; Horner, D.S.; Kunji, E.R.; Leon-Avila, G. y Tovar, J. (2005). *A novel adp/atp transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite entamoeba histolytica.* Curr Biol 15(8): 737-42.

- Chauhan, R. y Mande, S.C. (2001). *Characterization of the mycobacterium tuberculosis h37rv alkyl hydroperoxidase ahpc points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity*. *Biochem J* 354(Pt 1): 209-15.
- Cheng, Z.; Arscott, L.D.; Ballou, D.P. y Williams, C.H., Jr. (2007). *The relationship of the redox potentials of thioredoxin and thioredoxin reductase from drosophila melanogaster to the enzymatic mechanism: Reduced thioredoxin is the reductant of glutathione in drosophila*. *Biochemistry* 46(26): 7875-85.
- Cherkesova, T.S.; Hargrove, T.Y.; Vanrell, M.C.; Ges, I.; Usanov, S.A.; Romano, P.S. y Lepesheva, G.I. (2014). *Sequence variation in cyp51a from the y strain of trypanosoma cruzi alters its sensitivity to inhibition*. *FEBS Lett*.
- Choi, M.H.; Sajed, D.; Poole, L.; Hirata, K.; Herdman, S.; Torian, B.E. y Reed, S.L. (2005). *An unusual surface peroxiredoxin protects invasive entamoeba histolytica from oxidant attack*. *Mol Biochem Parasitol* 143(1): 80-9.
- D'avila-Levy, C.M.; Marinho, F.A.; Santos, L.O.; Martins, J.L.; Santos, A.L. y Branquinha, M.H. (2006). *Antileishmanial activity of mdl 28170, a potent calpain inhibitor*. *Int J Antimicrob Agents* 28(2): 138-42.
- Das, S.; Stevens, T.; Castillo, C.; Villasenor, A.; Arredondo, H. y Reddy, K. (2002). *Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa*. *Int J Parasitol* 32(6): 655-75.
- De Castro, S.L. (1993). *The challenge of chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 53(2): 83-98.
- De Souza, W. (1984). *Cell biology of trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 86: 197-283.
- De Souza, W. (2002). *From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality*. *Kinetoplastid Biol Dis* 1(1): 3.
- Demir, A.B. y Koc, A. (2011). *Protein oxidation and repair mechanisms in aging*. *The field of biological aging: Past, present and future*. A. Olgun. Kerala, India, Transworld Research Network: 39-59.
- Dennis, K.J. y Shibamoto, T. (1989). *Gas chromatographic determination of malonaldehyde formed by lipid peroxidation*. *Free Radic Biol Med* 7(2): 187-92.
- Di Matteo, A.; Scandurra, F.M.; Testa, F.; Forte, E.; Sarti, P.; Brunori, M. y Giuffrè, A. (2008). *The o₂-scavenging flavodiiron protein in the human parasite giardia intestinalis*. *J Biol Chem* 283(7): 4061-8.
- Diamond, L.S. y Clark, C.G. (1993). *A redescription of entamoeba histolytica schaudinn, 1903 (emended walker, 1911) separating it from entamoeba dispar brumpt, 1925*. *J Eukaryot Microbiol* 40(3): 340-4.
- Diamond, L.S.; Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. (1978). *A new medium for the axenic cultivation of entamoeba histolytica and other entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72(4): 431-2.
- Dias, J.C. (1997). *[cecilio romana, romana's sign and chagas' disease]*. *Rev Soc Bras Med Trop* 30(5): 407-13.
- Djaman, O.; Outten, F.W. y Imlay, J.A. (2004). *Repair of oxidized iron-sulfur clusters in escherichia coli*. *J Biol Chem* 279(43): 44590-9.
- Docampo, R. y Moreno, S.N. (1984). *Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis* 6(2): 223-38.

- Dolezal, P.; Dagley, M.J.; Kono, M.; Wolyneec, P.; Likic, V.A.; Foo, J.H.; Sedinova, M.; Tachezy, J.; Bachmann, A.; Bruchhaus, I. y Lithgow, T. (2010). *The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of entamoeba histolytica*. PLoS Pathog 6(3): e1000812.
- Droge, W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev 82(1): 47-95.
- Dummitt, B.; Micka, W.S. y Chang, Y.H. (2003). *N-terminal methionine removal and methionine metabolism in saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biochem 89(5): 964-74.
- Dunker, A.K.; Cortese, M.S.; Romero, P.; Iakoucheva, L.M. y Uversky, V.N. (2005). *Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks*. FEBS J 272(20): 5129-48.
- Eichinger, D. (1997). *Encystation of entamoeba parasites*. Bioessays 19(7): 633-9.
- El-Sayed, N.M.; Myler, P.J.; Bartholomeu, D.C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.N.; Ghedin, E.; Worthey, E.A.; Delcher, A.L.; Blandin, G.; Westenberger, S.J.; Caler, E.; Cerqueira, G.C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D.A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; Da Silveira, J.F.; De Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P.T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A.C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M.J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C.R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J.C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J.L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S.L.; Sanchez, D.O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A.J.; Sisk, E.; Tammi, M.T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P.N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C.M.; Stuart, K.D. y Andersson, B. (2005). *The genome sequence of trypanosoma cruzi, etiologic agent of chagas disease*. Science 309(5733): 409-15.
- Elnekave, K.; Siman-Tov, R. y Ankri, S. (2003). *Consumption of l-arginine mediated by entamoeba histolytica l-arginase (eharg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages*. Parasite Immunol 25(11-12): 597-608.
- Eloranta, T.O. y Kajander, E.O. (1984). *Catabolism and lability of s-adenosyl-l-methionine in rat liver extracts*. Biochem J 224(1): 137-44.
- Ellis, J.E.; Williams, A.G. y Lloyd, D. (1989). *Oxygen consumption by ruminal microorganisms: Protozoal and bacterial contributions*. Appl Environ Microbiol 55(10): 2583-7.
- Embley, T.M. y Martin, W. (2006). *Eukaryotic evolution, changes and challenges*. Nature 440(7084): 623-30.
- Ennes-Vidal, V.; Menna-Barreto, R.F.; Santos, A.L.; Branquinha, M.H. y D'Avila-Levy, C.M. (2011). *Mdl28170, a calpain inhibitor, affects trypanosoma cruzi metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to rhodnius prolixus midgut*. PLoS One 6(4): e18371.
- Ersfeld, K.; Barraclough, H. y Gull, K. (2005). *Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites*. J Mol Evol 61(6): 742-57.

