



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

Laboratorio de Bioquímica Microbiana
Laboratorio de Enzimología Molecular

“Estudio comparativo de proteínas involucradas en el balance de óxido-reducción en diferentes organismos. Caracterización del sistema de tiorredoxina en protozoos y algas eucariotas.”

Lic. Diego Gustavo Arias

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director: Dr. Sergio A. Guerrero

Codirector: Dr. Alberto A. Iglesias

2009

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 y aceptarme bajo su dirección, por su predisposición para escuchar y discutir nuevas ideas y avanzar en el desarrollo de las mismas, mostrando dedicación permanente durante estos años.

Al Dr. Alberto Iglesias por introducirme en este mundo maravilloso y contagiarme de su entusiasmo por la ciencia. Por su compromiso, por sus aportes científicos y por las discusiones enriquecedoras que contribuyeron a mi formación.

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

A los organismos que financiaron 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 todo el apoyo institucional que me brindó y por permitirme la realización de la carrera de Doctorado.

A mis compañeros de laboratorio, con los que me inicié en este camino: Carlos, Vanesa, Matías Damián, Lucila, Belén, Ana y Cecilia, gracias por el apoyo, el optimismo, por estar siempre dispuestos a discutir y compartir cualquier tema, científico o personal, por darme ánimo en los momentos de pesimismo, por aceptar y brindar consejos, por las miles de transformaciones, geles y "prestamos" con los que me sacaron de apuro, por la amistad que llevamos dentro y fuera de la facultad. A los más "jóvenes": Matías, Carolina, Gastón, Esteban y Andrea gracias por el entusiasmo, la alegría compartida y la buena predisposición. A Matías Sebastián y a Vanina por la buena voluntad para escuchar mis ideas "redoxínicas", por el buen humor que siempre irradian y por el auxilio que me brindaron a la hora de experimentar con los parásitos. A Mabel por responder mis consultas "interminables" de enzimología con la mejor onda que la caracteriza. A César por ese "¡Fantástico!" de cada día con el cual me saca una sonrisa, por ayudarme con los cultivos sin inconveniente alguno y por lo compartido fuera del laboratorio.

A Gabriela y a Félix, gracias por el aguante que me tienen desde que comenzamos a estudiar, por brindarme su amistad desinteresada.

Al Dr. Alejandro Beccaria, por su amabilidad, su atención y por las largas charlas fructíferas y alentadoras. Al Dr. Juan Claus por ofrecer siempre su ayuda. A Verónica por la alegría compartida.

A la Dra. Raquel Chan, al Dr. Daniel González y a todos los integrantes de la Cátedra de Biología Celular y Molecular. Gracias por los consejos, ayudas, su buena onda, y los buenos momentos compartidos. A Toto por su compañerismo, siempre predispuesto a atender mis inquietudes.

A toda mi familia, gracias por darme fuerzas para seguir adelante, por apoyarme y acompañarme siempre. A vos mamá, por tu esfuerzo y cariño que sigue presente en mi corazón, iluminándome y guiándome por la vida.

A Carolina por estar siempre a mi lado con todo su amor y entrega incondicional. Gracias por tus sacrificios y por la felicidad de permanecer juntos.

A todos ellos les digo GRACIAS.-

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica Microbiana y en el Laboratorio de Enzimología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral bajo la dirección del Dr. Sergio A. Guerrero y la co-dirección del Dr. Alberto A. Iglesias.

Parte de los resultados expuestos fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Publicaciones.

- 2007 - Arias, Diego G.; Gutiérrez, César E.; Iglesias, Alberto A. and Guerrero, Sergio A. "*Thioredoxin-linked metabolism in Entamoeba histolytica*". Free Radical Biology and Medicine, 42, 1496-1505.
- 2008 - Arias, Diego G., Carranza, Pedro G., Lujan, Hugo D., Iglesias, Alberto A. and Guerrero, Sergio A. "*Immunolocalization and functional characterization of the thioredoxin system in Entamoeba histolytica*". Free Radical Biology and Medicine, 45, 32-39.

Reuniones Científicas.

- 2005 - SAIB XLI Reunión Anual. Póster: "*Thioredoxin reductase from Entamoeba histolytica HK9. Molecular cloning and functional characterization*". Arias D, Gutiérrez C, Guerrero SA, Iglesias AA. 3-6 de diciembre, Pinamar - Argentina. El resumen del trabajo ha sido publicado en el suplemento BIOCELL, 29, 170.
- 2006 - SAP - XXI Reunión Anual. Póster: "*Evidencia de un sistema TRXR/TRX en Entamoeba histolytica*". Arias D, Gutiérrez C, Guerrero SA, Iglesias AA. 25-27 de octubre. Huerta Grande - Córdoba - Argentina.
- 2006 - SAIB XLII Reunión Anual. Póster: "*Thioredoxin linked metabolism in Entamoeba histolytica*". Arias D, Gutiérrez C, Guerrero SA, Iglesias AA. 12-15 de noviembre. Rosario - Argentina.
- 2006 - SAIB XLII Reunión Anual. Póster: "*Redox metabolism in Phaeodactylum tricornutum*". Arias D, Guerrero SA, Iglesias AA. 12-15 de noviembre. Rosario - Argentina.
- 2007 - SAIB XLIII Reunión Anual. Póster: "*Characterization of a new thioredoxin system from Entamoeba histolytica*". Arias D.G., Iglesias AA, Guerrero SA. 17-20 de noviembre. Mar

del Plata - Argentina. El resumen del trabajo ha sido publicado en el suplemento BIOCELL, 31, 145.

- 2007 - SAIB XLIII Reunión Anual. Póster: "*Glutathione reductase from Phaeodactylum tricornutum: purification and characterization*". Arias, D.G.; Márquez, V.; Beccaria, A.J.; Guerrero, S.A.; Iglesias, A.A. 17-20 de noviembre. Mar del Plata - Argentina. El resumen del trabajo ha sido publicado en el suplemento BIOCELL, 31, 145.
- 2008 - SAIB XLIV Reunión Anual. Póster: "*Effect of subversive substrates on Entamoeba histolytica thioredoxin reductase activity*". Arias, D.G.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. 8-11 de noviembre. Villa Carlos Paz - Córdoba - Argentina. El resumen del trabajo ha sido publicado en el suplemento BIOCELL, 32, 86.

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.”

Louis Pasteur (1822-1895)

ÍNDICE.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Metabolismo redox y la vida.....	1
1.2. Estrés oxidativo.....	3
1.3. Especies reactivas del oxígeno/nitrógeno.....	4
1.3.1. Superóxido (O ₂ ⁻).....	5
1.3.2. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	5
1.3.3. Radical hidroxilo (OH).....	5
1.3.4. Óxido nítrico (NO·) / peroxinitrito (ONOO·).....	6
1.4. Las especies reactivas como causa de daño oxidativo.....	7
1.4.1. Ácidos nucleicos.....	7
1.4.2. Lípidos.....	7
1.4.3. Proteínas.....	8
1.5. Sistemas antioxidantes.....	9
1.6. Moléculas antioxidantes y cofactores redox.....	10
1.6.1. El sistema glutatión.....	10
1.6.2. El sistema tioredoxina.....	15
1.6.3. El sistema tripanotión.....	19
1.6.4. Peroxirredoxinas.....	23
1.6.5. Catalasa.....	26
1.6.6. Superóxido dismutasa.....	27
1.6.7. Enzimas reparadoras.....	28
1.7. Protistas.....	31
1.7.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	33
1.7.2. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	41
1.7.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
1.7.4. El enclave evolutivo de los protistas.....	57
2. OBJETIVOS.....	58
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1. Materiales y reactivos químicos.....	59
3.2. Cepas de protozoos y procedimiento de cultivo.....	59
3.3. Cepas bacterianas, plásmidos y procedimiento de cultivo.....	60
3.3.1. Cepas bacterianas.....	60
3.3.2. Plásmidos utilizados.....	60

3.3.3. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	61
3.4. Métodos utilizados en biología molecular.....	62
3.4.1. Extracción de material genético.....	62
3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	62
3.4.3. Oligonucleótidos.....	63
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	64
3.4.5. Purificación de ADN del gel de agarosa.....	64
3.4.6. Precipitación de ADN.....	64
3.4.7. Minipreparación de ADN plasmídico.....	64
3.4.8. Digestión enzimática del ADN.....	64
3.4.9. Ligación de los fragmentos de ADN.....	64
3.4.10. Secuenciación del ADN.....	65
3.4.11. Transformación de <i>E. coli</i> por el método de CaCl ₂	65
3.4.12. Mutagénesis sitio dirigida.....	65
3.5. Métodos bioquímicos.....	66
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	66
3.5.2. Preparación de antisueros.....	66
3.5.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección.....	66
3.5.4. Cuantificación de proteínas totales.....	67
3.5.5. Desalado y cambio de medio de solución de proteínas.....	67
3.5.6. Concentración de soluciones de proteínas.....	67
3.5.7. Preparación de S-nitrosotioles.....	67
3.6. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	68
3.6.1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes.....	68
3.6.2. Disrupción celular y preparación de extractos crudos.....	68
3.6.3. Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.....	69
3.6.4. Cromatografía de afinidad por unión a amilosa.....	70
3.6.5. Digestión proteolítica de la proteína de fusión.....	70
3.6.6. Purificación de GR nativa a partir de células de <i>P. tricornutum</i>	70
3.7. Métodos analíticos.....	71
3.7.1. Estimación de la masa molecular de las proteínas en estudio por PAGE nativo.....	71
3.7.2. Ensayos enzimáticos.....	71
3.7.2.1. Determinación de actividad TRX reductasa.....	72
3.7.2.2. Determinación de la capacidad de reducción de DTNB.....	72
3.7.2.3. Determinación de actividad NADPH oxidasa.....	72
3.7.2.4. Determinación de actividad quinona reductasa.....	73
3.7.2.5. Ensayo de reducción de S-nitrosotioles.....	73
3.7.2.6. Ensayo de actividad diaforasa por reducción de compuestos policíclicos.....	73
3.7.2.7. Estudios de inhibición de actividad DTNB reductasa.....	74
3.7.2.8. Ensayo de actividad TRX.....	74
3.7.2.9. Determinación de actividad disulfuro reductasa del sistema TRX.....	75
3.7.2.10. Determinación de actividad TRXPx.....	75
3.7.2.11. Determinación de actividad GPx.....	76
3.7.2.12. Determinación de actividad GR.....	76
3.7.2.13. Determinación de actividad TR.....	76
3.7.2.14. Determinación de actividad cistina reductasa.....	76
3.7.2.15. Determinación de actividad dihidrolipoamida deshidrogenasa.....	77
3.7.2.16. Estudios de inhibición de actividad GR por metales pesados.....	77

3.7.2.17.	Ensayos de reducción de GSNO.	77
3.7.2.18.	Determinación de actividad metionina sulfóxido reductasa.	77
3.7.3.	Determinación de potencial de reducción estándar de <i>Eh</i> TRXR.	78
3.7.4.	Determinación de potenciales de reducción estándar de TRX.	79
3.7.5.	Determinación del potencial de reducción estándar por titulación redox.	80
3.7.6.	Espectroscopia UV-visible.	80
3.7.7.	Estequiometría de la interacción <i>Tc</i> TXNI/ <i>Tc</i> PMSR.	80
3.8.	Microscopía.	80
3.8.1.	Inmunolocalización de las proteínas en estudio en <i>E. histolytica</i> y <i>T. cruzi</i>	81
3.8.2.	Microscopía confocal.	81
3.9.	Sobreexpresión de <i>Tc</i> PMSR en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	81
3.9.1.	Construcción de vectores recombinantes.	81
3.9.2.	Transformación de <i>T. cruzi</i>	82
3.9.3.	Ensayos de sensibilidad al estrés oxidativo.	82
3.10.	Modelado molecular.	83
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	84
4.1.	CAPÍTULO 1: Caracterización del sistema tiorredoxina en <i>Entamoeba histolytica</i>	84
4.1.1.	Aislamiento y caracterización de los genes codificantes para las proteínas componentes del sistema TRX de <i>Entamoeba histolytica</i>	84
4.1.2.	Expresión y purificación de los componentes del sistema TRX de <i>E. histolytica</i>	89
4.1.3.	Caracterización funcional del sistema TRX de <i>Entamoeba histolytica</i>	91
4.1.3.1.	Evaluación de la actividad biológica de las <i>Eh</i> TRX.	91
4.1.3.2.	Características físicas de <i>Eh</i> TRXR.	92
4.1.3.3.	Caracterización de <i>Eh</i> TRXR como disulfuro reductasa.	95
4.1.3.4.	Estudio de la actividad NADPH oxidasa de <i>Eh</i> TRXR.	102
4.1.3.5.	La enzima <i>Eh</i> TRXR recombinante posee actividad TRXR.	106
4.1.3.6.	Capacidad de reducción de sustratos disulfuros por el sistema TRX.	108
4.1.3.7.	Determinación del potencial redox de <i>Eh</i> TRXR.	110
4.1.3.8.	Determinación de potenciales redox de <i>Eh</i> TRX.	112
4.1.4.	Caracterización funcional de <i>Eh</i> 2CysPrx.	113
4.1.4.1.	Propiedades físicas de <i>Eh</i> 2CysPrx.	113
4.1.4.2.	Caracterización básica de cascada de óxido-reducción acoplada a <i>Eh</i> 2CysPrx.	116
4.1.4.3.	Caracterización cinética de <i>Eh</i> 2CysPrx.	119
4.1.4.4.	Titulación redox de <i>Eh</i> 2CysPrx.	122
4.1.5.	Especificidad de sustratos no disulfuros de <i>Eh</i> TRXR.	123
4.1.5.1.	<i>Eh</i> TRXR puede emplear NADH como coenzima reducida.	123
4.1.5.2.	Reducción de <i>S</i> -nitrosotioles por <i>Eh</i> TRXR.	126
4.1.5.3.	<i>Eh</i> TRXR posee actividad quinona reductasa.	128
4.1.5.4.	Estudio de la actividad diaforasa de <i>Eh</i> TRXR.	132
4.1.5.5.	Inhibición de <i>Eh</i> TRXR por aceites esenciales.	136
4.1.6.	Inmunolocalización celular del sistema TRX en <i>E. histolytica</i>	139
4.1.7.	Discusión.	145
4.2.	CAPÍTULO 2: Caracterización del metabolismo redox dependiente de tioles en <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	165

4.2.1. Evaluación de actividades disulfuro reductasa en extractos crudos de <i>P. tricornutum</i> . .	165
4.2.2. Purificación de GR a partir de extractos crudos de <i>P. tricornutum</i>	167
4.2.3. Especificidad de sustrato de la GR de <i>P. tricornutum</i>	169
4.2.4. Estudios cinéticos en estado estacionario de GR de <i>P. tricornutum</i>	170
4.2.5. Estudio de inhibición de GR de <i>P. tricornutum</i> por metales pesados y por productos de reacción.....	173
4.2.6. Propiedades físicas de GR de <i>P. tricornutum</i>	175
4.2.7. Discusión.....	178
4.3 CAPÍTULO 3: Caracterización funcional de MsrA de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	183
4.3.1. Identificación, clonado y expresión de genes codificantes para MsrA de <i>T. cruzi</i>	183
4.3.2. Caracterización básica de <i>TcPMSR10</i> y <i>TcPMSR180</i>	185
4.3.3. Caracterización cinética en estado estacionario de <i>TcPMSR</i>	191
4.3.4. Titulación redox de <i>TcPMSR</i>	197
4.3.5. Determinación de la masa molecular nativa de <i>TcPMSR</i>	198
4.3.6. Estequiometría de la interacción <i>TcPMSR-TcTXNI</i>	201
4.3.7. Determinación de la expresión de <i>TcPMSR</i> en diferentes estadios del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> CL-Brener.	202
4.3.8. Inmunolocalización celular de <i>TcPMSR</i> en <i>T. cruzi</i>	203
4.3.9. Sobreexpresión de <i>TcPMSR10</i> en células de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	205
4.3.10. Discusión.....	208
5. CONCLUSIONES.....	218
6. RESUMEN.	222
7. ABSTRACT.....	225
8. BIBLIOGRAFÍA.....	228

LISTA DE ABREVIATURAS.

μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
μmol	micromol
ADN	ácido desoxirribonucleico
AE	aceite esencial
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
DAB	diaminobencidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirribonucleósido trifosfato
DO	densidad óptica
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EB	eosina B
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
E°	potencial de reducción estándar a pH 7,0
ERN	especies reactivas del nitrógeno
ERO	especies reactivas del oxígeno
FAD	flavina adenina dinucleótido
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMN	flavina mononucleótido
g	gramo
Glc	glucosa
GPx	glutatión peroxidasa
GR	glutatión reductasa
Grx	glutarredoxina

GSH	glutati3n
GSSG	glutati3n oxidado
h	hora
IC ₅₀	concentraci3n inhibitoria al 50%
IDA	Ácido imino-diac3tico
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
k'	constante global de segundo orden
k_{cat}	constante catalítica
kDa	kilodalton
K_i	constante de inhibici3n
K_{ic}	constante de inhibici3n competitiva
K_{iu}	constante de inhibici3n acompetitiva
K_m	constante de Michaelis-Menten
l	litro
LB	medio Luria Bertani
leucoMB	leuco azul de metileno
M	molar
mA	miliampere
MB	azul de metileno
MBP	proteína de uni3n a maltosa
MetSO	metionina sulf3xido
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
NAD ⁺	nicotiamida-adenina dinucleotido
NADH	nicotiamida-adenina dinucleotido reducido
NADP ⁺	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato reducido
nm	nanometro
°C	grado Celsius

p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSR	péptido metionina sulfóxido reductasa
Prx	peroxirredoxina
ROOH	alquilhidroperóxido
rpm	revoluciones por minuto
RSNO	S-nitrosotioles
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
T(SH) ₂	tripanotión reducido
TAE	solución TRIS-acético-EDTA
TB	medio Terrific Broth
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -butil hidroperóxido
TBS	solución TRIS salino
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TR	tripanotión reductasa
TRIS	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
TRX	tiorredoxin
TRXR	tiorredoxin a reductasa
TS ₂	tripanotión oxidado
TXN	triparredoxina
U	unidades internacionales de actividad enzimática
UV	ultravioleta
v/v	volumen en volumen
<i>V_m</i>	velocidad máxima
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactósido

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Metabolismo redox y la vida.

La vida se presentó en nuestro planeta hace más de 3800 millones de años empleando como caja de herramientas, la tabla periódica de elementos y como moneda de energía, las reacciones redox. Así como la oxidación de combustibles fósiles acciona los motores, la oxidación de los compuestos inorgánicos y orgánicos provee energía para accionar funciones celulares. 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 recursos energéticos alternativos, promoviendo la diversificación de caminos bioenergéticos. Entre los organismos más primitivos se encontraban los heterótrofos fermentadores, dependientes de las fuentes de compuestos orgánicos fermentables y los quimiotrofos que subsistían mediante dietas a base de hidrógeno, sulfuro de hidrógeno y metano; empleando dióxido de carbono y, menos comúnmente, sulfato como aceptores de electrones (Banerjee, 2008).

La innovación de la fotosíntesis anoxygenic bacteriana reunió la química redox de los compuestos del azufre (sulfuro de hidrógeno, azufre o tiosulfato), del hidrógeno, o de ácidos orgánicos con la energía solar para generar un “metabolismo potenciado”. Mediante una variedad de diseños de fotorreceptores, se capturaba la energía solar para conducir la transferencia de electrones a través de un circuito que “traducía” la energía lumínica en química, permitiendo esto, además, la fijación del dióxido de carbono. Desafortunadamente, la capacidad fotosintética anóxica, solamente podía extraer un mínimo de la energía útil con los aceptores de electrones y los agentes reductores disponibles. Esta complejidad restringida de los organismos antiguos generó una enorme presión de selección sobre la evolución de opciones alternativas que provean mayores rendimientos bioenergéticos (Forman y col., 2004; Banerjee, 2008).

Entre 3200 y 2400 millones de años atrás, emergió un microorganismo similar a una cianobacteria que podía explotar la energía solar para superar el “costo prohibido” de la oxidación del agua. El resultado químico de esta reacción era la generación de una molécula del oxígeno a partir de dos moléculas de agua otorgando cuatro electrones (Banerjee, 2008). La introducción del oxígeno como residuo metabólico era, sin embargo,

una situación peligrosa. Como oxidante de gran alcance, el oxígeno amenazó las redes metabólicas anaerobias, aero-sensibles, que se habían desarrollado. Sumándose la toxicidad de sus intermediarios parcialmente reducidos (Banerjee, 2008). Éstos se conocen colectivamente como especies reactivas del oxígeno (ERO) y pueden causar daño sobre el ADN, las proteínas, y los lípidos. Así, en este paisaje metabólico que cambiaba, los organismos que se habían desarrollado originalmente bajo condiciones anaerobias hicieron frente a opciones de adaptarse para contrarrestar la biotoxicidad del oxígeno, de retirarse a nichos anaerobios limitados o de sucumbir a la extinción (Forman y col., 2004; Banerjee, 2008).

El desarrollo de la fotosíntesis oxigénica anunció una transformación permanente a una biosfera rica en oxígeno. Dada la saturación de oxígeno en los océanos y el enriquecimiento en la atmósfera, la trayectoria de la evolución cambió por siempre. Este "gran acontecimiento de la oxidación" dio lugar a la formación de la capa de ozono protectora y fijó la escena para la evolución de formas de vida complejas a base de una respiración aerobia altamente exergónica (Banerjee, 2008).

La reducción del oxígeno rinde un cambio de energía libre muy favorable y, por otro lado, éste es estable en condiciones atmosféricas y es una opción excelente para ser el aceptor final de electrones en un metabolismo energético de alto rendimiento. Se cree que en la evolución de organismos complejos se favoreció el cambio al metabolismo aerobio, por ser más eficiente en la extracción de energía a partir de la oxidación de la glucosa que los caminos anaerobios. El oxígeno también aumentó el repertorio de las reacciones bioquímicas, con la aparición de no menos mil reacciones no encontradas en redes metabólicas anaerobias. Esto precipitó un aumento enorme en complejidad metabólica y la aparición de nuevos metabolitos secundarios (esteroles, alcaloides, y ciertos antibióticos) (Forman y col., 2004; Banerjee, 2008). Se cree que los eucariotas, los cuales se desarrollaron alrededor de 1500 millones de años atrás, han adquirido ambas capacidades bioenergéticas por captación de un endosimbionte bacteriano (Banerjee, 2008). El "gran acontecimiento de la oxidación" condujo así a una explosión de la complejidad genómica y metabólica que culmina en el ascenso de los metazoos en el período cambriano (600 millones de años atrás), hasta nuestros días (Banerjee, 2008).

1.2. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un evento multiestresante que involucra numerosas especies oxidantes (Nordberg y col., 2001; Banerjee, 2008). Entre ellas, las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente) juegan un importante rol, dado que son altamente reactivas y formadas por un proceso natural, inevitable y constante. Todas las células independientemente del tipo, están permanentemente en contacto con estas moléculas reactivas, ya sea por influencias externas o como subproductos del propio metabolismo (Winyard y col., 2005). El daño que estas especies reactivas provoquen dependerá del balance entre las ERO y las defensas antioxidantes que disponen las células. El estrés oxidativo ocurre cuando se altera la homeostasis de óxido-reducción intracelular; es decir, se pierde el equilibrio entre la producción de especies reactivas y la producción y/o acción de los antioxidantes (Fig. 1.1) (Winyard y col., 2005). En esta situación de estrés oxidativo se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres al reaccionar químicamente con lípidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y componentes de la matriz extracelular; por lo que puede desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, lleva a la misma muerte celular (Forman y col., 2004; Winyard y col., 2005).

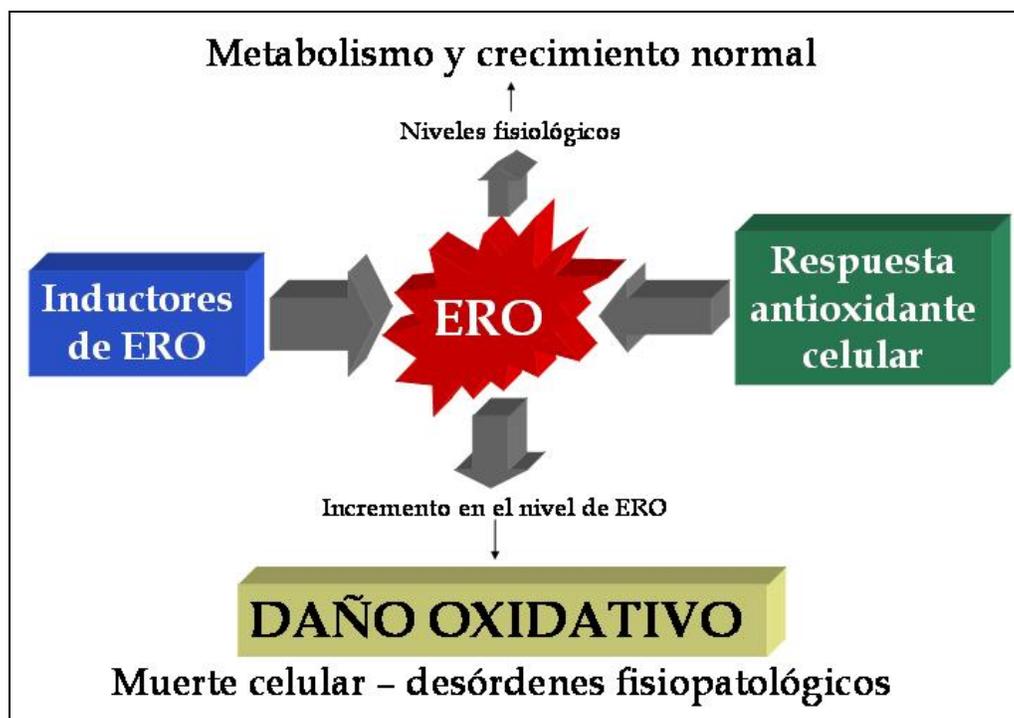


Fig. 1.1: Homeostasis redox y estrés oxidativo. Adaptado de Banerjee y col., 2008.

1.3. Especies reactivas del oxígeno/nitrógeno.

Las ERO/ERN incluyen un número de moléculas reactivas químicamente derivadas de la reducción parcial del oxígeno (Fig. 1.2) o de la reacción entre el óxido nítrico (NO·) y ERO. Algunas de estas moléculas son extremadamente reactivas, tal como el radical hidroxilo, mientras otras lo son en menor grado (superóxido y peróxido de hidrógeno). Los radicales libres intracelulares (moléculas de bajo peso molecular con un electrón desapareado) son incluidos dentro de esta clasificación. Radicales libres y ERO/ERN pueden reaccionar fácilmente con muchas biomoléculas, iniciando una reacción en cadena de formación de radicales. Para detener esta reacción, un radical recientemente formado debe reaccionar con otro radical, eliminando el electrón desapareado, o reaccionando con un antioxidante primario (Nordberg y col., 2001; Kiley y col., 2004).

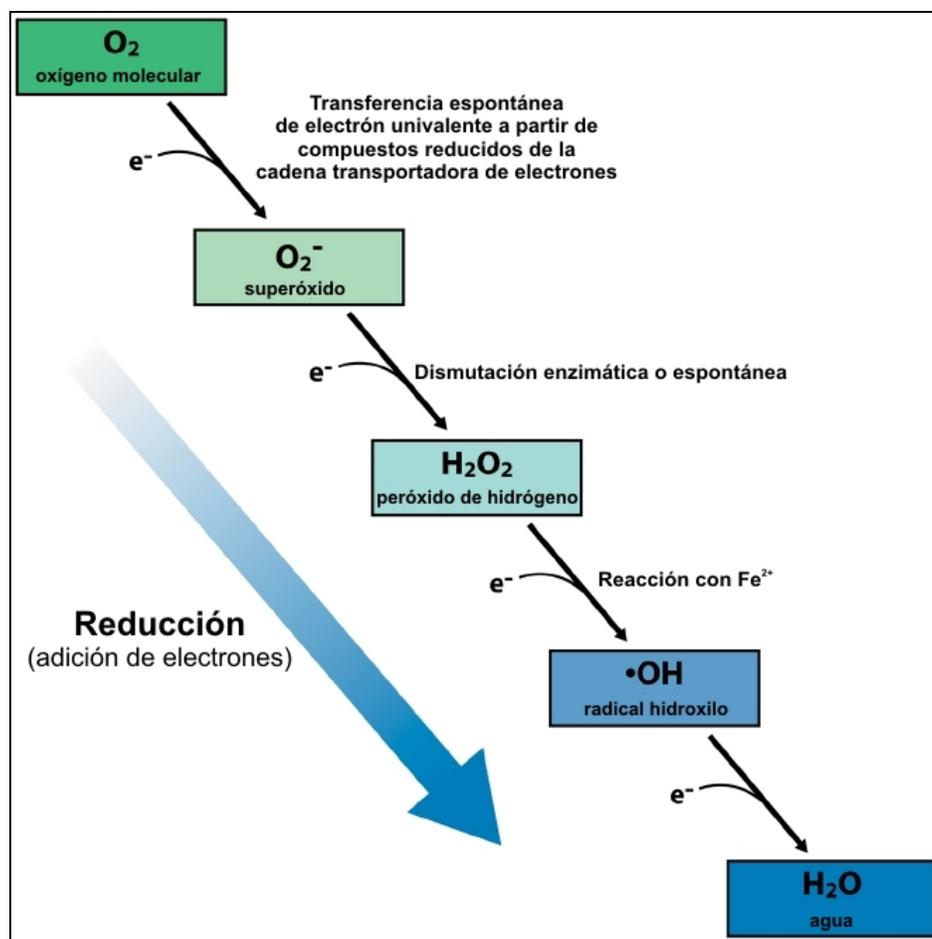
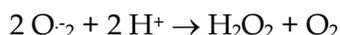


Fig. 1.2: Formación de especies reactivas del oxígeno. Imagen tomada de Hilliwell y col., 2006.

1.3.1. Superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

El anión superóxido es creado a partir de oxígeno molecular por la adición de un electrón. Pese a que es un radical no es altamente reactivo, ni posee la capacidad de penetrar membranas lipídicas y es por ello que queda confinado en el compartimiento donde se produjo. La formación de superóxido es espontánea, especialmente en ambientes aerobios ricos en electrones, como la vecindad de la membrana interna mitocondrial. El radical superóxido, como también el peróxido de hidrógeno, es generado de forma endógena por flavoenzimas. Dos moléculas de superóxido rápidamente dismutan a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, siendo esta reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Nordberg y col., 2001; Forman y col., 2004; Banerjee, 2008), acorde a la siguiente reacción:



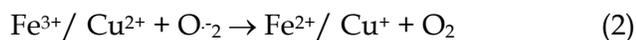
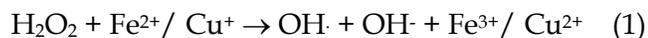
1.3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El peróxido de hidrógeno no es un radical pero es capaz de penetrar membranas biológicas, cumpliendo un rol importante en la formación de radicales. Es un intermediario en la producción de moléculas más reactivas, incluyendo ácido hipocloroso y el radical hidroxilo vía oxidación de metales de transición (Nordberg y col., 2001; Forman y col., 2004; Banerjee, 2008). Otra función importante del H_2O_2 es la relacionada con ser una molécula de señalización intracelular, regulando las actividades de proteínas que componen diferentes vías metabólicas mediante la generación de una oxidación reversible de las moléculas blanco. 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 (Forman y col., 2004; Rhee y col., 2005b; Halliwell, 2006; Banerjee, 2008).

1.3.3. Radical hidroxilo ($OH\cdot$).

Dado su fuerte reactividad con biomoléculas, el $OH\cdot$ es, probablemente, capaz de realizar mas daño a los sistemas biológicos que los otras ERO. El radical es formado a partir del peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} o Cu^+), a veces unidos en complejos con diferentes proteínas u otras moléculas. Esto es

conocido como reacción de Fenton (1). El superóxido también juega una función relevante en conexión con la reacción de Fenton, por reciclado del ión metálico (2) (Banerjee, 2008).



La suma de ambas reacciones es la reacción de Haber-Weiss, donde los metales de transición juegan un rol clave en la formación de radicales hidroxilos (Nordberg y col., 2001; Forman y col., 2004; Banerjee, 2008).

1.3.4. Óxido nítrico (NO·) / peroxinitrito (ONOO·).

El óxido nítrico es un miembro curioso de la familia de los radicales libres, siendo similar al O_2^- ya que no reacciona rápidamente con las biomoléculas a pesar de que posee un electrón desapareado. Por otro lado, reacciona fácilmente con otros radicales libres (por ejemplo, radicales peroxilos y alquilos) generando, principalmente, moléculas menos reactivas y es por ello que funciona como un antioxidante. Sin embargo, si el O_2^- es producido en grandes cantidades en paralelo con el NO·, reaccionan entre ellos para dar ONOO· (peroxinitrito), el cual es altamente citotóxico. El peroxinitrito reacciona rápidamente con las biomoléculas en etapas que involucran uno o dos electrones. Puede reaccionar directamente con el CO_2 para formar una especie más reactiva, nitroso peroxocarboxilato (ONOOOCO_2^-), o la forma protonada, ácido peroxinitroso (ONOOH); así como experimentar homólisis, dando $\text{OH}\cdot$ y $\cdot\text{NO}_2$ o reacomodarse a nitrato (NO_3^-) (Quijano y col., 1997; Patel y col., 1999; Nordberg y col., 2001; Forman y col., 2004).

En concentraciones fisiológicas el NO· funciona principalmente como un mensajero intracelular, por ejemplo estimulando a la guanidil ciclasa y proteínas quinasas. El NO· 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· se torna un factor significativo en el control redox de las funciones celulares. La nitrosilación, condensación del grupo NO· a tioles reactivos de proteínas, actúa, por ejemplo, como regulador de actividades enzimáticas (Quijano y col., 1997; Patel y col., 1999; Forman y col., 2004). La producción excesiva de NO· es contrarestanda por su conjugación con

glutación, dando *s*-nitrosoglutatión (GSNO). El mismo GSNO puede actuar como oxidante/regulador enzimático. Por otro lado éste puede ser reducido enzimáticamente a glutatión y NO· nuevamente (Patel y col., 1999; Nordberg y col., 2001). Los efectos totales del NO· en el escenario redox celular son claramente multifacéticos, pudiendo actuar tanto como antioxidante como oxidante, dependiendo de la condición fisiológica presente en la célula.

1.4. Las especies reactivas como causa de daño oxidativo.

Las ERO/ERN son, dada su alta reactividad, propensas a causar daño celular y, por lo tanto, son potencialmente tóxicas. Los blancos del daño oxidativo incluyen todos los grupos principales de biomoléculas (Denisov y col., 2005; Banerjee, 2008) y sobre cada grupo produce alteraciones particulares, que merecen un análisis detallado.

1.4.1. Ácidos nucleicos.

Las especies reactivas pueden ser mutagénicas, debido a las modificaciones químicas sufridas por el ADN. Un número de alteraciones (por ejemplo, clivaje del ADN, entrecruzamiento entre ADN y proteínas, oxidación de purinas) está dado por la reacción de ERO/ERN, especialmente OH·. Si el sistema de reparación del ADN no es capaz de enmendar rápidamente el daño, una mutación podría resultar por error en el apareamiento de bases durante la replicación. La apoptosis, en algunos casos, es mediada por ERO/ERN, no sólo debido al daño causado sobre el ADN, sino también al incremento en la permeabilidad mitocondrial, la destrucción de citocromos *c*, la inducción del incremento de Ca²⁺ intracelular, entre otros efectos (Nordberg y col., 2001; Denisov y col., 2005; Banerjee, 2008).

1.4.2. Lípidos.

Los ácidos grasos poliinsaturados son, dada su multiplicidad de dobles enlaces, excelentes blancos para el ataque de radicales libres. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse se convierte en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar otras moléculas y presenta mayor carácter hidrofílico. Las alteraciones más comunes son el entrecruzamiento entre cadenas de ácidos grasos o ácidos

grasos-proteínas. Esto conlleva cambios en su estructura y función dentro de la bicapa lipídica de los sistemas membranosos celulares, además de la generación de productos como el hidroxinonenal o el malondialdehído, que poseen propiedades cancerígenas o mutagénicas. Los iones metálicos como el Cu^+ y el Fe^{2+} pueden inducir la peroxidación de lípidos promoviendo estrés oxidativo sobre las membranas (Nordberg y col., 2001; Denisov y col., 2005; Banerjee, 2008).

1.4.3. Proteínas.

Los mecanismos que involucran la oxidación de proteínas son diversos e involucran preferentemente a los radicales O_2^- y $\text{OH}\cdot$. La oxidación del esqueleto carbonado de las proteínas trae aparejada la fragmentación de la cadena polipeptídica mediante la vía de formación de diamida, α -amidación o β -oxidación dependiente de radical hidroxilo (Nordberg y col., 2001; Forman y col., 2004; Halliwell, 2006; Banerjee, 2008). Los derivados carbonilos en las proteínas son generados por diversos mecanismos de oxidación, no obstante, en la mayoría de los casos participan iones metálicos que catalizan la oxidación mediada por H_2O_2 y O_2^- . De todas las modificaciones oxidativas mediadas por ERO, la formación de derivados carbonilos es la más significativa. Los derivados carbonilos son grupos reactivos que pueden reaccionar con grupos funcionales de proteínas (formando entrecruzados) o con otras biomoléculas modificando así sus propiedades biológicas (Nordberg y col., 2001; Banerjee, 2008).

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos de una proteína son susceptibles a oxidación irreversible, a excepción de metionina y cisteína, cuyas oxidaciones pueden ser revertidas enzimáticamente (Nordberg y col., 2001; Ghezzi, 2005; Friguat, 2006; Banerjee, 2008). Se describirán posteriormente dichos mecanismos. La oxidación de las proteínas puede traer la generación de derivados entrecruzados proteína-proteína, inter o intracatenarios. Estos incluyen: oxidación del sulfidrilo de la cisteína para formar derivados disulfuros, la reacción entre dos radicales carbonilos diferentes, la formación de puentes entre diferentes tirosinas mediada por radicales, la reacción del grupo amino de la lisina con derivados carbonilos generados por oxidación catalizada por iones metálicos, entre los más importantes (Nordberg y col., 2001; Banerjee, 2008). 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. La

acumulación de proteínas oxidadas está asociada al envejecimiento celular y a numerosas enfermedades (Nordberg y col., 2001; Friguet, 2006; Banerjee, 2008).

1.5. Sistemas antioxidantes.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Como se mencionó anteriormente, las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones por eliminación de intermedios reactivos, deteniendo las reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes, en general, son agentes reductores tales como tioles o polifenoles (Forman y col., 2004; Denisov y col., 2005; Smirnoff, 2005; Halliwell, 2006).

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 (Forman y col., 2004; Smirnoff, 2005). Estos pueden actuar por:
 - o Desactivación de metales (por ejemplo, transferrina, ferritina, EDTA).
 - o Removiendo hidroperóxidos (por ejemplo, catalasa, glutatión peroxidasa, piruvato).
 - o Inactivando al oxígeno singulete (por ejemplo, β -caroteno, bilirrubina, licopeno).
- Terminadores: los antioxidantes lentifican o detienen la reacción en cadena mediada por radicales libres (Forman y col., 2004; Smirnoff, 2005). Estos pueden ser:
 - o Antioxidantes donadores (por ejemplo, tocoferol, ascorbato, ácido úrico).
 - o Antioxidantes suicidas (óxido nítrico).

Según su naturaleza, los antioxidantes pueden dividirse en (Banerjee, 2008):

- No enzimáticos (por ejemplo, glutatión, ascorbato, tripanotión, tocoferol).
- Enzimáticos (catalasa, glutatión transferasa, peroxirredoxina, tiorredoxina).

1.6. Moléculas antioxidantes y cofactores redox.

1.6.1. El sistema glutatión.

- Glutatión

El glutatión (GSH, reducido, GSSG, oxidado) es un tripéptido constituido por glutamato, cisteína y glicina (γ -glutamilcisteinilglicina) (Fig. 1.3) y es vital para el normal funcionamiento celular. Se lo ha encontrado primariamente en eucariotas, bacterias Gram negativas y en algunos tipos de bacterias Gram positivas. En sistemas eucariotas, aproximadamente el 90% del GSH intracelular se localiza en el citoplasma, y el remanente en organelas tales como mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo. Posee un potencial de reducción estándar (E°) de -240 mV, lo que lo hace un agente reductor moderado (Jocelyn, 1967; Forman y col., 2004; Banerjee, 2008).

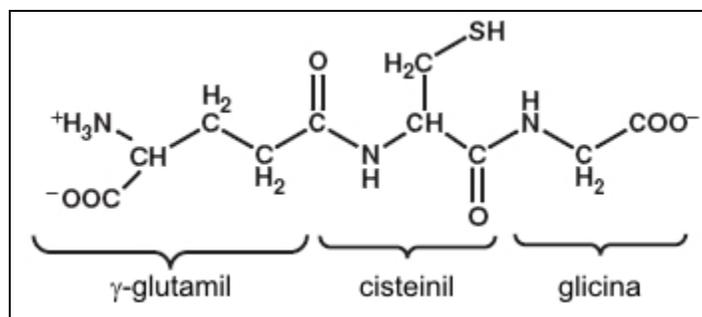


Fig. 1.3: Estructura general del glutatión. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

El GSH es sintetizado a partir de sus aminoácidos constituyentes por la acción sucesiva de dos enzimas dependientes de ATP: la glutamato cisteína ligasa y la glutatión sintetasa. La forma reducida del glutatión es mantenido por la enzima glutatión reductasa, una piridina nucleótido disulfuro reductasa, que transfiere los electrones desde el NADPH al GSSG (Fig. 1.4) (Forman y col., 2004; Banerjee, 2008).

El GSH está involucrado en numerosos procesos biológicos, tales como almacenamiento y transporte de cisteína, mantenimiento de la estructura y función de proteínas, regulación de la actividad de enzimas a través de la reducción de enlaces disulfuros o por glutationalización (disulfuros mixtos entre tioles de proteínas y glutatión), etc. No obstante, su función primaria es el mantenimiento de la homeostasis

redox intracelular mediante la protección contra las ERO y ERN así como xenobióticos nucleofílicos (Forman y col., 2004; Hurd y col., 2005; Gallogly y col., 2007; Banerjee, 2008).