- Etienne, F.; Spector, D.; Brot, N. y Weissbach, H. (2003). *A methionine sulfoxide reductase in escherichia coli that reduces the r enantiomer of methionine sulfoxide*. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 378-82.
- Eyer, P.; Worek, F.; Kiderlen, D.; Sinko, G.; Stuglin, A.; Simeon-Rudolf, V. y Reiner, E. (2003). *Molar absorption coefficients for the reduced ellman reagent: Reassessment*. *Anal Biochem* 312(2): 224-7.
- Farri, T.A.; Sargeant, P.G.; Warhurst, D.C.; Williams, J.E. y Bhojnani, R. (1980). *Electrophoretic studies of the hexokinase of entamoeba histolytica groups i to iv*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74(5): 672-3.
- Fenyvuesvolgyi, C.; Elder, R.T.; Benko, Z.; Liang, D. y Zhao, R.Y. (2005). *Fission yeast homologue of tip41-like proteins regulates type 2a phosphatases and responses to nitrogen sources*. *Biochim Biophys Acta* 1746(2): 155-62.
- Fernandez, A.; Kiefer, J.; Fosdick, L. y Mcconkey, D.J. (1995). *Oxygen radical production and thiol depletion are required for ca(2+)-mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes*. *J Immunol* 155(11): 5133-9.
- Ferreira, L.R.; Dossin Fde, M.; Ramos, T.C.; Freymuller, E. y Schenkman, S. (2008). *Active transcription and ultrastructural changes during trypanosoma cruzi metacyclogenesis*. *An Acad Bras Cienc* 80(1): 157-66.
- Field, J.; Rosenthal, B. y Samuelson, J. (2000). *Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-coa synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* 38(3): 446-55.
- Filardi, L.S. y Brener, Z. (1987). *Susceptibility and natural resistance of trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in chagas disease*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5): 755-9.
- Fitzpatrick, J.; Kalyvas, H.; Filipovic, M.R.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Macdonald, J.C.; Shearer, J. y Kim, E. (2014). *Transformation of a mononitrosyl iron complex to a [2fe-2s] cluster by a cysteine analogue*. *J Am Chem Soc* 136(20): 7229-32.
- Fraza, C.; Silva, G.; Gomes, C.M.; Matias, P.; Coelho, R.; Sieker, L.; Macedo, S.; Liu, M.Y.; Oliveira, S.; Teixeira, M.; Xavier, A.V.; Rodrigues-Pousada, C.; Carrondo, M.A. y Le Gall, J. (2000). *Structure of a dioxygen reduction enzyme from desulfovibrio gigas*. *Nat Struct Biol* 7(11): 1041-5.
- Freilij, H. y Altchek, J. (1995). *Congenital chagas' disease: Diagnostic and clinical aspects*. *Clin Infect Dis* 21(3): 551-5.
- Fridovich, I. (1998). *Oxygen toxicity: A radical explanation*. *J Exp Biol* 201(Pt 8): 1203-9.
- Friguet, B. (2006). *Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress*. *FEBS Lett* 580(12): 2910-6.
- Garcia-Santamarina, S.; Boronat, S.; Ayte, J. y Hidalgo, E. (2013). *Methionine sulphoxide reductases revisited: Free methionine as a primary target of h(2)o(2)stress in auxotrophic fission yeast*. *Mol Microbiol* 90(5): 1113-24.
- Garcia, L.L.; Rivas-Marin, E.; Floriano, B.; Bernhardt, R.; Ewen, K.M.; Reyes-Ramirez, F. y Santero, E. (2011). *Thny is a ferredoxin reductase-like iron-sulfur flavoprotein that has evolved to function as a regulator of tetralin biodegradation gene expression*. *J Biol Chem* 286(3): 1709-18.
- Gathiram, V. y Jackson, T.F. (1987). *A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 72(10): 669-72.

- Ghezzi, P. (2005). *Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation*. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1378-81.
- Ghosh, S.; Field, J.; Rogers, R.; Hickman, M. y Samuelson, J. (2000). *The entamoeba histolytica mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane*. *Infect Immun* 68(7): 4319-22.
- Ghosh, S.K.; Field, J.; Frisardi, M.; Rosenthal, B.; Mai, Z.; Rogers, R. y Samuelson, J. (1999). *Chitinase secretion by encysting entamoeba invadens and transfected entamoeba histolytica trophozoites: Localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and golgi apparatus*. *Infect Immun* 67(6): 3073-81.
- Giannopolitis, C.N. y Ries, S.K. (1977). *Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants*. *Plant Physiol* 59(2): 309-14.
- Gietz, D.; St Jean, A.; Woods, R.A. y Schiestl, R.H. (1992). *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells*. *Nucleic Acids Res* 20(6): 1425.
- Gilchrist, C.A.; Houpt, E.; Trapaidze, N.; Fei, Z.; Crasta, O.; Asgharpour, A.; Evans, C.; Martino-Catt, S.; Baba, D.J.; Stroup, S.; Hamano, S.; Ehrenkauf, G.; Okada, M.; Singh, U.; Nozaki, T.; Mann, B.J. y Petri, W.A., Jr. (2006). *Impact of intestinal colonization and invasion on the entamoeba histolytica transcriptome*. *Mol Biochem Parasitol* 147(2): 163-76.
- Goldberg, B.; Rattendi, D.; Lloyd, D.; Yarlett, N. y Bacchi, C.J. (2000). *Kinetics of methionine transport and metabolism by trypanosoma brucei brucei and trypanosoma brucei rhodesiense*. *Arch Biochem Biophys* 377(1): 49-57.
- Goldstein, S.; Meyerstein, D. y Czapski, G. (1993). *The fenton reagents*. *Free Radic Biol Med* 15(4): 435-45.
- Gomes, C.M.; Giuffre, A.; Forte, E.; Vicente, J.B.; Saraiva, L.M.; Brunori, M. y Teixeira, M. (2002). *A novel type of nitric-oxide reductase. Escherichia coli flavorubredoxin*. *J Biol Chem* 277(28): 25273-6.
- Gomes, C.M.; Silva, G.; Oliveira, S.; Legall, J.; Liu, M.Y.; Xavier, A.V.; Rodrigues-Pousada, C. y Teixeira, M. (1997). *Studies on the redox centers of the terminal oxidase from desulfovibrio gigas and evidence for its interaction with rubredoxin*. *J Biol Chem* 272(36): 22502-8.
- Gomes, Y.M. (1997). *Pcr and sero-diagnosis of chronic chagas' disease. Biotechnological advances*. *Appl Biochem Biotechnol* 66(2): 107-19.
- Gomez, M.L.; Erijman, L.; Arauzo, S.; Torres, H.N. y Tellez-Inon, M.T. (1989). *Protein kinase c in trypanosoma cruzi epimastigote forms: Partial purification and characterization*. *Mol Biochem Parasitol* 36(2): 101-8.
- Gordge, M.P.; Hothersall, J.S. y Noronha-Dutra, A.A. (1998). *Evidence for a cyclic gmp-independent mechanism in the anti-platelet action of s-nitrosoglutathione*. *Br J Pharmacol* 124(1): 141-8.
- Gray, T.M.; Arnoys, E.J.; Blankespoor, S.; Born, T.; Jagar, R.; Everman, R.; Plowman, D.; Stair, A. y Zhang, D. (1996). *Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of t4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline*. *Protein Sci* 5(4): 742-51.
- Grimaud, R.; Ezraty, B.; Mitchell, J.K.; Lafitte, D.; Briand, C.; Derrick, P.J. y Barras, F. (2001). *Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase*. *J Biol Chem* 276(52): 48915-20.