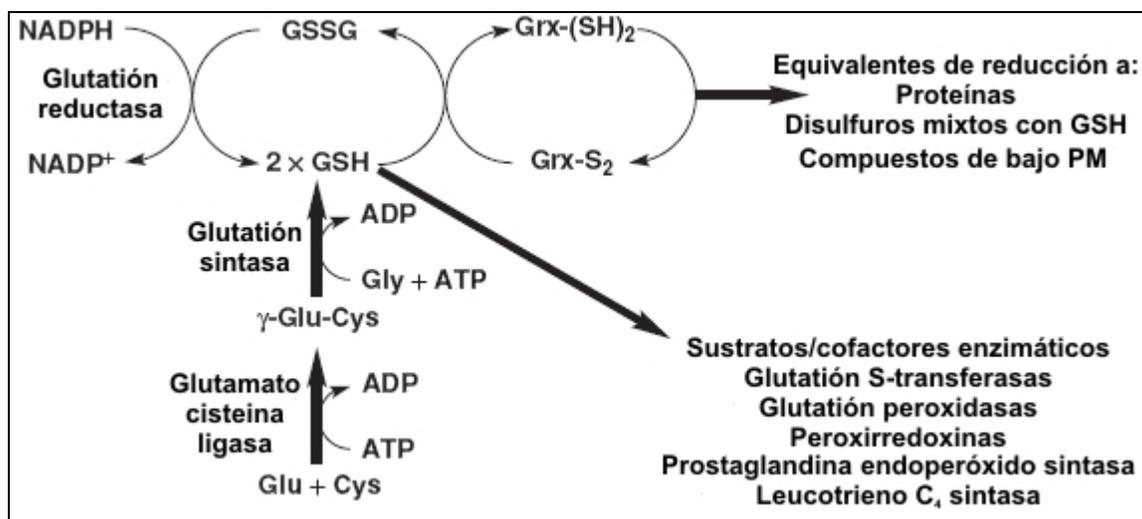
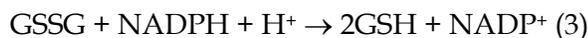


Fig. 1.4: Principales roles del glutatión en la mayoría de los organismos. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

- Glutación reductasa.

La enzima glutación reductasa (GR) es una flavoproteína miembro de la familia de las piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas. Esta reduce el GSSG a GSH a expensas del NADPH, siendo esta reacción rápida e irreversible (3). La enzima posee un papel importante en el mantenimiento de una relación intracelular alta de GSH/GSSG (Carlberg y col., 1985; Dringen y col., 2002; Banerjee, 2008).



Las GR caracterizadas de diferentes organismos muestran una alta afinidad por sustratos y presentan una estructura homodimérica con un sitio activo en ambas subunidades. Distintos análisis estructurales del monómero de la GR evidenciaron la existencia de cuatro dominios bien conservados: un dominio de unión del FAD, uno de unión al NADPH, uno de unión de GSSG y uno de interfase entre subunidades (Carlberg y col., 1985; Dringen y col., 2002; Banerjee, 2008).

El mecanismo de reacción de esta enzima involucra los siguientes pasos: 1) transferencia de dos electrones desde el NADPH al FAD estrechamente unido,

2) transferencia de los equivalentes de reducción al disulfuro formado por dos cisteínas en el sitio activo de la misma subunidad, 3) transferencia de los electrones al GSSG, el cual interacciona directamente con las cisteínas reducidas y 4) la enzima genera dos moléculas de GSH completando el ciclo catalítico. Este mecanismo es esquematizado en la Fig. 1.5 (Pai y col., 1983; Carlberg y col., 1985; Banerjee, 2008).

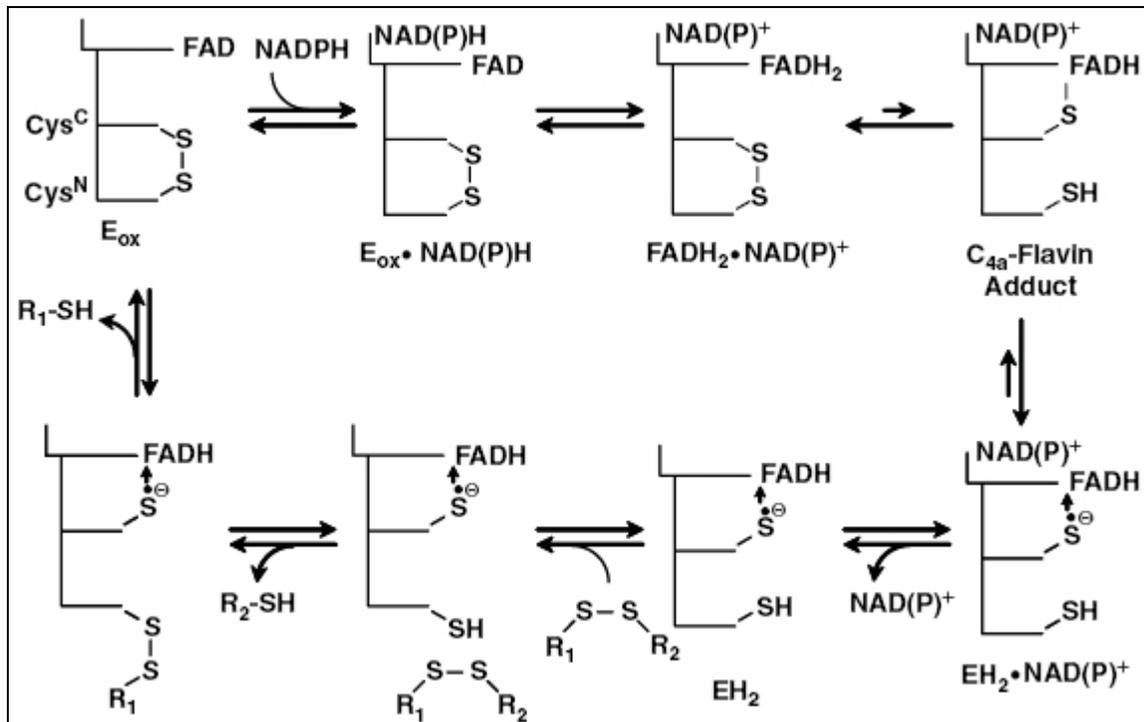
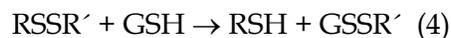


Fig. 1.5: Mecanismo catalítico general de GR. $R_1-S-S-R_2$ equivale a GSSG. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

- Glutarredoxina.

La glutarredoxina (Grx) o tioltransferasa, es miembro de la familia tiol-disulfuro oxidoreductasa y un importante componente del sistema glutatión. Es una proteína pequeña, termoestable de 10-24 kDa. La Grx cataliza la reducción de disulfuros en proteínas o la reducción de proteínas S-S-glutatión (PSSG) y poseen un único motivo CPYC en su sitio activo. La reacción procede como en 4 y 5 (Holmgren, 1985; Holmgren y col., 2005; Banerjee, 2008).



La reducción de PSSG es llevado a cabo por Grx, la cual es regenerada a expensas de GSH, siendo el camino de transferencia de electrones: $\text{NADPH} \rightarrow \text{GR} \rightarrow \text{GSH} \rightarrow \text{Grx}$. Se ha evidenciado que las Grx pueden reducir disulfuros de proteínas vía mecanismos ditiol (Fig. 1.6) o GSH S-conjugados con proteínas (PSSG) o disulfuros de bajo peso molecular (GSSR) mediante un mecanismo monotiolo (Fig. 1.7) como ditiol (Holmgren, 1985; Ghezzi, 2005; Holmgren y col., 2005; Gallogly y col., 2007).

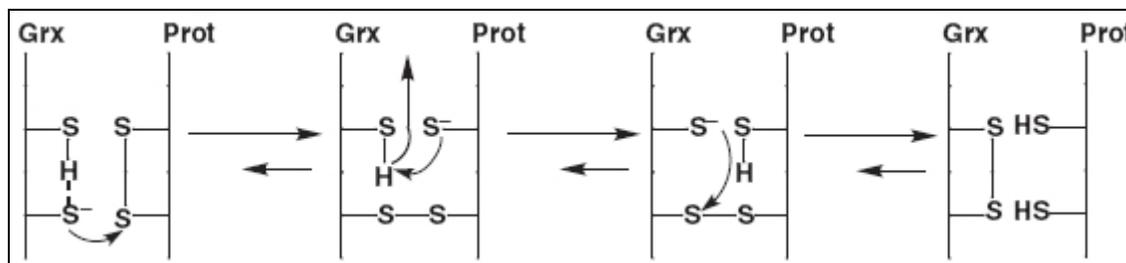


Fig. 1.6: Mecanismo de reducción de disulfuros de proteínas dependiente de Grx. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

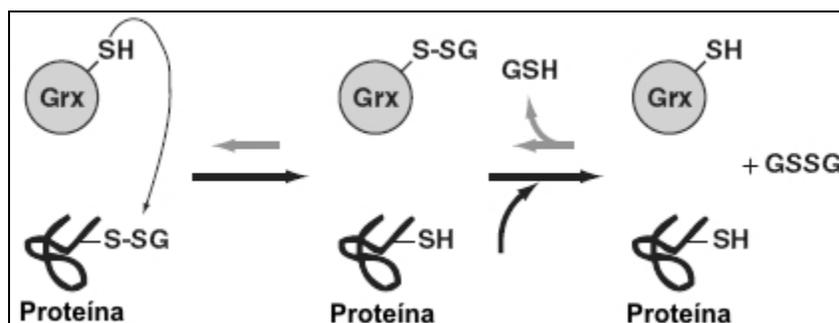


Fig. 1.7: Mecanismo de reacción de Grx monotiólica para la reducción de aductos proteína-GSH. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

Las Grx poseen varias funciones biológicas como actuar de transportadoras de electrones en la síntesis de desoxirribonucleótidos dependiente de GSH por la enzima ribonucleótido reductasa y en la reducción de sulfato/sulfito por la enzima sulfato reductasa. Además, las Grx reparan proteínas dañadas por oxidación mediante la reducción de disulfuros o proteínas glutationiladas. Este único sustrato glutationilado es el requisito que permite a las Grx regular actividades de muchas enzimas/vías metabólicas. Es por ello que la actividad de las Grx sobre proteínas S-glutationiladas es involucrada en la señalización celular, por ejemplo en la activación de fosfatasas (Starke y col., 2003;

Ghezzi, 2005; Holmgren y col., 2005; Hurd y col., 2005; Gallogly y col., 2007; Banerjee, 2008).

- Glutación transferasas.

Las glutatión transferasas catalizan el ataque nucleofílico de GSH sobre un sustrato electrofílico. Formalmente, estas enzimas son llamadas glutatión S-transferasas (GST). Por ejemplo, una reacción catalizada por la mayoría de las GST es la sustitución de un cloro en el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno con GSH para formar un conjugado-GSH (un compuesto que posee GSH unido covalentemente). Las GST atacan numerosos sustratos electrofílicos, algunos de los cuales son mostrados en la Fig. 1.8 (Pabst y col., 1974; Jakobson y col., 1977; Banerjee, 2008).

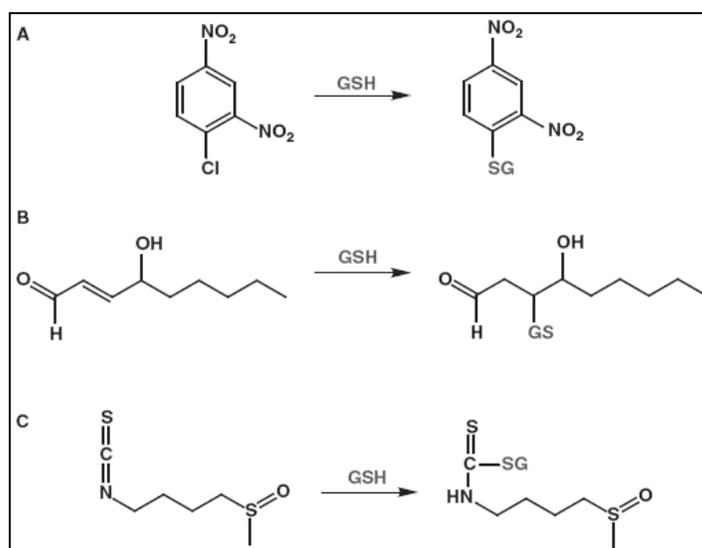


Fig. 1.8: Formación de conjugados entre GSH y A) 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, o B) 4-hidroxinonanal o C) sulforafano. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

Las GST son bien conocidas por su rol en la detoxificación de carcinógenos ambientales. Sin embargo, también catalizan reacciones específicas en numerosos caminos biosintéticos y catabólicos y juegan un papel importante contra el estrés oxidativo por reducción de peróxidos y de dehidroascorbato. Algunas GST modulan vías de señalización celular por catalizar el ataque del GSH sobre moléculas de señalización, tales como hormonas esteroideas y prostaglandinas. El rol fisiológico de algunas GST,

particularmente en bacterias y plantas, no ha sido suficientemente esclarecido al presente (Pabst y col., 1974; Jakobson y col., 1977; Banerjee, 2008).

1.6.2. El sistema tiorredoxina.

- Tiorredoxina.

La tiorredoxina (TRX) es una proteína pequeña, aproximadamente 12 kDa, con dos cisteínas reactivas en su centro activo dentro del motivo conservado CGPC. Esta proteína puede existir tanto en la forma reducida de ditiol [TRX-(SH)₂] como en la forma oxidada de disulfuro (TRX-S₂). Su función principal es la de actuar como un poderoso agente reductor, lo que se basa en la rápida reacción entre la TRX y sus sustratos disulfuros y a su bajo potencial de reducción ($E^{\circ} = -270/-320$ mV). Esto genera TRX-S₂, la cual es reducida por el NADPH mediante la acción de una flavoenzima, la tiorredoxina reductasa (TRXR), como se muestra en las reacciones 6 y 7, respectivamente (Krause y col., 1991; Holmgren y col., 2005; Banerjee, 2008).



El sistema tiorredoxina, compuesto de NADPH, TRXR y TRX, está presente prácticamente en todos los organismos vivos, desde los unicelulares procariontes como *Archaeobacteria*, hasta organismos eucariotes multicelulares como los humanos. El sistema tiorredoxina es responsable del mantenimiento de un ambiente reductor en el citoplasma de las células, una función similar a la realizada por el sistema glutatión. Otras funciones importantes de la TRX es la regeneración de las formas reducidas de metionina sulfóxido reductasa y peroxirredoxinas y la regulación redox de enzimas y factores de transcripción mediante el control del estatus redox de los tioles (Arner y col., 2000; Motohashi y col., 2001; Nordberg y col., 2001; Balmer y col., 2003; Forman y col., 2004; Hisabori y col., 2005).

La estructura tridimensional, tanto de la forma oxidada como reducida, de la TRX de varias especies ha sido resuelta por cristalografía de rayos X y por resonancia magnética nuclear. El dominio TRX, el cual es una estructura globular $\alpha\beta$ en sándwich, fue observado por primera vez en la TRX-S₂ de *Escherichia coli* en 1975 y, subsecuentemente, en un gran

número de proteínas. La Fig. 1.9 muestra la estructura de la forma reducida de la TRX1 humana, donde puede distinguirse un núcleo central de láminas- β que es rodeado por tres α -hélices. Las cisteínas del sitio activo son localizadas sobre una protrusión de la molécula y en el comienzo de una α -hélice. En la TRX-(SH)₂, el átomo de azufre de la cisteína N-terminal es expuesto al solvente haciendo al grupo tiolato es un nucleófilo efectivo con un bajo pKa. Una *cis*-prolina es conservada en todas las TRX y es adyacente al sitio activo, el cual es rodeado por una superficie plana hidrofóbica, requerida para la interacción con otras proteínas (Fig. 1.10). El dominio TRX se ha encontrado presente en varias proteínas redox activas como ser la proteína disulfuro isomerasa, glutarredoxina, glutatión peroxidasa alquil hidropéroxido reductasa C y glutatión S-transferasa (Katti y col., 1990; Holmgren, 1995; Apt y col., 1996; Chivers y col., 1997; Hall y col., 2006).

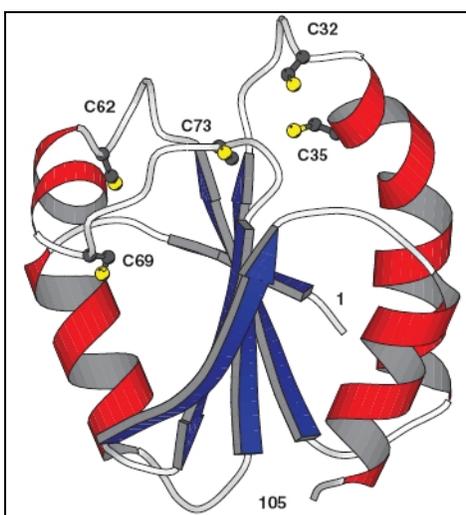


Fig. 1.9: Estructura de TRX1 humana en forma reducida. Las cisteínas del sitio activo (Cys³² y Cys³⁵) son mostradas así también las cisteínas estructurales Cys⁶², Cys⁶⁹ y Cys⁷³. La Met N-terminal es el residuo 1 y el C terminal es el residuo 105. Archivo PDB 1ERT. Tomado de Banerjee y col., 2008

La TRX-(SH)₂ reduce directamente disulfuros de proteínas vía reacciones rápidas de intercambio de disulfuro, esquematizada en la Fig. 1.10. La TRX-(SH)₂ inicialmente interacciona con su proteína blanco mediante interacciones hidrofóbicas superficiales y por formación de puentes de hidrógeno. Esto es seguido por el ataque nucleofílico del tiolato N-terminal del sitio activo sobre el disulfuro blanco, resultando en un intermediario disulfuro proteína-proteína mixto transiente. El ataque intramolecular del tiolato

C-terminal resulta en la ruptura del disulfuro, la formación de TRX-S₂ y la generación de la proteína blanco reducida (Holmgren, 1995; Holmgren y col., 2005).

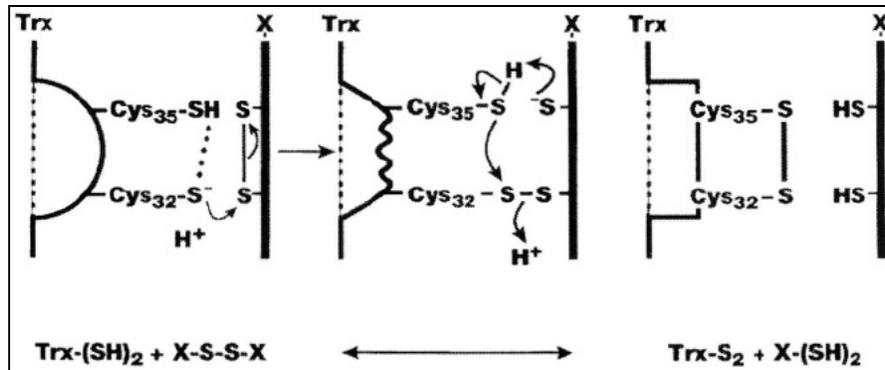


Fig. 1.10: Mecanismo propuesto para la reducción de disulfuros en proteínas catalizada por TRX. La numeración corresponde a la TRX de *E. coli*. Imagen tomada de Forman y col., 2004.

- Tiorredoxina reductasa

La tiorredoxina reductasa (TRXR) es un enzima que contiene FAD, la cual cataliza la reducción de TRX-S₂ para generar la forma reducida a expensas del NADPH (reacción 9) (Banerjee, 2008). La TRXR se encuentra en casi todos los organismos vivientes formando parte del sistema tiorredoxina. El sistema tiorredoxina juega un rol central en la respuesta al estrés oxidativo en Archaea, Bacteria y Eukarya. El reconocimiento de que el sistema tiorredoxina posee roles importantes en el metabolismo celular ha estimulado el gran interés en la relación estructura-función de estas enzimas (Mustacich y col., 2000; Hirt y col., 2002).

Dos tipos de TRXR han sido caracterizadas. Ambos tipos son miembros de la familia de flavoproteínas: piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasas y ambos funcionan como homodímeros. Cada monómero posee una molécula de FAD como grupo prostético, un sitio de unión de NADPH y un sitio activo conformado por un disulfuro redox activo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos y mecanismo catalítico de los dos tipos de TRXR son diferentes. Un tipo, el de las TRXR de alto peso molecular (~55 kDa, designada H-TRXR), ha sido caracterizado en animales incluyendo mamíferos, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* y en protozoos parásitos como *Plasmodium falciparum*. El otro tipo, que incluye a las TRXR de bajo peso molecular (~35 kDa, designado L-TRXR), ha sido encontrado en Archea, Bacteria, Eukarya, incluyendo hongos

filamentosos, levaduras, plantas y protozoos parásitos como *Trichomona vaginalis* y *Giardia duodenalis*. Las H-TRXR están relacionadas a otras enzimas como GR, tripanotión reductasa (TR), mercúrico reductasa (MerR) y lipoamida deshidrogenasa (LipD); mientras que las L-TRXR se encuentran relacionadas a la alquil hidroperóxido reductasa F (AhpF). Existe solo, aproximadamente, 20% de identidad de secuencia entre las L-TRXR y las H-TRXR, en las regiones donde pueden ser alineadas (Holmgren, 1977; Jacquot y col., 1994; Williams y col., 2000; Hirt y col., 2002; Rahlfs y col., 2002).

En las L-TRXR los electrones son transferidos desde el NADPH hacia el FAD y luego al disulfuro redox activo (generalmente el motivo CATC, ubicado en el dominio de unión a NADPH). La reducción del sitio activo origina la rotación del dominio en donde se ubica, exponiendo el sitio activo hacia la superficie para poder interactuar con sus sustratos (Fig. 1.11) (Dai y col., 1996; Lennon y col., 1999; Williams y col., 2000; Akif y col., 2005).

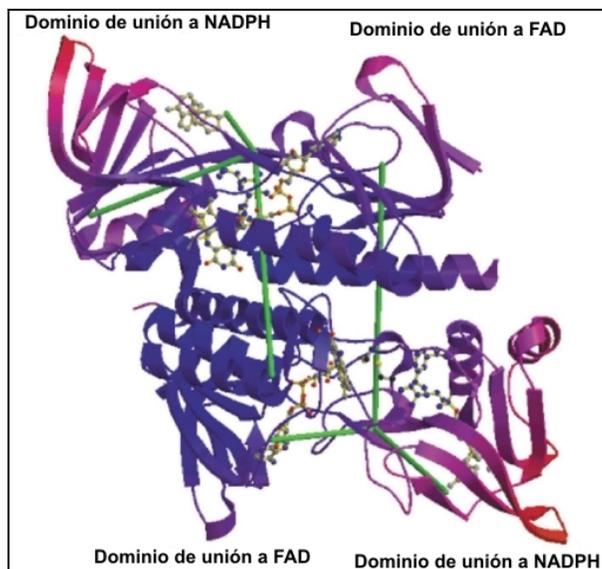


Fig. 1.11: Estructura de L-TRXR, correspondiente a la enzima de *Mycobacterium tuberculosis*. Imagen adaptada de Banerjee y col., 2008.

Una característica importante de las H-TRXR es que las enzimas de mamíferos son selenoproteínas, en donde un residuo de cisteína del sitio activo es reemplazado por uno de selenocisteína. A diferencia del mecanismo de las L-TRXR, en donde existe una rotación de un dominio para poder acceder a los sustratos, el seguido por las H-TRXR (esquematisado en la Fig. 1.12) involucra la transferencia de electrones desde el NADPH al

disulfuro redox activo N-terminal, vía FAD. Luego, los electrones se transfieren hacia un sitio activo localizado en el C-terminal de la subunidad opuesta (donde un Sec-Cys, un puente selenilsulfuro es reducido a selenotiol, en la enzima de mamíferos). Este sitio activo C-terminal es donde la TRX y otros sustratos son reducidos. Cabe aclarar que la selenocisteína en la enzima de mamíferos le confiere un gran espectro de sustratos y que su reemplazo por cisteína da una enzima con 100 veces menos actividad. Esta diferencia se debe principalmente a la diferencia de reactividad entre selenotiol y el tiol, dado por ejemplo, al bajo pKa de selenotiol (Zhong y col., 2000; Nordberg y col., 2001; Sandalova y col., 2001).

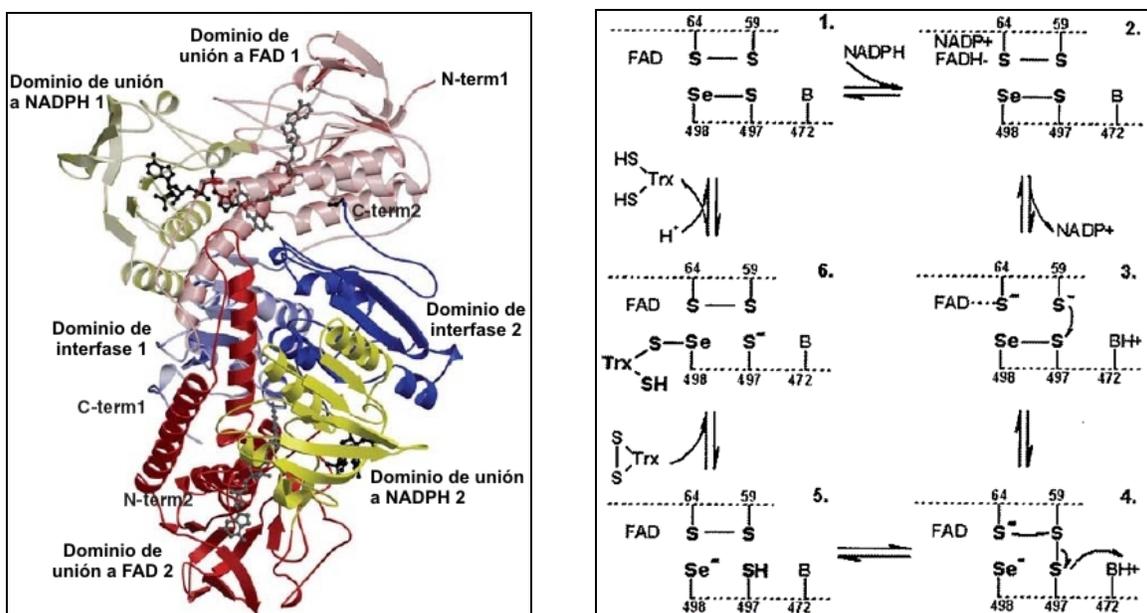


Fig. 1.12: Estructura y mecanismo de reacción postulado de TRXR de mamífero. La numeración corresponde a la enzima de rata. Imagen tomada de Sandalova y col., 2001.

1.6.3. El sistema tripanotión.

- Tripanotión.

El tripanotión [N^1, N^8 -bis-(glutacionil)espermidina; T(SH)₂] (Fig. 1.13) fue inicialmente aislado en 1985 por Fairlamb. Es una molécula formada por la conjugación de dos moléculas de glutatión con una molécula de espermidina. Es un tiol de bajo peso molecular encontrado exclusivamente en protozoos parásitos pertenecientes al orden

Kinetoplastida, tales como *Crithidia*, *Leishmania* y *Trypanosoma* (Fairlamb y col., 1992; Krauth-Siegel y col., 2003b).

El tripanotión, de forma similar al GSH, actúa como cofactor redox en numerosos procesos biológicos en estos organismos, existiendo una bioquímica redox especializada en su uso. El tripanotión es mejor reductor que el GSH a pesar de que poseen potenciales redox similares [-240 mV para GSH y -242 mV para T(SH)₂], esto es debido a que el tripanotión es un ditiol y la formación de un disulfuro intramolecular es cinéticamente más favorable en comparación con el disulfuro intermolecular formado durante la oxidación del GSH. Además, la carga positiva del grupo amino de la espermidina confiere al T(SH)₂ un pKa de 7,4 que coincide con el pH fisiológico, confiriendo a esta molécula mayor reactividad en las reacciones de intercambio tiol-disulfuro. La forma oxidada del tripanotión, el tripanotión disulfuro (TS₂), el cual, similarmente al GSSG, es específicamente reducido por un miembro de la familia piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa denominada tripanotión reductasa (TR) (Fairlamb y col., 1992; Flohe y col., 1999; Krauth-Siegel y col., 2003b).