- Gruez, A.; Libiad, M.; Boschi-Muller, S. y Branlant, G. (2010). *Structural and biochemical characterization of free methionine-r-sulfoxide reductase from neisseria meningitidis*. J Biol Chem 285(32): 25033-43.
- Grunden, A.M.; Jenney, F.E., Jr.; Ma, K.; Ji, M.; Weinberg, M.V. y Adams, M.W. (2005). *In vitro reconstitution of an nadph-dependent superoxide reduction pathway from pyrococcus furiosus*. Appl Environ Microbiol 71(3): 1522-30.
- Guedon, E. y Petitdemange, H. (2001). *Identification of the gene encoding nadh-rubredoxin oxidoreductase in clostridium acetobutylicum*. Biochem Biophys Res Commun 285(2): 496-502.
- Guillen, N. (1996). *Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of entamoeba histolytica*. Trends Microbiol 4(5): 191-7.
- Gupta, N.; Bonomi, F.; Kurtz, D.M., Jr.; Ravi, N.; Wang, D.L. y Huynh, B.H. (1995). *Recombinant desulfovibrio vulgaris rubrerythrin. Isolation and characterization of the diiron domain*. Biochemistry 34(10): 3310-8.
- Hagelueken, G.; Wiehlmann, L.; Adams, T.M.; Kolmar, H.; Heinz, D.W.; Tummler, B. y Schubert, W.D. (2007). *Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin rubredoxin reductase of pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(30): 12276-81.
- Haldar, K.; Kamoun, S.; Hiller, N.L.; Bhattacharje, S. y Van Ooij, C. (2006). *Common infection strategies of pathogenic eukaryotes*. Nat Rev Microbiol 4(12): 922-31.
- Halliwell, B. (2006). *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol 141(2): 312-22.
- Hasne, M.P. y Barrett, M.P. (2000). *Transport of methionine in trypanosoma brucei brucei*. Mol Biochem Parasitol 111(2): 299-307.
- Heby, O.; Persson, L. y Rentala, M. (2007). *Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: A promising approach to therapy of african sleeping sickness, chagas' disease, and leishmaniasis*. Amino Acids 33(2): 359-66.
- Helbig, A.O.; Rosati, S.; Pijnappel, P.W.; Van Breukelen, B.; Timmers, M.H.; Mohammed, S.; Slijper, M. y Heck, A.J. (2010). *Perturbation of the yeast n-acetyltransferase natb induces elevation of protein phosphorylation levels*. BMC Genomics 11: 685.
- Henle, E.S. y Linn, S. (1997). *Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide*. J Biol Chem 272(31): 19095-8.
- Higuchi, M.; Shimada, M.; Yamamoto, Y.; Hayashi, T.; Koga, T. y Kamio, Y. (1993). *Identification of two distinct nadh oxidases corresponding to h2o2-forming oxidase and h2o-forming oxidase induced in streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 139(10): 2343-51.
- Hirose, S.; Shimizu, K.; Kanai, S.; Kuroda, Y. y Noguchi, T. (2007). *Poodle-I: A two-level svm prediction system for reliably predicting long disordered regions*. Bioinformatics 23(16): 2046-53.
- Ho, Y.S.; Burden, L.M. y Hurley, J.H. (2000). *Structure of the gaf domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic gmp receptor*. EMBO J 19(20): 5288-99.
- Hoffman, J.L. (1980). *The rate of transmethylatation in mouse liver as measured by trapping s-adenosylhomocysteine*. Arch Biochem Biophys 205(1): 132-5.

- Holt, L.J.; Tuch, B.B.; Villen, J.; Johnson, A.D.; Gygi, S.P. y Morgan, D.O. (2009). *Global analysis of cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution*. Science 325(5948): 1682-6.
- Hrdy, I.; Hirt, R.P.; Dolezal, P.; Bardonova, L.; Foster, P.G.; Tachezy, J. y Embley, T.M. (2004). *Trichomonas hydrogenosomes contain the nadh dehydrogenase module of mitochondrial complex i*. Nature 432(7017): 618-22.
- Huh, W.K.; Falvo, J.V.; Gerke, L.C.; Carroll, A.S.; Howson, R.W.; Weissman, J.S. y O'shea, E.K. (2003). *Global analysis of protein localization in budding yeast*. Nature 425(6959): 686-91.
- Husain, A.; Sato, D.; Jeelani, G.; Mi-Ichi, F.; Ali, V.; Suematsu, M.; Soga, T. y Nozaki, T. (2010). *Metabolome analysis revealed increase in s-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon l-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite entamoeba histolytica*. J Biol Chem 285(50): 39160-70.
- Imlay, J.A. (2003). *Pathways of oxidative damage*. Annu Rev Microbiol 57: 395-418.
- Imlay, J.A. (2008). *Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide*. Annu Rev Biochem 77: 755-76.
- Inobe, T.; Fishbain, S.; Prakash, S. y Matouschek, A. (2011). *Defining the geometry of the two-component proteasome degron*. Nat Chem Biol 7(3): 161-7.
- Irigoin, F.; Cibils, L.; Comini, M.A.; Wilkinson, S.R.; Flohe, L. y Radi, R. (2008). *Insights into the redox biology of trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification*. Free Radic Biol Med 45(6): 733-42.
- Iyer, L.R.; Singh, N.; Verma, A.K. y Paul, J. (2014). *Differential expression and immunolocalization of antioxidant enzymes in entamoeba histolytica isolates during metronidazole stress*. Biomed Res Int 2014: 704937.
- Jacinto, E.; Guo, B.; Arndt, K.T.; Schmelzle, T. y Hall, M.N. (2001). *Tip41 interacts with tap42 and negatively regulates the tor signaling pathway*. Mol Cell 8(5): 1017-26.
- Jeelani, G.; Husain, A.; Sato, D.; Ali, V.; Suematsu, M.; Soga, T. y Nozaki, T. (2010). *Two atypical l-cysteine-regulated nadph-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, l-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan entamoeba histolytica*. J Biol Chem 285(35): 26889-99.
- Keeling, P.J. y Slamovits, C.H. (2005). *Causes and effects of nuclear genome reduction*. Curr Opin Genet Dev 15(6): 601-8.
- Kim, H.S.; Kwak, G.H.; Lee, K.; Jo, C.H.; Hwang, K.Y. y Kim, H.Y. (2014). *Structural and biochemical analysis of a type ii free methionine-r-sulfoxide reductase from thermoplasma acidophilum*. Arch Biochem Biophys 560C: 10-19.
- Kim, H.Y.; Fomenko, D.E.; Yoon, Y.E. y Gladyshev, V.N. (2006). *Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-s-sulfoxide reductases*. Biochemistry 45(46): 13697-704.
- Kim, H.Y. y Gladyshev, V.N. (2004). *Methionine sulfoxide reduction in mammals: Characterization of methionine-r-sulfoxide reductases*. Mol Biol Cell 15(3): 1055-64.
- Kim, H.Y.; Zhang, Y.; Lee, B.C.; Kim, J.R. y Gladyshev, V.N. (2009). *The selenoproteome of clostridium sp. Ohilas: Characterization of anaerobic bacterial selenoprotein methionine sulfoxide reductase a*. Proteins 74(4): 1008-17.

- Kraut, D.A. y Matouschek, A. (2011). *Proteasomal degradation from internal sites favors partial proteolysis via remote domain stabilization*. ACS Chem Biol 6(10): 1087-95.
- Kryukov, G.V.; Kumar, R.A.; Koc, A.; Sun, Z. y Gladyshev, V.N. (2002). *Selenoprotein r is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(7): 4245-50.
- Kumar, R.A.; Koc, A.; Cerny, R.L. y Gladyshev, V.N. (2002). *Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in drosophila methionine-r-sulfoxide reductase*. J Biol Chem 277(40): 37527-35.
- Kurland, C. y Gallant, J. (1996). *Errors of heterologous protein expression*. Curr Opin Biotechnol 7(5): 489-93.
- Kwak, G.H.; Kim, M.J. y Kim, H.Y. (2010). *Cysteine-125 is the catalytic residue of saccharomyces cerevisiae free methionine-r-sulfoxide reductase*. Biochem Biophys Res Commun 395(3): 412-5.
- Ladas, S.D.; Karamanolis, G. y Ben-Soussan, E. (2007). *Colonic gas explosion during therapeutic colonoscopy with electrocautery*. World J Gastroenterol 13(40): 5295-8.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4*. Nature 227(5259): 680-5.
- Lavine, T.F. (1947). *The formation, resolution, and optical properties of the diastereoisomeric sulfoxides derived from l-methionine*. J Biol Chem 169(3): 477-91.
- Le, D.T.; Lee, B.C.; Marino, S.M.; Zhang, Y.; Fomenko, D.E.; Kaya, A.; Hacıoglu, E.; Kwak, G.H.; Koc, A.; Kim, H.Y. y Gladyshev, V.N. (2009). *Functional analysis of free methionine-r-sulfoxide reductase from saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 284(7): 4354-64.
- Le, D.T.; Tarrago, L.; Watanabe, Y.; Kaya, A.; Lee, B.C.; Tran, U.; Nishiyama, R.; Fomenko, D.E.; Gladyshev, V.N. y Tran, L.S. (2013). *Diversity of plant methionine sulfoxide reductases b and evolution of a form specific for free methionine sulfoxide*. PLoS One 8(6): e65637.
- Lee, B.C.; Le, D.T. y Gladyshev, V.N. (2008). *Mammals reduce methionine-s-sulfoxide with msra and are unable to reduce methionine-r-sulfoxide, and this function can be restored with a yeast reductase*. J Biol Chem 283(42): 28361-9.
- Lee, B.C.; Lee, Y.K.; Lee, H.J.; Stadtman, E.R.; Lee, K.H. y Chung, N. (2005). *Cloning and characterization of antioxidant enzyme methionine sulfoxide-s-reductase from caenorhabditis elegans*. Arch Biochem Biophys 434(2): 275-81.
- Lee, H.J.; Basran, J. y Scrutton, N.S. (1998). *Electron transfer from flavin to iron in the pseudomonas oleovorans rubredoxin reductase-rubredoxin electron transfer complex*. Biochemistry 37(44): 15513-22.
- Legall, J.; Prickril, B.C.; Moura, I.; Xavier, A.V.; Moura, J.J. y Huynh, B.H. (1988). *Isolation and characterization of rubrerythrin, a non-heme iron protein from desulfovibrio vulgaris that contains rubredoxin centers and a hemerythrin-like binuclear iron cluster*. Biochemistry 27(5): 1636-42.
- Lehmann, Y.; Meile, L. y Teuber, M. (1996). *Rubrerythrin from clostridium perfringens: Cloning of the gene, purification of the protein, and characterization of its superoxide dismutase function*. J Bacteriol 178(24): 7152-8.

- Lenton, T.M. (2003). *The coupled evolution of life and atmospheric oxygen*. Evolution on planet earth. The impact of the physical environment. L. Rothschild and A. Lister. London, UK, Academic Press: 35-53.
- Levin, M.J.; Franco Da Silveira, J.; Frasch, A.C.; Camargo, M.E.; Lafon, S.; Degraeve, W.M. y Rangel-Aldao, R. (1991). *Recombinant trypanosoma cruzi antigens and chagas' disease diagnosis: Analysis of a workshop*. FEMS Microbiol Immunol 4(1): 11-9.
- Liang, M.C.; Hartman, H.; Kopp, R.E.; Kirschvink, J.L. y Yung, Y.L. (2006). *Production of hydrogen peroxide in the atmosphere of a snowball earth and the origin of oxygenic photosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 103(50): 18896-9.
- Lin, J.Y. y Chadee, K. (1992). *Macrophage cytotoxicity against entamoeba histolytica trophozoites is mediated by nitric oxide from l-arginine*. J Immunol 148(12): 3999-4005.
- Lin, J.Y.; Seguin, R.; Keller, K. y Chadee, K. (1994). *Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against entamoeba histolytica by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene*. Infect Immun 62(5): 1534-41.
- Lin, Z.; Johnson, L.C.; Weissbach, H.; Brot, N.; Lively, M.O. y Lowther, W.T. (2007). *Free methionine-(r)-sulfoxide reductase from escherichia coli reveals a new gaf domain function*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(23): 9597-602.
- Lindmark, D.G. y Muller, M. (1973). *Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate tritrichomonas foetus, and its role in pyruvate metabolism*. J Biol Chem 248(22): 7724-8.
- Linster, C.L.; Van Schaftingen, E. y Hanson, A.D. (2013). *Metabolite damage and its repair or pre-emption*. Nat Chem Biol 9(2): 72-80.
- Liochev, S.I. y Fridovich, I. (1997). *Luciferin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 94(7): 2891-6.
- Liu, W.; Apagyi, K.; Mcleavy, L. y Ersfeld, K. (2009). *Expression and cellular localisation of calpain-like proteins in trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 169(1): 20-6.
- Lo, H. y Reeves, R.E. (1980). *Purification and properties of nadph:Flavin oxidoreductase from entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 2(1): 23-30.
- Loftus, B.; Anderson, I.; Davies, R.; Alsmark, U.C.; Samuelson, J.; Amedeo, P.; Roncaglia, P.; Berriman, M.; Hirt, R.P.; Mann, B.J.; Nozaki, T.; Suh, B.; Pop, M.; Duchene, M.; Ackers, J.; Tannich, E.; Leippe, M.; Hofer, M.; Bruchhaus, I.; Willhoeft, U.; Bhattacharya, A.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Hance, Z.; Harris, B.; Harris, D.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Ormond, D.; Squares, R.; Whitehead, S.; Quail, M.A.; Rabbinowitsch, E.; Norbertczak, H.; Price, C.; Wang, Z.; Guillen, N.; Gilchrist, C.; Stroup, S.E.; Bhattacharya, S.; Lohia, A.; Foster, P.G.; Sicheritz-Ponten, T.; Weber, C.; Singh, U.; Mukherjee, C.; El-Sayed, N.M.; Petri, W.A., Jr.; Clark, C.G.; Embley, T.M.; Barrell, B.; Fraser, C.M. y Hall, N. (2005). *The genome of the protist parasite entamoeba histolytica*. Nature 433(7028): 865-8.
- Ludlum, D.B.; Colinas, R.J.; Kirk, M.C. y Mehta, J.R. (1988). *Reaction of reduced metronidazole with guanosine to form an unstable adduct*. Carcinogenesis 9(4): 593-6.
- Luz, Z.M. (1999). *Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 295-8.

- Ma, K. y Adams, M.W. (1999). *A hyperactive nad(p)h:Rubredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon pyrococcus furiosus*. J Bacteriol 181(17): 5530-3.
- Ma, K. y Adams, M.W. (2001). *Nad(p)h:Rubredoxin oxidoreductase from pyrococcus furiosus*. Methods Enzymol 334: 55-62.
- Macfarlane, R.C. y Singh, U. (2006). *Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent entamoeba species: Potential implications for amebic pathogenesis*. Infect Immun 74(1): 340-51.
- Macheroux, P. (1999). *Uv-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins*. Methods Mol Biol 131: 1-7.
- Mai, Z.; Ghosh, S.; Frisardi, M.; Rosenthal, B.; Rogers, R. y Samuelson, J. (1999). *Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("Crypton") in the microaerophilic protozoan parasite entamoeba histolytica*. Mol Cell Biol 19(3): 2198-205.
- Makioka, A.; Kumagai, M.; Ohtomo, H.; Kobayashi, S. y Takeuchi, T. (2002). *Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of entamoeba histolytica and entamoeba invadens*. Parasitol Res 88(5): 454-9.
- Makiuchi, T. y Nozaki, T. (2014). *Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa*. Biochimie 100: 3-17.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. N. Y. - USA, Cold Spring Harbor.
- Maralikova, B.; Ali, V.; Nakada-Tsukui, K.; Nozaki, T.; Van Der Giezen, M.; Henze, K. y Tovar, J. (2010). *Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria*. Cell Microbiol 12(3): 331-42.
- Marinho, F.A.; Goncalves, K.C.; Oliveira, S.S.; Goncalves, D.S.; Matteoli, F.P.; Seabra, S.H.; Oliveira, A.C.; Bellio, M.; Souto-Padron, T.; D'avila-Levy, C.M.; Santos, A.L. y Branquinha, M.H. (2014). *The calpain inhibitor mdl28170 induces the expression of apoptotic markers in leishmania amazonensis promastigotes*. PLoS One 9(1): e87659.
- Mashima, R.; Nakanishi-Ueda, T. y Yamamoto, Y. (2003). *Simultaneous determination of methionine sulfoxide and methionine in blood plasma using gas chromatography-mass spectrometry*. Anal Biochem 313(1): 28-33.
- Mason, R.P. y Holtzman, J.L. (1975). *The role of catalytic superoxide formation in the o₂ inhibition of nitroreductase*. Biochem Biophys Res Commun 67(4): 1267-74.
- Mastronicola, D.; Giuffre, A.; Testa, F.; Mura, A.; Forte, E.; Bordi, E.; Pucillo, L.P.; Fiori, P.L. y Sarti, P. (2011). *Giardia intestinalis escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis*. IUBMB Life 63(1): 21-5.
- Mateo, H.; Marin, C.; Perez-Cordon, G. y Sanchez-Moreno, M. (2008). *Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 103(3): 271-6.
- Mathieu, I.; Meyer, J. y Moulis, J.M. (1992). *Cloning, sequencing and expression in escherichia coli of the rubredoxin gene from clostridium pasteurianum*. Biochem J 285 (Pt 1): 255-62.
- Matsumoto, J.; Higuchi, M.; Shimada, M.; Yamamoto, Y. y Kamio, Y. (1996). *Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the h₂o-forming nadh oxidase from streptococcus mutans*. Biosci Biotechnol Biochem 60(1): 39-43.