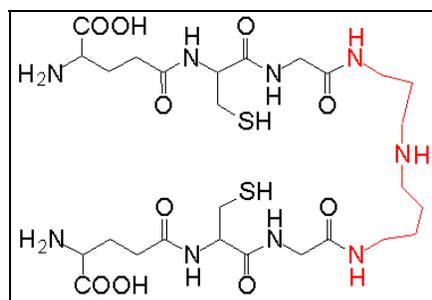


Fig. 1.13: Estructura del tripanotión. La fracción GSH se muestra en negro y la espermidina en rojo. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

La síntesis de tripanotión puede subdividirse en tres partes: 1) el GSH y la espermidina son generados mediante vías metabólicas conservadas en todos los organismos; 2) la conjugación dependiente de ATP de una molécula de GSH con una de espermidina para formar *N*¹ o *N*⁸ glutationilespermidina (GSP) por la enzima glutationilespermidina sintasa (GSPS) y 3) una nueva conjugación dependiente de ATP de una molécula de GSH con GSP para formar T(SH)₂ mediante la acción de la enzima tripanotión sintetasa (TS). Las dos enzimas se han aislado inicialmente a partir de *Crithidia fasciculata*. No obstante, se ha encontrado que en *Leishmania* y *Trypanosoma* la síntesis de tripanotión está catalizada por

una sola entidad enzimática que posee ambas actividades, GSPS y TS (Henderson y col., 1990; Flohe y col., 1999; Oza y col., 2002; Krauth-Siegel y col., 2003b; Oza y col., 2003; Comini y col., 2005; Oza y col., 2006).

El $T(SH)_2$ está involucrado en varios procesos biológicos, esquematizados en la Fig. 1.14, tales como reducción de dehidroascorbato; regulación de la actividad de enzimas a través de la reducción de enlaces disulfuro; detoxificación de metales pesados, xenobióticos y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; confiere los equivalentes de reducción necesarios en la síntesis de desoxirribonucleótidos; es sustrato reductor específico de triparredoxina y tiorredoxina en estos organismos; participa en la reducción de disulfuros de bajo peso molecular (tales como GSSG); etc. Todas estas funciones hacen al $T(SH)_2$ un metabolito clave en el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular importante para la supervivencia de los parásitos y dado que este tiol está ausente en mamíferos, las enzimas que participan en su biosíntesis son consideradas un excelente blanco molecular para la generación de nuevas drogas para el tratamiento de las enfermedades producidas por estos organismos (Moutiez y col., 1995; Repetto y col., 1996; Lopez y col., 2000; Dormeyer y col., 2001; Steenkamp, 2002; Schmidt y col., 2003; Thomson y col., 2003; Comini y col., 2004; Ariyanayagam y col., 2005; Greig y col., 2006; Piattoni y col., 2006).

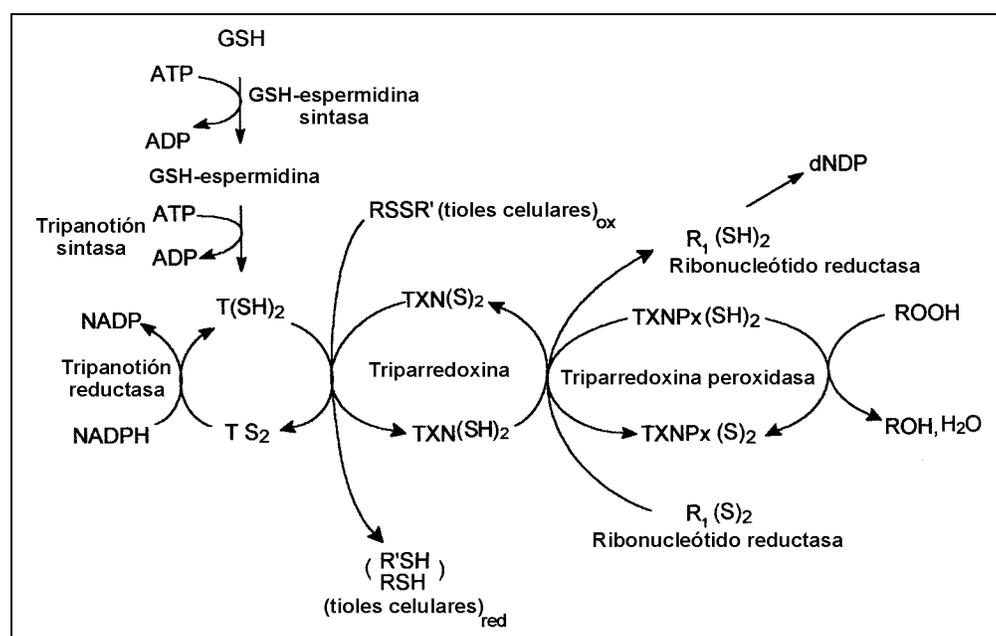
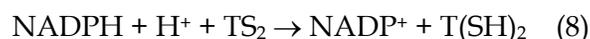


Fig. 1.14: Representación esquemática del rol del tripanotión en tripanosomátidos. Imagen tomada de Steenkamp, 2002.

- Tripanotión reductasa.

La tripanotión reductasa (TR) es una flavoproteína homóloga a GR y TRXR. Esta enzima reduce el TS₂ a T(SH)₂ a expensas del NADPH (reacción 8), con lo cual posee un rol importante en el mantenimiento de una alta relación intracelular T(SH)₂/TS₂. Es prácticamente exclusiva de los géneros *Crithidia*, *Trypanosoma* y *Leshmania*, pero se ha detectado actividad TR en extractos proteicos de protozoos no pertenecientes al orden Kinetoplastida como *Euglena gracilis* y *Entamoeba histolytica* (Krauth-Siegel y col., 1987; Jockers-Scherubl y col., 1989; Sullivan y col., 1991; Montrichard y col., 1999; Tamayo y col., 2005).



Las TR se caracterizan por presentar una estructura homodimérica con una molécula de FAD y un sitio activo (un disulfuro reactivo) en ambas subunidades. El mecanismo de reacción de las TR es similar a las GR (Fig. 1.7). Una marcada diferencia entre la TR y la GR es el sitio de unión a sustrato oxidado, mientras que en la GR el sitio es hidrofílico y cargado positivamente, en la TR es hidrofóbico y cargado negativamente, esto marca una gran especificidad de sustratos en estas enzimas que emplean sustratos “similares” (el-Waer y col., 1993; Lantwin y col., 1994; Zhang y col., 1996; Marsh y col., 1997). Se ha demostrado que la TR es esencial para la virulencia y supervivencia de los parásitos; con lo cual está considerada, junto a las enzimas de la biosíntesis de tripanotión, como un blanco molecular para la generación de nuevos medicamentos (Henderson y col., 1988; Bonnet y col., 1997; Tovar y col., 1998; Blumenstiel y col., 1999; Bond y col., 1999; Bonse y col., 1999; Chitkul y col., 2000; Krieger y col., 2000; Rivarola y col., 2002; Krauth-Siegel y col., 2003a; Parveen y col., 2005; Hamilton y col., 2006; Czechowicz y col., 2007).

- Triparredoxina.

Las triparredoxinas (TXN) son proteínas redox que fueron descubiertas por primera vez en *C. fasciculata* (CfTXN1, CfTXN2). También se aislaron a partir de *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leshmania infantum*. Pertenecen a la superfamilia TRX, y difieren de las TRX típicas por poseer un sitio activo WCPPC. Además, filogenéticamente están más emparentadas a las nucleorredoxinas (Nrx) vegetales y de nematodos. Por otro lado, poseen un potencial de

reducción mayor que las TRX ($E^{\circ\prime} = -249$ mV), haciéndolas reductores menos eficientes, la cual esta compensada por la gran abundancia relativa que presentan en estos parásitos (Gommel y col., 1997; Ludemann y col., 1998; Montemartini y col., 1998; Guerrero y col., 2000; Steinert y col., 2000; Flohe y col., 2002; Reckenfelderbaumer y col., 2002). Funcionalmente, las TXN transfieren equivalentes de reducción desde el tripanotión a una peroxirredoxina de 2-Cys (TXNPx). Además, son mediadores en otras reacciones redox, como por ejemplo, son sustratos de la ribonucleótido reductasa y actúan en la reducción de disulfuros de enzimas regulando su actividad (Dormeyer y col., 2001; Flohe y col., 2002; Greig y col., 2006). Las TXN son específicamente reducida por T(SH)₂. El GSH es un sustrato pobre para estas enzimas. A diferencia de las TRX, las TXN no son eficientemente reducida por TRXR, o por otros miembros de la familia de las disulfuro reductasas, tales como TR o GR (Nogoceke y col., 1997; Flohe y col., 2002).

1.6.4. Peroxirredoxinas.

Las peroxirredoxinas (Prx) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en prácticamente todos los organismos vivientes que catalizan la reducción de H₂O₂, hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y ONOO⁻. Existen evidencias de que las Prx son involucradas no sólo en la detoxificación de peróxidos, sino también en vías de proliferación, diferenciación y apoptosis celular, participando como reguladoras de las ERO/ERN que operan como moléculas señalizadoras (Wood y col., 2003a; Wood y col., 2003b; Rhee y col., 2005a; Flohé y col., 2007; Passardi y col., 2007).

Mecanicamente, todas las Prx catalizan el mismo primer paso en la reducción de peróxidos, la generación del alcohol (o agua) a partir del peróxido y la concomitante oxidación del tiol de la cisteína peroxidática (R-S_PH) a ácido sulfénico (R-S_POH). El subsiguiente reciclado de esta cisteína oxidada a su forma reducida es en lo que se diferencian tres tipos de mecanismos generales. La mayoría de las Prx poseen una segunda cisteína reactiva, la cisteína resolutive (R-S_RH), la cual forma un disulfuro intra/intersubunidad con el ácido sulfénico de la cisteína peroxidática (para generar R-S_P-S_R-R) previo a la completa reducción. En las "2CysPrx típicas" la cisteína peroxidática y la cisteína resolutive se encuentran en subunidades diferentes, con lo cual este tipo de proteína son homodímeros obligados en la generación de una molécula reactiva. Por el contrario, en las "2CysPrx atípicas" tanto la cisteína peroxidática y la cisteína resolutive se

encuentran en la misma subunidad, generando un enlace disulfuro intracatenario y por lo general estas proteínas se encuentran como monómeros activos. Existe un número modesto de Prx que actúan como “1CysPrx” evitando la necesidad de la formación de un enlace disulfuro previa a la completa reducción. Los mecanismos para el reciclo de las 2CysPrx generalmente involucran TRX u otra proteína que contiene el/los módulo/s redox CXXC similar a TRX, como por ejemplo TXN, Grx, AhpD, etc. y una flavoproteína piridina nucleótido disulfuro reductasa, que regenere a la anterior. El mecanismo preciso de regeneración de las 1CysPrx no se encuentra completamente claro, pero podría involucrar a moléculas reductoras de bajo peso molecular, tales como el ascorbato o GSH y en algunos casos catalizado por la GST (Fig. 1.15) (Kang y col., 1998; Hofmann y col., 2002; Wood y col., 2003b; Manevich y col., 2004; Flohé y col., 2007; Monteiro y col., 2007; Passardi y col., 2007).

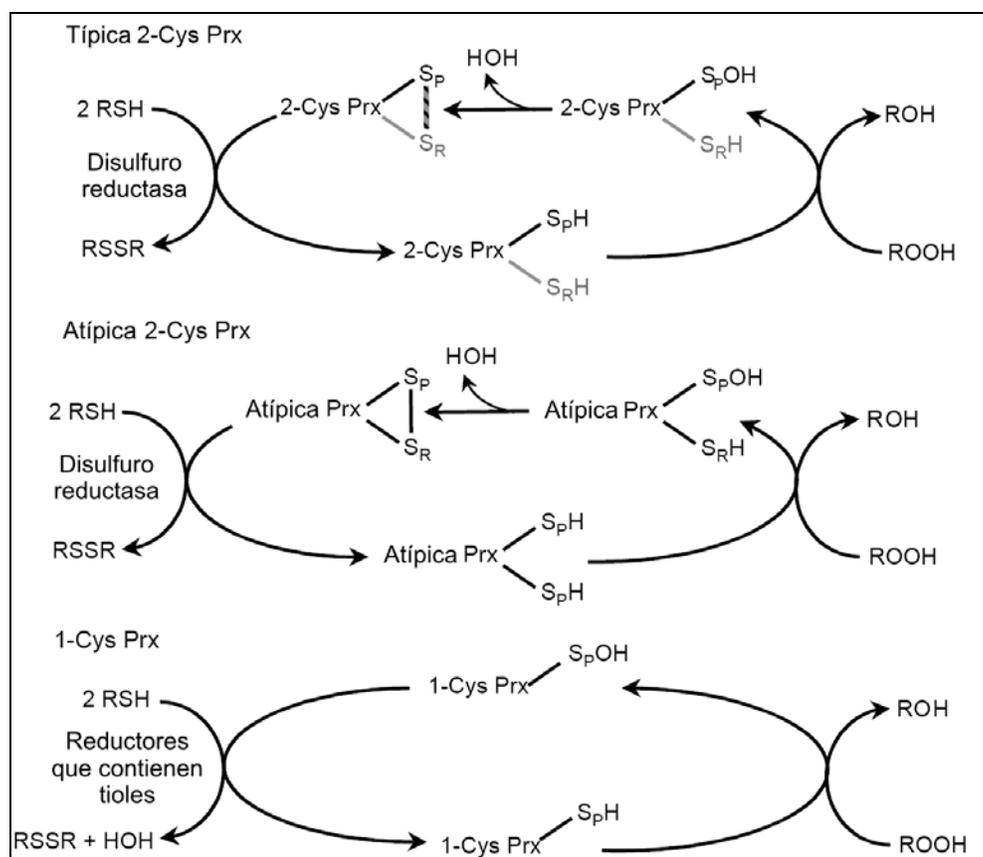


Fig. 1.15: Los tres mecanismos generales de las Prx. Imagen tomada de Wood y col., 2003.

Las 2CysPrx y las 1CysPrx pueden existir como dímeros o decámeros en solución y en estructuras cristalinas. Las propiedades oligoméricas de las Prx se ven influidas por factores como la fuerza iónica, pH, la presencia de Mg^{2+} o Ca^{2+} , y/o el estado redox. El estado de oligomerización en sí mismo puede actuar como un mecanismo de regulación de la propia actividad de la Prx (Fig. 1.16) (Chauhan y col., 2001; Wood y col., 2002; Wood y col., 2003b; Flohé y col., 2007).