- Mattos, E.C.; Schumacher, R.I.; Colli, W. y Alves, M.J. (2012). *Adhesion of trypanosoma cruzi trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation*. PLoS One 7(10): e46767.
- Maudlin, I.; Holmes, P.H. y Miles, M.A. (2004). *The trypanosomiases*. Wallingford, UK, CABI Pub.
- Mazzuco, A.; Benchimol, M. y De Souza, W. (1997). *Endoplasmic reticulum and golgi-like elements in entamoeba*. Micron 28(3): 241-7.
- Mccord, J.M.; Keele, B.B., Jr. y Fridovich, I. (1971). *An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase*. Proc Natl Acad Sci U S A 68(5): 1024-7.
- Mckay, C.P. y Hartman, H. (1991). *Hydrogen peroxide and the evolution of oxygenic photosynthesis*. Orig Life Evol Biosph 21: 157-63.
- Meehan, B.M.; Baughn, A.D.; Gallegos, R. y Malamy, M.H. (2012). *Inactivation of a single gene enables microaerobic growth of the obligate anaerobe bacteroides fragilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 109(30): 12153-8.
- Mentel, M.; Zimorski, V.; Haferkamp, P.; Martin, W. y Henze, K. (2008). *Protein import into hydrogenosomes of trichomonas vaginalis involves both n-terminal and internal targeting signals: A case study of thioredoxin reductases*. Eukaryot Cell 7(10): 1750-7.
- Meza, I.; Talamas-Rohana, P. y Vargas, M.A. (2006). *The cytoskeleton of entamoeba histolytica: Structure, function, and regulation by signaling pathways*. Arch Med Res 37(2): 234-43.
- Mi-Ichi, F.; Abu Yousuf, M.; Nakada-Tsukui, K. y Nozaki, T. (2009). *Mitosomes in entamoeba histolytica contain a sulfate activation pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A 106(51): 21731-6.
- Mi-Ichi, F.; Makiuchi, T.; Furukawa, A.; Sato, D. y Nozaki, T. (2011). *Sulfate activation in mitosomes plays an important role in the proliferation of entamoeba histolytica*. PLoS Negl Trop Dis 5(8): e1263.
- Michels, P.A.; Bringaud, F.; Herman, M. y Hannaert, V. (2006). *Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids*. Biochim Biophys Acta 1763(12): 1463-77.
- Mielniczki-Pereira, A.A.; Chiavegatto, C.M.; Lopez, J.A.; Colli, W.; Alves, M.J. y Gadelha, F.R. (2007). *Trypanosoma cruzi strains, tulahuen 2 and y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities*. Acta Trop 101(1): 54-60.
- Minning, T.A.; Weatherly, D.B.; Atwood, J., 3rd; Orlando, R. y Tarleton, R.L. (2009). *The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of trypanosoma cruzi*. BMC Genomics 10: 370.
- Momen, H. (1999). *Taxonomy of trypanosoma cruzi: A commentary on characterization and nomenclature*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 181-4.
- Montalvo, F.E.; Reeves, R.E. y Warren, L.G. (1971). *Aerobic and anaerobic metabolism in entamoeba histolytica*. Exp Parasitol 30(2): 249-56.
- Moskovitz, J. (2005). *Methionine sulfoxide reductases: Ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases*. Biochim Biophys Acta 1703(2): 213-9.
- Moskovitz, J.; Poston, J.M.; Berlett, B.S.; Nosworthy, N.J.; Szczepanowski, R. y Stadtman, E.R. (2000). *Identification and characterization of a putative active*

- site for peptide methionine sulfoxide reductase (*msra*) and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem* 275(19): 14167-72.
- Muhlenhoff, U.; Richhardt, N.; Gerber, J. y Lill, R. (2002). *Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for atp, nadh, and reduced iron.* *J Biol Chem* 277(33): 29810-6.
- Mukherjee, C.; Majumder, S. y Lohia, A. (2009). *Inter-cellular variation in DNA content of entamoeba histolytica originates from temporal and spatial uncoupling of cytokinesis from the nuclear cycle.* *PLoS Negl Trop Dis* 3(4): e409.
- Muller, M. (1983). *Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa.* *Surgery* 93(1 Pt 2): 165-71.
- Muller, M. (1986). *Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms.* *Biochem Pharmacol* 35(1): 37-41.
- Muller, M. (1988). *Energy metabolism of protozoa without mitochondria.* *Annu Rev Microbiol* 42: 465-88.
- Muller, M.; Mentel, M.; Van Hellemond, J.J.; Henze, K.; Woehle, C.; Gould, S.B.; Yu, R.Y.; Van Der Giezen, M.; Tielens, A.G. y Martin, W.F. (2012). *Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes.* *Microbiol Mol Biol Rev* 76(2): 444-95.
- Mumberg, D.; Muller, R. y Funk, M. (1995). *Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds.* *Gene* 156(1): 119-22.
- Murta, S.M.; Gazzinelli, R.T.; Brener, Z. y Romanha, A.J. (1998). *Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of trypanosoma cruzi to benznidazole and nifurtimox.* *Mol Biochem Parasitol* 93(2): 203-14.
- Nakashima, A.; Tanimura-Ito, K.; Oshiro, N.; Eguchi, S.; Miyamoto, T.; Momonami, A.; Kamada, S.; Yonezawa, K. y Kikkawa, U. (2013). *A positive role of mammalian tip41-like protein, tiprl, in the amino-acid dependent mtorc1-signaling pathway through interaction with pp2a.* *FEBS Lett* 587(18): 2924-9.
- Nishikawa, K.; Shomura, Y.; Kawasaki, S.; Niimura, Y. y Higuchi, Y. (2010). *Crystal structure of nadh:Rubredoxin oxidoreductase from clostridium acetobutylicum: A key component of the dioxygen scavenging system in obligatory anaerobes.* *Proteins* 78(4): 1066-70.
- Niviere, V. y Fontecave, M. (2004). *Discovery of superoxide reductase: An historical perspective.* *J Biol Inorg Chem* 9(2): 119-23.
- Nixon, J.E.; Wang, A.; Field, J.; Morrison, H.G.; McArthur, A.G.; Sogin, M.L.; Loftus, B.J. y Samuelson, J. (2002). *Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, nadh oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to giardia lamblia and entamoeba histolytica.* *Eukaryot Cell* 1(2): 181-90.
- Nordberg, J. y Arner, E.S. (2001). *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.* *Free Radic Biol Med* 31(11): 1287-312.
- Nozaki, T. y Bhattacharya, A. (2015). *Amebiasis: Biology and pathogenesis of entamoeba*, Springer.
- Olego-Fernandez, S.; Vaughan, S.; Shaw, M.K.; Gull, K. y Ginger, M.L. (2009). *Cell morphogenesis of trypanosoma brucei requires the paralogous, differentially expressed calpain-related proteins cap5.5 and cap5.5v.* *Protist* 160(4): 576-90.
- Opperdoes, F.R. (1987). *Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes.* *Annu Rev Microbiol* 41: 127-51.

- Orrenius, S.; Mcconkey, D.J.; Bellomo, G. y Nicotera, P. (1989). *Role of ca²⁺ in toxic cell killing*. Trends Pharmacol Sci 10(7): 281-5.
- Paget, T.A. y Lloyd, D. (1990). *Trichomonas vaginalis requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth*. Mol Biochem Parasitol 41(1): 65-72.
- Pal, D.; Banerjee, S.; Cui, J.; Schwartz, A.; Ghosh, S.K. y Samuelson, J. (2009). *Giardia, entamoeba, and trichomonas enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases)*. Antimicrob Agents Chemother 53(2): 458-64.
- Parsons, M. (2004). *Glycosomes: Parasites and the divergence of peroxisomal purpose*. Mol Microbiol 53(3): 717-24.
- Patel, R.P.; Mcandrew, J.; Sellak, H.; White, C.R.; Jo, H.; Freeman, B.A. y Darley-Usmar, V.M. (1999). *Biological aspects of reactive nitrogen species*. Biochim Biophys Acta 1411(2-3): 385-400.
- Peck, L.S. y Chapelle, G. (2003). *Reduced oxygen at high altitude limits maximum size*. Proc Biol Sci 270 Suppl 2: S166-7.
- Petropoulos, I. y Friguet, B. (2006). *Maintenance of proteins and aging: The role of oxidized protein repair*. Free Radic Res 40(12): 1269-76.
- Piacenza, L.; Zago, M.P.; Peluffo, G.; Alvarez, M.N.; Basombrio, M.A. y Radi, R. (2009). *Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of trypanosoma cruzi virulence*. Int J Parasitol 39(13): 1455-64.
- Poole, A.M. y Penny, D. (2007). *Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes*. Bioessays 29(1): 74-84.
- Poole, L.B.; Chae, H.Z.; Flores, B.M.; Reed, S.L.; Rhee, S.G. y Torian, B.E. (1997). *Peroxidase activity of a tsa-like antioxidant protein from a pathogenic amoeba*. Free Radic Biol Med 23(6): 955-9.
- Pramila, T.; Wu, W.; Miles, S.; Noble, W.S. y Breeden, L.L. (2006). *The forkhead transcription factor hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the s-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle*. Genes Dev 20(16): 2266-78.
- Prickril, B.C.; Kurtz, D.M., Jr.; Legall, J. y Voordouw, G. (1991). *Cloning and sequencing of the gene for rubrerythrin from desulfovibrio vulgaris (hildenborough)*. Biochemistry 30(46): 11118-23.
- Punukollu, G.; Gowda, R.M.; Khan, I.A.; Navarro, V.S. y Vasavada, B.C. (2007). *Clinical aspects of the chagas' heart disease*. Int J Cardiol 115(3): 279-83.
- Putz, S.; Gelius-Dietrich, G.; Piotrowski, M. y Henze, K. (2005). *Rubrerythrin and peroxiredoxin: Two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 142(2): 212-23.
- Quijano, C.; Alvarez, B.; Gatti, R.M.; Augusto, O. y Radi, R. (1997). *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups*. Biochem J 322 (Pt 1): 167-73.
- Racagni, G.E. y Machado De Domenech, E.E. (1983). *Characterization of trypanosoma cruzi hexokinase*. Mol Biochem Parasitol 9(2): 181-8.
- Radisic, M.; Deen, W.; Langer, R. y Vunjak-Novakovic, G. (2005). *Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288(3): H1278-89.

- Ramos, E.; Olivos-Garcia, A.; Nequiz, M.; Saavedra, E.; Tello, E.; Saralegui, A.; Montfort, I. y Perez Tamayo, R. (2007). *Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. *Exp Parasitol* 116(3): 257-65.
- Rape, M. y Jentsch, S. (2002). *Taking a bite: Proteasomal protein processing*. *Nat Cell Biol* 4(5): E113-6.
- Reeves, R.E. (1984). *Metabolism of entamoeba histolytica schaudinn, 1903*. *Adv Parasitol* 23: 105-42.
- Reeves, R.E.; Guthrie, J.D. y Lobelle-Rich, P. (1980). *Entamoeba histolytica*: Isolation of ferredoxin. *Exp Parasitol* 49(1): 83-8.
- Reeves, R.E.; Warren, L.G.; Susskind, B. y Lo, H.S. (1977). *An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in entamoeba histolytica. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase*. *J Biol Chem* 252(2): 726-31.
- Rhee, S.G.; Kang, S.W.; Jeong, W.; Chang, T.S.; Yang, K.S. y Woo, H.A. (2005). *Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins*. *Curr Opin Cell Biol* 17(2): 183-9.
- Richardson, J.S. (1981). *The anatomy and taxonomy of protein structure*. *Adv Protein Chem* 34: 167-339.
- Riebe, O.; Fischer, R.J.; Wampler, D.A.; Kurtz, D.M., Jr. y Bahl, H. (2009). *Pathway for h2o2 and o2 detoxification in clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* 155(Pt 1): 16-24.
- Robinson, J.L. y Brynildsen, M.P. (2013). *A kinetic platform to determine the fate of nitric oxide in escherichia coli*. *PLoS Comput Biol* 9(5): e1003049.
- Rodrigues Coura, J. y De Castro, S.L. (2002). *A critical review on chagas disease chemotherapy*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1): 3-24.
- Rolfe, R.D.; Hentges, D.J.; Campbell, B.J. y Barrett, J.T. (1978). *Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria*. *Appl Environ Microbiol* 36(2): 306-13.
- Rosenthal, B.; Mai, Z.; Caplivski, D.; Ghosh, S.; De La Vega, H.; Graf, T. y Samuelson, J. (1997). *Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite entamoeba histolytica*. *J Bacteriol* 179(11): 3736-45.
- Saldivia, M.; Barquilla, A.; Bart, J.M.; Diaz-Gonzalez, R.; Hall, M.N. y Navarro, M. (2013). *Target of rapamycin (tor) kinase in trypanosoma brucei: An extended family*. *Biochem Soc Trans* 41(4): 934-8.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual (3-volume set)*. N.Y. - USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, C. (2000). *Origen y evolución del parasitismo*. Discurso de ingreso. Academia de Ciencias de Zaragoza.
- Sanchez, L.; Horner, D.; Moore, D.; Henze, K.; Embley, T. y Muller, M. (2002). *Fructose-1,6-bisphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships*. *Gene* 295(1): 51-9.
- Sangenito, L.S.; Ennes-Vidal, V.; Marinho, F.A.; Da Mota, F.F.; Santos, A.L.; D'Avila-Levy, C.M. y Branquinha, M.H. (2009). *Arrested growth of trypanosoma cruzi by the calpain inhibitor mdl28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms*. *Parasitology* 136(4): 433-41.
- Sansom, F.M.; Tang, L.; Ralton, J.E.; Saunders, E.C.; Naderer, T. y Mcconville, M.J. (2013). *Leishmania major methionine sulfoxide reductase a is required for*