Se ha demostrado que la actividad de las Prx puede ser regulada por fosforilación, por ejemplo mediada por quinasas dependientes de ciclina, por proteólisis, por glutationalización, pero principalmente por la hiperoxidación de la cisteína peroxidática durante el primer paso de reducción de peróxidos. Esta hiperoxidación, comúnmente en Prx eucariotas, da como resultado la generación de ácido sulfínico ($R-S_P O_2H$) el cual no puede ser resuelto por la cisteína reductiva (en el caso de las 2CysPrx) o reducible por tioles de bajo peso molecular o por proteínas que contienen el clásico motivo redox CXXC, por el contrario se han identificado unas proteínas llamadas sulfirredoxinas (Srx) las cuales catalizan la reducción dependiente de ATP del $R-S_P O_2H$, volviéndolo a $R-S_P OH$, siguiendo con el ciclo catalítico normal de las Prx. Es por ello que, la formación del ácido sulfénico durante la catálisis normal de las Prx actúa como un interruptor sensible a peróxido, regulando de forma reversible la susceptibilidad de las Prx como función de la concentración de peróxidos (Wood y col., 2003b; Flohé y col., 2007).

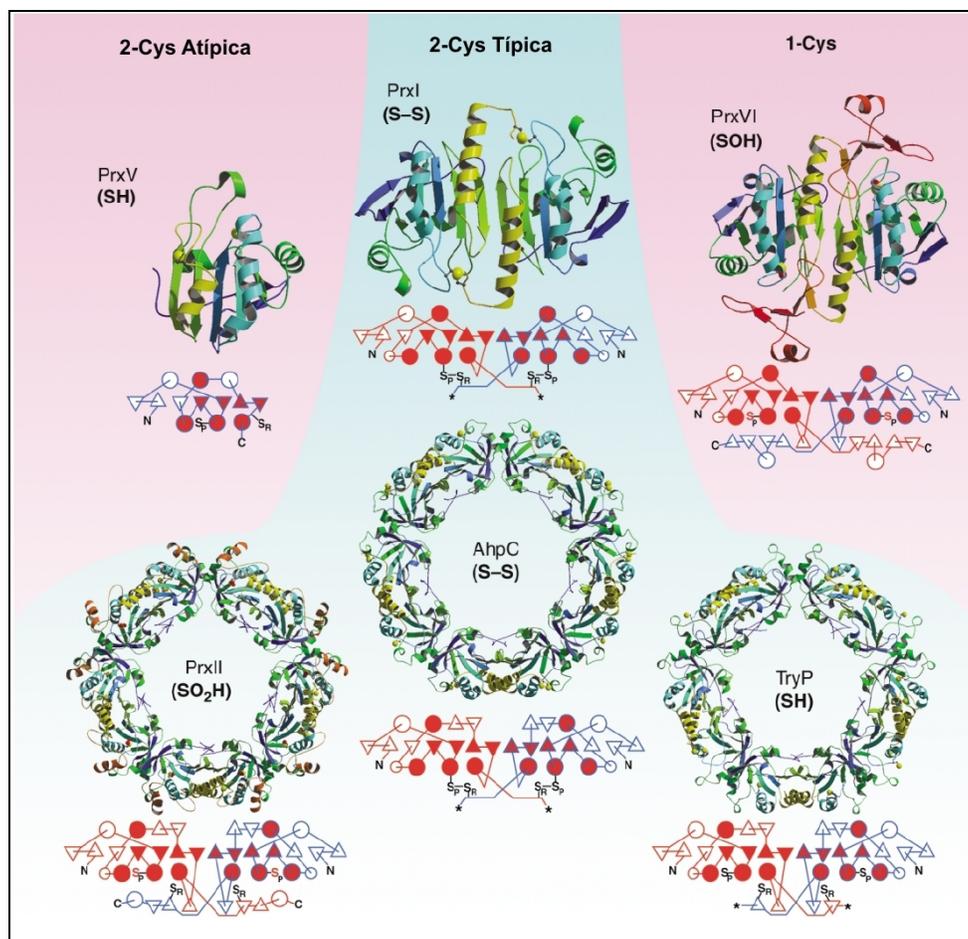
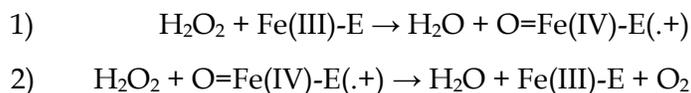


Fig. 1.16: Diferentes clases de Prx. Modelos de cintas y diagramas de topología asociada para la representación de la estructuras cristalinas para las tres clases de Prx: 2CysPrx típica: PrxI de rata, PrxII de humano, TXNPx de *Crithidia fasciculata* y *Salmonella typhimurium* AhpC; 2CysPrx atípica: PrxV de humano; y 1CysPrx: PrxVI de humano. Los diferentes estados de oxidación de la cisteína peroxidática de las diferentes estructuras se encuentran entre paréntesis: como tiol (-SH), ácido sulfénico (-SOH), ácido sulfínico (-SO₂H) o disulfuro (-S-S-). Imagen tomada de Wood y col., 2003.

1.6.5. Catalasa

La catalasa es una hemoperoxidasa ampliamente distribuida entre los organismos aerobios, principalmente en algunas bacterias, animales y plantas. Cataliza la descomposición de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, con una eficiencia catalítica de aproximadamente $4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta enzima es un homotetrámero, conteniendo un grupo hemo por subunidad (Forman y col., 2004; Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008). El mecanismo de la catalasa no se conoce completamente, aunque se estima que la reacción química se produce en dos etapas:



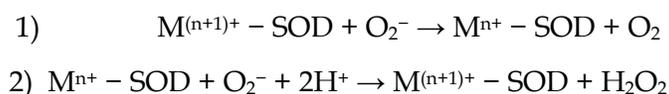
La catalasa puede también oxidar diferentes compuestos tóxicos como: formaldehído, ácido fórmico, y alcoholes (Forman y col., 2004; Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008). Para ello, utiliza al peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones, acorde a la siguiente reacción:



Como en el caso anterior, el mecanismo de la reacción es desconocido.

1.6.6. Superóxido dismutasa.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Existen varias formas comunes de SOD que contienen diferentes cofactores metálicos como cobre, zinc, manganeso, hierro o níquel (Forman y col., 2004; Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008). La dismutación catalizada por SOD del superóxido puede representarse como las siguientes semirreacciones:



donde M es Cu (n=1), o Mn (n=2), o Fe (n=2), o Ni (n=2). En esta reacción el estado de oxidación del catión metálico oscila entre n y n+1. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida, tal que en el citosol de prácticamente todas las células eucariotas contiene una enzima SOD con cobre y zinc (Cu-Zn-SOD). Por otro lado, en mitocondrias y numerosas bacterias contienen una forma con manganeso (Mn-SOD). (Forman y col., 2004; Winyard y col., 2005; Banerjee, 2008).

1.6.7. Enzimas reparadoras.

- Metionina sulfóxido reductasa.

Como se mencionó anteriormente, los residuos de metionina pueden oxidarse, por acción de ERO, para generar una mezcla diastereomérica de metionina sulfóxido (MetSO): metionina-S-sulfóxido (Met-S-SO) y metionina-R-sulfóxido (Met-R-SO), debido a la presencia de un azufre quiral presente en el sulfóxido (Fig. 1.17). Esta oxidación puede resultar en cambios estructurales y funcionales en las proteínas, trayendo, por ejemplo, procesos de envejecimiento celular. Sin embargo, la oxidación de la metionina a metionina sulfóxido es reversible. Este último es un proceso importante que protege a las células contra el estrés oxidativo y además puede actuar como un mecanismo de regulación de la función biológica de ciertas proteínas (Fig. 1.18) (Moskovitz, 2005; Petropoulos y col., 2006).

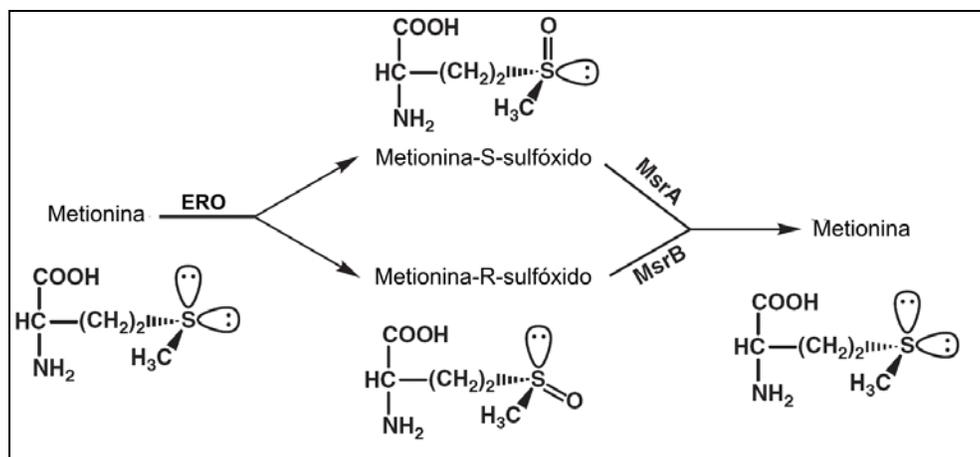


Fig. 1.17: Susceptibilidad a la oxidación del átomo de azufre de la metionina.
Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

La reducción de metionina sulfóxido es catalizada por una enzima denominada metionina sulfóxido reductasa (MSR). El donador de electrones fisiológico para este proceso es TRX. Dado que la formación de MetSO genera dos formas isoméricas, existen dos enzimas distintivamente estereoespecíficas: MsrA y MsrB. La MsrA sólo puede reducir Met-S-SO y MsrB es específica para Met-R-SO. La mayoría de los organismos contienen MsrA y MsrB, indicando la importancia de este proceso reparativo. La función primaria de las Msr es reparar metionina sulfóxido en proteínas y péptidos, sin embargo, pueden reducir, con menor eficiencia, metionina sulfóxido libre. Muchas de las MsrB

contienen un átomo de zinc, el cual es coordinado por cuatro cisteínas y posee un rol estructural en estas proteínas (Grimaud y col., 2001; Moskovitz y col., 2002; Weissbach y col., 2002; Ezraty y col., 2005; Kauffmann y col., 2005).

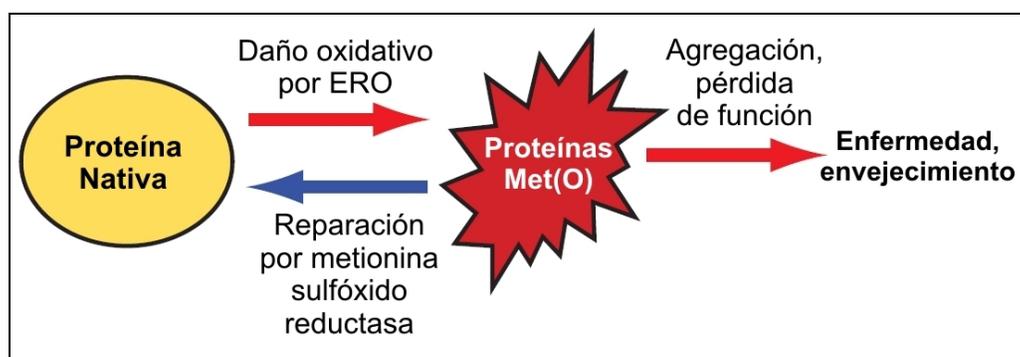


Fig. 1.18: Vía de reducción de metionina sulfóxido. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

Se han resuelto las estructuras tridimensionales tanto de MsrA como MsrB de varias fuentes, observándose que los diferentes tipos de Msr poseen diferencias en el plegado, siendo por ejemplo los sitios activos una imagen especular uno del otro. El mecanismo catalítico de las Msr involucra el siguiente orden: 1) el tiolato de la cisteína catalítica ataca al sulfóxido, generando metionina y formando un ácido sulfénico intermediario sobre la cisteína; 2) la cisteína resolutive ataca al ácido sulfénico intermediario para formar un disulfuro intramolecular; 3) el disulfuro es reducido por TRX u otro donador de electrones (Boschi-Muller y col., 2001; Boschi-Muller y col., 2005; Kauffmann y col., 2005).

- Sulfirredoxina.

Las Prx eucariotas, las cuales funcionan normalmente como reductasas de peróxidos, son susceptibles a la hiperoxidación (formación de ácido sulfínico) de la cisteína peroxidática por un exceso del sustrato oxidante, generando una forma inactiva. Las sulfirredoxinas (Srx) reducen Prx hiperoxidadas en presencia de Mg^{2+} y ATP, regenerando la cisteína a ácido sulfénico. Se ha sugerido que existe una transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP al ácido sulfínico de la Prx para generar un sulfínico fosforil-éster como paso inicial requerido para la activación de esta especie. Seguido a esta activación, el ataque nucleofílico del tiolato de un residuo de cisteína en la Srx al sulfínico fosforil éster de la Prx para formar un enlace tiosulfinato entre las dos proteínas y la ruptura del

complejo por reacción con otro grupo atacante (tiolato). Existen evidencias que DTT o TRX o GSH pueden servir como reductores en el proceso de reparación (Fig. 1.19) (Biteau y col., 2003; Chang y col., 2004; Jonsson y col., 2005; Rhee y col., 2007; Jonsson y col., 2008).

La oxidación de los grupos tioles en las cisteínas a ácido sulfínico ha sido observada en múltiples clases de Prx y puede ocurrir en otras proteínas con cisteínas reactivas. La oxidación de las cisteínas para generar ácido sulfínico y su futura oxidación a ácido sulfónico, puede representar dos pasos o dos tipos de reacciones de oxidación regulatorias que pueden actuar como interruptores funcionales para la actividad de las proteínas, siempre y cuando la modificación sea reversible. La evidencia existente demostró que las Srx parecen ser específicas para la reparación de Prx, dado que proteínas, tales como la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa y DJ-1, hiperoxidadas no mostraron ser sustratos para enzimas. Es por ello que la reducción del ácido sulfínico en residuos de cisteínas reactivas no aparenta ser un mecanismo regulatorio reversible para proteínas diferentes a las Prx (Chang y col., 2004; Jonsson y col., 2005; Woo y col., 2005; Rhee y col., 2007).