- resistance to oxidative stress and efficient replication in macrophages.* PLoS One 8(2): e56064.
- Santi-Rocca, J.; Smith, S.; Weber, C.; Pineda, E.; Hon, C.C.; Saavedra, E.; Olivos-Garcia, A.; Rousseau, S.; Dillies, M.A.; Coppee, J.Y. y Guillen, N. (2012). *Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanism is activated in entamoeba histolytica upon treatment with nitric oxide.* PLoS One 7(2): e31777.
- Sargeant, P.G.; Williams, J.E. y Grene, J.D. (1978). *The differentiation of invasive and non-invasive entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis.* Trans R Soc Trop Med Hyg 72(5): 519-21.
- Scandalios, J.G.; Guan, L. y Polidoros, A.N. (1997). *Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation, and expression.* Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, Cold Spring Harbor: 343-406.
- Schaefer, C.W. (2003). *Triatominae (hemiptera: Reduviidae): Systematic questions and some others.* Neotropical Entomology 32(1): 1-10.
- Schenone, H. (1999). *Xenodiagnosis.* Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 289-94.
- Schmid-Hempel, P. (2009). *Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364(1513): 85-98.
- Schmunis, G.A. (2007). *Epidemiology of chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration.* Mem Inst Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 75-85.
- Schneider, R.E.; Brown, M.T.; Shiflett, A.M.; Dyall, S.D.; Hayes, R.D.; Xie, Y.; Loo, J.A. y Johnson, P.J. (2012). *The trichomonas vaginalis hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes.* Int J Parasitol 41(13-14): 1421-34.
- Semenza, G.L. (2007). *Life with oxygen.* Science 318(5847): 62-4.
- Sevanian, A. y Ursini, F. (2000). *Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: Similarities and differences.* Free Radic Biol Med 29(3-4): 306-11.
- Shames, S.L.; Fairlamb, A.H.; Cerami, A. y Walsh, C.T. (1986). *Purification and characterization of trypanothione reductase from crithidia fasciculata, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases.* Biochemistry 25(12): 3519-26.
- Sharov, V.S.; Ferrington, D.A.; Squier, T.C. y Schoneich, C. (1999). *Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase.* FEBS Lett 455(3): 247-50.
- Sieker, L.C.; Holmes, M.; Le Trong, I.; Turley, S.; Liu, M.Y.; Legall, J. y Stenkamp, R.E. (2000). *The 1.9 Å crystal structure of the "As isolated" Rubrerythrin from desulfovibrio vulgaris: Some surprising results.* J Biol Inorg Chem 5(4): 505-13.
- Simonian, N.A. y Coyle, J.T. (1996). *Oxidative stress in neurodegenerative diseases.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 83-106.
- Slesak, I.; Slesak, H. y Kruk, J. (2012). *Oxygen and hydrogen peroxide in the early evolution of life on earth: In silico comparative analysis of biochemical pathways.* Astrobiology 12(8): 775-84.
- Smolka, M.B.; Albuquerque, C.P.; Chen, S.H. y Zhou, H. (2007). *Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases.* Proc Natl Acad Sci U S A 104(25): 10364-9.

- Smutna, T.; Goncalves, V.L.; Saraiva, L.M.; Tachezy, J.; Teixeira, M. y Hrdy, I. (2009). *Flavodiiron protein from trichomonas vaginalis hydrogenosomes: The terminal oxygen reductase*. Eukaryot Cell 8(1): 47-55.
- Solomons, N.W. (1993). *Pathways to the impairment of human nutritional status by gastrointestinal pathogens*. Parasitology 107 Suppl: S19-35.
- Soulard, A.; Cremonesi, A.; Moes, S.; Schutz, F.; Jenö, P. y Hall, M.N. (2010). *The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that tor controls protein kinase a toward some but not all substrates*. Mol Biol Cell 21(19): 3475-86.
- Southorn, P.A. y Powis, G. (1988). *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions*. Mayo Clin Proc 63(4): 381-9.
- Souza, W. (2008). *Electron microscopy of trypanosomes--a historical view*. Mem Inst Oswaldo Cruz 103(4): 313-25.
- Srikumar, T.; Lewicki, M.C.; Costanzo, M.; Tkach, J.M.; Van Bakel, H.; Tsui, K.; Johnson, E.S.; Brown, G.W.; Andrews, B.J.; Boone, C.; Giaever, G.; Nislow, C. y Raught, B. (2013). *Global analysis of sumo chain function reveals multiple roles in chromatin regulation*. J Cell Biol 201(1): 145-63.
- Stadtman, E.R. y Levine, R.L. (2000). *Protein oxidation*. Ann N Y Acad Sci 899: 191-208.
- Stadtman, E.R. y Oliver, C.N. (1991). *Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences*. J Biol Chem 266(4): 2005-8.
- Stanley, S.L., Jr. (2003). *Amoebiasis*. Lancet 361(9362): 1025-34.
- Sun, F.; Dai, C.; Xie, J. y Hu, X. (2012). *Biochemical issues in estimation of cytosolic free nad/nadh ratio*. PLoS One 7(5): e34525.
- Swaney, D.L.; Beltrao, P.; Starita, L.; Guo, A.; Rush, J.; Fields, S.; Krogan, N.J. y Villen, J. (2013). *Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation*. Nat Methods 10(7): 676-82.
- Tannich, E. y Burchard, G.D. (1991). *Differentiation of pathogenic from nonpathogenic entamoeba histolytica by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro*. J Clin Microbiol 29(2): 250-5.
- Tardieux, I.; Webster, P.; Ravesloot, J.; Boron, W.; Lunn, J.A.; Heuser, J.E. y Andrews, N.W. (1992). *Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells*. Cell 71(7): 1117-30.
- Taylor, M. y Gutteridge, W.E. (1986). *The regulation of phosphofructokinase in epimastigote trypanosoma cruzi*. FEBS Lett 201(2): 262-6.
- Taylor, M.B. y Gutteridge, W.E. (1987). *Trypanosoma cruzi: Subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes*. Exp Parasitol 63(1): 84-97.
- Teixeira, A.R.; Nascimento, R.J. y Sturm, N.R. (2006). *Evolution and pathology in chagas disease--a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz 101(5): 463-91.
- Teixeira, A.R.; Nitz, N.; Guimaro, M.C.; Gomes, C. y Santos-Buch, C.A. (2006). *Chagas disease*. Postgrad Med J 82(974): 788-98.
- Teixeira, S.M. (1998). *Control of gene expression in trypanosomatidae*. Braz J Med Biol Res 31(12): 1503-16.
- Teixeira, S.M. y Darocha, W.D. (2003). *Control of gene expression and genetic manipulation in the trypanosomatidae*. Genet Mol Res 2(1): 148-58.

- Thorgersen, M.P.; Stirrett, K.; Scott, R.A. y Adams, M.W. (2012). *Mechanism of oxygen detoxification by the surprisingly oxygen-tolerant hyperthermophilic archaeon, pyrococcus furiosus*. Proc Natl Acad Sci U S A 109(45): 18547-52.
- Tkach, J.M.; Yimit, A.; Lee, A.Y.; Riffle, M.; Costanzo, M.; Jaschob, D.; Hendry, J.A.; Ou, J.; Moffat, J.; Boone, C.; Davis, T.N.; Nislow, C. y Brown, G.W. (2012). *Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress*. Nat Cell Biol 14(9): 966-76.
- Todisco, S.; Agrimi, G.; Castegna, A. y Palmieri, F. (2006). *Identification of the mitochondrial nad⁺ transporter in saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 281(3): 1524-31.
- Toennies, G. y Kolb, J.J. (1939). *Methionine studies. li. DI-methionine sulfoxide*. J Biol Chem 128: 399-405.
- Tonzetich, Z.J.; Wang, H.; Mitra, D.; Tinberg, C.E.; Do, L.H.; Jenney, F.E., Jr.; Adams, M.W.; Cramer, S.P. y Lippard, S.J. (2010). *Identification of protein-bound dinitrosyl iron complexes by nuclear resonance vibrational spectroscopy*. J Am Chem Soc 132(20): 6914-6.
- Tovar, J.; Fischer, A. y Clark, C.G. (1999). *The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite entamoeba histolytica*. Mol Microbiol 32(5): 1013-21.
- Tovar, J.; Leon-Avila, G.; Sanchez, L.B.; Sutak, R.; Tachezy, J.; Van Der Giezen, M.; Hernandez, M.; Muller, M. y Lucocq, J.M. (2003). *Mitochondrial remnant organelles of giardia function in iron-sulphur protein maturation*. Nature 426(6963): 172-6.
- Towe, K.M. (1970). *Oxygen-collagen priority and the early metazoan fossil record*. Proc Natl Acad Sci U S A 65(4): 781-8.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. (2001). *The life cycle of trypanosoma cruzi revisited*. Int J Parasitol 31(5-6): 472-81.
- Umezawa, E.S. y Silveira, J.F. (1999). *Serological diagnosis of chagas disease with purified and defined trypanosoma cruzi antigens*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 285-8.
- Urbaniak, M.D.; Martin, D.M. y Ferguson, M.A. (2013). *Global quantitative silac phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of trypanosoma brucei*. J Proteome Res 12(5): 2233-44.
- Urbina, J.A. y Crespo, A. (1984). *Regulation of energy metabolism in trypanosoma (schizotrypanum) cruzi epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase*. Mol Biochem Parasitol 11: 225-39.
- Urbina, J.A. y Docampo, R. (2003). *Specific chemotherapy of chagas disease: Controversies and advances*. Trends Parasitol 19(11): 495-501.
- Vaitukaitis, J.; Robbins, J.B.; Nieschlag, E. y Ross, G.T. (1971). *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen*. J Clin Endocrinol Metab 33(6): 988-91.
- Vaupel, P.; Kallinowski, F. y Okunieff, P. (1989). *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review*. Cancer Res 49(23): 6449-65.

- Veech, R.L.; Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. (1969). *The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver*. *Biochem J* 115(4): 609-19.
- Vicente, J.B.; Carrondo, M.A.; Teixeira, M. y Frazao, C. (2008). *Structural studies on flavodiiron proteins*. *Methods Enzymol* 437: 3-19.
- Vicente, J.B.; Ehrenkaufer, G.M.; Saraiva, L.M.; Teixeira, M. y Singh, U. (2009). *Entamoeba histolytica modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: Implications for amebic pathogenesis*. *Cell Microbiol* 11(1): 51-69.
- Vicente, J.B.; Scandurra, F.M.; Forte, E.; Brunori, M.; Sarti, P.; Teixeira, M. y Giuffre, A. (2008). *Kinetic characterization of the escherichia coli nitric oxide reductase flavorubredoxin*. *Methods Enzymol* 437: 47-62.
- Vicente, J.B.; Tran, V.; Pinto, L.; Teixeira, M. y Singh, U. (2012). *A detoxifying oxygen reductase in the anaerobic protozoan entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 11(9): 1112-8.
- Vickerman, K. (1985). *Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes*. *Br Med Bull* 41(2): 105-14.
- Vidakovic, M.S.; Fraczekiewicz, G. y Germanas, J.P. (1996). *Expression and spectroscopic characterization of the hydrogenosomal [2fe-2s] ferredoxin from the protozoan trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 271(25): 14734-9.
- Vine, C.E. y Cole, J.A. (2011). *Nitrosative stress in escherichia coli: Reduction of nitric oxide*. *Biochem Soc Trans* 39(1): 213-5.
- Ward, D.E.; Donnelly, C.J.; Mullendore, M.E.; Van Der Oost, J.; De Vos, W.M. y Crane, E.J., 3rd (2001). *The nadh oxidase from pyrococcus furiosus. Implications for the protection of anaerobic hyperthermophiles against oxidative stress*. *Eur J Biochem* 268(22): 5816-23.
- Wassmann, C.; Hellberg, A.; Tannich, E. y Bruchhaus, I. (1999). *Metronidazole resistance in the protozoan parasite entamoeba histolytica is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase*. *J Biol Chem* 274(37): 26051-6.
- Watkins, G.R.; Wang, N.; Mazaloukas, M.D.; Gomez, R.J.; Guthrie, C.R.; Kraemer, B.C.; Schweiger, S.; Spiller, B.W. y Wadzinski, B.E. (2012). *Monoubiquitination promotes calpain cleavage of the protein phosphatase 2a (pp2a) regulatory subunit alpha4, altering pp2a stability and microtubule-associated protein phosphorylation*. *J Biol Chem* 287(29): 24207-15.
- Weber, C.; Guigon, G.; Bouchier, C.; Frangeul, L.; Moreira, S.; Sismeiro, O.; Gouyette, C.; Mirelman, D.; Coppee, J.Y. y Guillen, N. (2006). *Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the gal/galnac lectin in entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 5(5): 871-5.
- Weinbach, E.C. y Diamond, L.S. (1974). *Entamoeba histolytica. I. Aerobic metabolism*. *Exp Parasitol* 35(2): 232-43.
- Weinberg, M.V.; Jenney, F.E., Jr.; Cui, X. y Adams, M.W. (2004). *Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon pyrococcus furiosus is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase*. *J Bacteriol* 186(23): 7888-95.

- West, S.B.; Wislocki, P.G.; Fiorentini, K.M.; Alvaro, R.; Wolf, F.J. y Lu, A.Y. (1982). *Drug residue formation from ronidazole, a 5-nitroimidazole. I. Characterization of in vitro protein alkylation*. Chem Biol Interact 41(3): 265-79.
- Who (1997). *News and activities*. Bull WHO 75(3): 291-292.
- Wilkinson, S.R.; Meyer, D.J.; Taylor, M.C.; Bromley, E.V.; Miles, M.A. y Kelly, J.M. (2002). *The trypanosoma cruzi enzyme tcgpxi is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin*. J Biol Chem 277(19): 17062-71.
- Wilkinson, S.R.; Taylor, M.C.; Touitha, S.; Mauricio, I.L.; Meyer, D.J. y Kelly, J.M. (2002). *Tcgpxii, a glutathione-dependent trypanosoma cruzi peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum*. Biochem J 364(Pt 3): 787-94.
- Willhoeft, U. y Tannich, E. (1999). *The electrophoretic karyotype of entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 99(1): 41-53.
- Williamson, D.H.; Lund, P. y Krebs, H.A. (1967). *The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver*. Biochem J 103(2): 514-27.
- Wincker, P.; Britto, C.; Pereira, J.B.; Cardoso, M.A.; Oelemann, W. y Morel, C.M. (1994). *Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect trypanosoma cruzi in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area*. Am J Trop Med Hyg 51(6): 771-7.
- Winterbourn, C.C. (2008). *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. Nat Chem Biol 4(5): 278-86.
- Winyard, P.G.; Moody, C.J. y Jacob, C. (2005). *Oxidative activation of antioxidant defence*. Trends Biochem Sci 30(8): 453-61.
- Wittner, M. (1968). *Growth characteristics of axenic strains of entamoeba histolytica schaudinn, 1903*. J Protozool 15(3): 403-6.
- Witty, M.J. (1999). *Current strategies in the search for novel antiparasitic agents*. Int J Parasitol 29(1): 95-103; discussion 113-4.
- Yang, W.; Rogers, P.A. y Ding, H. (2002). *Repair of nitric oxide-modified ferredoxin [2fe-2s] cluster by cysteine desulfurase (iscs)*. J Biol Chem 277(15): 12868-73.
- Yang, X. y Ma, K. (2007). *Characterization of an exceedingly active nadh oxidase from the anaerobic hyperthermophilic bacterium thermotoga maritima*. J Bacteriol 189(8): 3312-7.
- Yarlett, N.; Garofalo, J.; Goldberg, B.; Ciminelli, M.A.; Ruggiero, V.; Sufrin, J.R. y Bacchi, C.J. (1993). *S-adenosylmethionine synthetase in bloodstream trypanosoma brucei*. Biochim Biophys Acta 1181(1): 68-76.
- Zaki, M.; Andrew, N. y Insall, R.H. (2006). *Entamoeba histolytica cell movement: A central role for self-generated chemokines and chemorepellents*. Proc Natl Acad Sci U S A 103(49): 18751-6.
- Zhao, H.; Kim, G. y Levine, R.L. (2012). *Methionine sulfoxide reductase contributes to meeting dietary methionine requirements*. Arch Biochem Biophys 522(1): 37-43.
- Zingales, B.; Andrade, S.G.; Briones, M.R.; Campbell, D.A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A.M.; Machado, C.R.; Miles, M.A.; Romanha, A.J.; Sturm, N.R.; Tibayrenc, M. y Schijman, A.G. (2009). *A new consensus for trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends tci to tcv*. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(7): 1051-4.