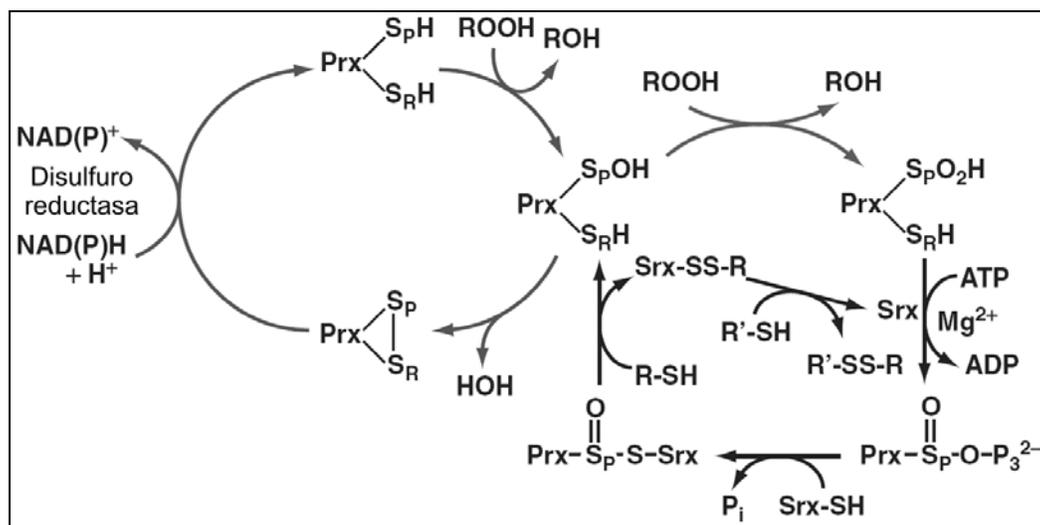


Fig. 1.19: Mecanismo catalítico y de inactivación de Prx y mecanismo propuesto de reparación por Srx. Imagen tomada de Banerjee y col., 2008.

1.7. 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; Wolf y col., 2006).

Dentro de las características más importantes encontramos:

- *Ambiente*: Ninguno de sus representantes está adaptado plenamente a la existencia en el aire, de modo que los que no son directamente acuáticos, se desarrollan en ambientes terrestres húmedos o en el medio interno de otros organismos.
- *Organización celular*. Eucariotas (células con núcleo), unicelulares o pluricelulares. Los más grandes, *algas pardas* del género *Laminaria*, pueden medir decenas de metros, pero predominan las formas microscópicas.
- *Estructura*. Se suele afirmar que no existen tejidos en ningún protista, pero en las *algas rojas* y en las *algas pardas* la complejidad alcanza un nivel muy próximo al tisular, incluida la existencia de plasmodesmos (por ejemplo, en el alga parda *Egregia*). Muchos de los protistas pluricelulares cuentan con paredes celulares de variada composición, y los unicelulares autótrofos frecuentemente están cubiertos por una teca, como en caso destacado de las diatomeas, o dotados de escamas o refuerzos. Los unicelulares depredadores (fagótrofos) suelen presentar células desnudas (sin recubrimientos). Las formas unicelulares a menudo están dotadas de movilidad por reptación o, más frecuentemente, por apéndices de los tipos que llamamos cilios y flagelos.
- *Nutrición*. Autótrofos, por fotosíntesis, o heterótrofos. Muchas formas unicelulares presentan simultáneamente los dos modos de nutrición. Los heterótrofos pueden serlo por ingestión (fagótrofos) o por absorción osmótica (osmótrofos).
- *Metabolismo del oxígeno*. Todos los eucariontes, y por ende los protistas, son de origen aerobio (usan oxígeno para extraer la energía de las sustancias orgánicas), pero algunos

son secundariamente anaerobios, tras haberse adaptado a ambientes pobres en este compuesto.

- *Reproducción y desarrollo.* Puede ser asexual (clonal) o sexual, con gametos y cigoto, frecuentemente alternando la asexual y la sexual en la misma especie. Las algas pluricelulares presentan a menudo alternancia de generaciones. No existe embrión en ningún caso.
- *Ecología.* Los protistas se cuentan entre los más importantes componentes del plancton (organismos que viven en suspensión en el agua), del bentos (del fondo de ecosistemas acuáticos) y del edafon (de la comunidad que habita los suelos). Hay muchos casos de parasitismo ecológicamente importantes y también de mutualismo, como el caso de los flagelados que intervienen en la digestión de la madera en el intestino de los termites o los que habitan en el rumen de las rumiantes. El simbiote algal de los líquenes es casi siempre un alga verde unicelular.

El reino Protista constituye un taxón parafilético puesto que se basa en el carácter plesiomórfico de la unicelularidad y no contiene a todos los descendientes de las especies que abarca (ver Tabla 1.1) (Cavalier-Smith, 2002; Adl y col., 2005; Parfrey y col., 2006; Wolf y col., 2006). Los protistas han tenido un papel central en el origen y evolución de la célula eucariota. Se han propuesto varias hipótesis considerando la acumulación de datos sobre la naturaleza quimérica del genoma de los eucariontes. La evolución subsiguiente es difícil de determinar por las recombinaciones intertaxonómicas primarias, secundarias e incluso terciarias que tuvieron lugar. Sin embargo, comparaciones de múltiples genes y de datos ultraestructurales aclaran en cierta medida tales eventos. Sobre la base de estos datos se han propuesto algunos grupos monofiléticos y una filogenia aproximada de los protistas (Cavalier-Smith, 2002; Adl y col., 2005; Parfrey y col., 2006; Wolf y col., 2006; Cavalier-Smith, Nov - 2006).

Autótrofos fotosintéticos	
Algas bacilariofitas (diatomeas)	Unicelulares, pardo-doradas, encerradas en dos valvas silíceas, marinas y de agua dulce
Algas crisófitas	Unicelulares y coloniales, pardo-doradas, muchas con escamas en su superficies, dulceacuícolas
Algas clorófitas	Unicelulares, coloniales y multicelulares, verdes de agua dulce y marinas
Algas feofitas	Todas multicelulares, que incluyen las grandes algas pardas, casi todas marinas
Algas rodófitas	Todas multicelulares, rojas, la mayoría marinas
Autótrofos y heterótrofos	
Dinoflagelados	La mayoría unicelulares, verdes o de colores muy vistosos, de agua dulce y marinos
Euglenoides	Todos unicelulares, verdes o incoloros, de agua dulce y marinos, de vida libre o parásitos
Heterótrofos multinucleados y multicelulares	
Mixomicetes	Moho mucilaginosos plasmodiales
Acrasiomecetos	Moho mucilaginosos celulares
Oomicetos	Moho acuáticos
Heterótrofos unicelulares	
Mastigóforos	Flagelados. Parásitos o de vida libre
Ameboides o sarcodinos	Organismos ameboideos, de vida libre o parásitos
Cilióforos	Ciliados de vida libre o parásitos
Opalinidos	Flagelados parásitos intestinales de vertebrados inferiores
Esporozoos	Todos organismos parásitos

Tabla 1.1: Clasificación del reino protista.

1.7.1. *Entamoeba histolytica*.

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito anaerobio con forma ameboide que se multiplica por fisión binaria (reproducción asexual). *E. histolytica* puede existir en dos formas morfológicas: trofozoito y quiste. Es un organismo patógeno para el humano, quien es su único hospedador, causando amebiasis lo cual incluye colitis amébrica y absceso hepático (Loftus y col., 2005; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

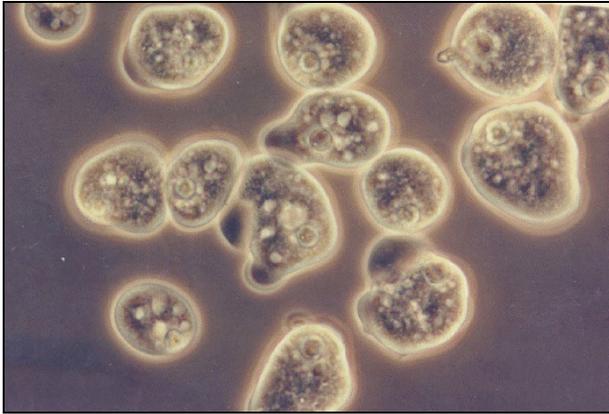


Fig. 1.20: Imagen de trofozoitos de *E. histolytica* tomada con microscopio de fase. Imagen tomada de www.wikipedia.org.

- Taxonomía:

Reino: Protista

Filo: Amoebozoa

Clase: Archamoebae

Orden: Entamoebida

Familia: Entamoebidae

Género: *Entamoeba*

Especie: *E. histolytica*

- Características metabólicas.

El metabolismo de *E. histolytica* es similar al de *Giardia* sp y *Trichomonas* sp, anaerobio, fermentativo y de naturaleza bacteriano. Esta ausencia de mitocondria hace a *E. histolytica* carecer de un ciclo de Krebs funcional y de la vía de fosforilación oxidativa, consecuentemente la obtención de ATP es anaeróbica y a nivel de sustrato. Los productos finales de la fermentación en este parásito son CO₂, acetato, etanol y alanina. *E. histolytica* carece de mitocondrias típicas, en su lugar posee un tipo de mitocondria degenerada, el mitosoma. El mitosoma deriva probablemente de la mitocondria, y como ésta, posee una doble membrana y proteínas que le son entregadas por medio de una secuencia señal. Los péptidos señales son muy similares a los usados para transporte hacia mitocondrias en otros organismos. Algunas proteínas asociadas a los mitosomas están relacionadas con las presentes en las mitocondrias, por ejemplo proteínas que poseen clusters [2Fe-2S]. Los mitosomas, al contrario que las mitocondrias, no contienen genoma ni proteínas de la cadena respiratoria. Los genes para los componentes mitocondriales se encuentran

codificados en el genoma nuclear. Hasta el momento, no se comprende completamente la importancia y función de esta organela en *E. histolytica* y otros protozoos anaerobios (Bhattacharya y col., 2000; Upcroft y col., 2001; Leon-Avila y col., 2004; Anderson y col., 2005; Bansal y col., 2006a).

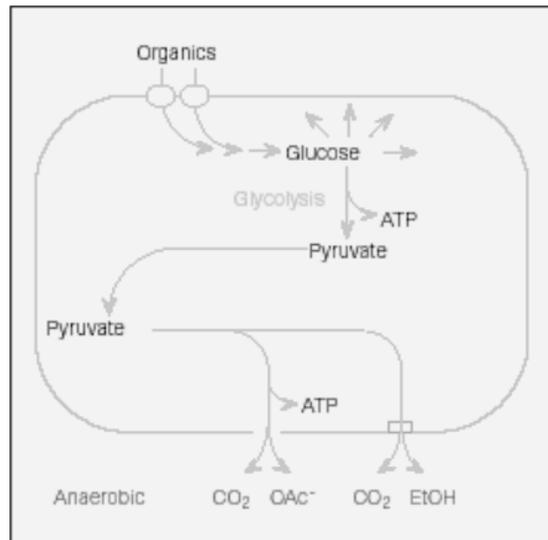


Fig. 1.21: Representación de vías fermentativas en *E. histolytica* Imagen adaptada de www.wikipedia.org.

- Morfología y fisiología.

Se pueden distinguir varias formas o fases de desarrollo en esta especie, presentes durante varias etapas de su ciclo de vida (Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

- Trofozoito: es la forma activamente móvil de la especie y pleomórfica. Se caracteriza por tener un núcleo con una concentración de cromatina puntiforme y generalmente concéntrica llamado cariosoma central; así como la formación de cromatina en la periferia del núcleo. Su citoplasma carece de algunas organelas que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistema de lisosomas primarios y secundarios, se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes
- Quiste: forma infectante. El proceso de enquistamiento se da cuando las condiciones ambientales le son desfavorables a los trofozoitos. Contiene de 1 a 4 núcleos, dependiendo de la madurez del quiste. Son de forma redondeada, refringente con una membrana claramente demarcada.

- Metaquiste: tienen las mismas características que los quistes, por derivarse de estos durante el proceso de desenquistamiento en la luz del colon proximal. Son los metaquistes los que darán origen a los trofozoitos, por lo que tienen una membrana más irregular y delgada que un quiste.

- Amebiasis - Epidemiología.

La Organización Mundial de la Salud define a la amebiasis: "como la condición de portar el parásito *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas". Hay 50 millones de nuevas infecciones por año y 70.000 muertes. La disentería amébrica se presenta frecuentemente en países tropicales, aunque también se presentan casos en las zonas templadas y frías (Fig. 1.22). La amebiasis está ampliamente distribuida en el mundo, siendo la India, Sur y Oeste de África, Lejano Oriente y Sur y Centro América, las áreas con mayor incidencia. En Europa y Estados Unidos menos del 5% de la población es portadora. El modo de transmisión más frecuente es la ruta fecal-oral, siendo el hombre el único reservorio (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; Upcroft y col., 2001).

La infección ocurre por la contaminación del agua, alimentos crudos mal lavados o mal cocinados con quistes infecciosos provenientes de heces contaminadas. Es posible que moscas y cucarachas transporten quistes, desde las heces hasta los alimentos. Los quistes son resistentes, sobreviviendo varias semanas, pero mueren a alta temperatura. Esta es una de las enfermedades relacionadas con la pobreza, la ignorancia, las malas condiciones sanitarias, el hacinamiento y la desnutrición. Las condiciones de baja higiene aumentan la incidencia y prevalencia de la disentería amebiana (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; Upcroft y col., 2001).

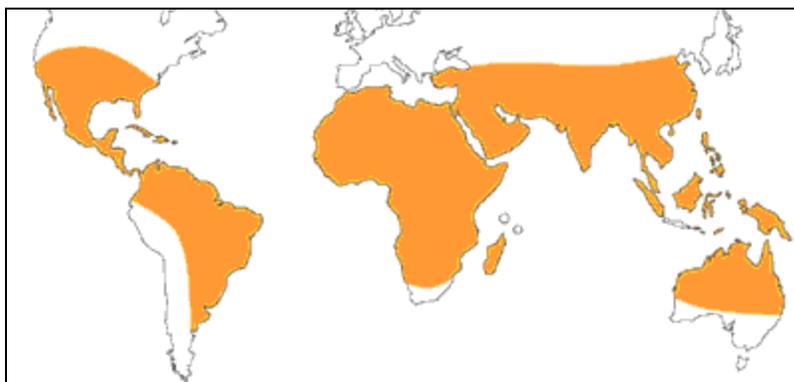


Fig. 1.22: Distribución geográfica de la amebiasis. OMS 2004.

- Ciclo de vida.

El ciclo de vida (Fig. 1.23) comienza con la ingesta de quistes provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal (1). Éstos pasan sin modificación por el ambiente ácido del estómago hasta la porción inicial del colon y el ciego, donde se induce la transformación a metaquistes (2), los cuales rápidamente se dividen en ocho trofozoitos (3). Los trofozoitos se adhieren fuertemente a la mucosa del colon, multiplicándose y pudiendo causar intenso dolor. Algunos trofozoitos se transforman en formas quísticas, que no se adhieren a la mucosa y son expelidas en las heces (4)

(Organización_Mundial_de_la_Salud, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

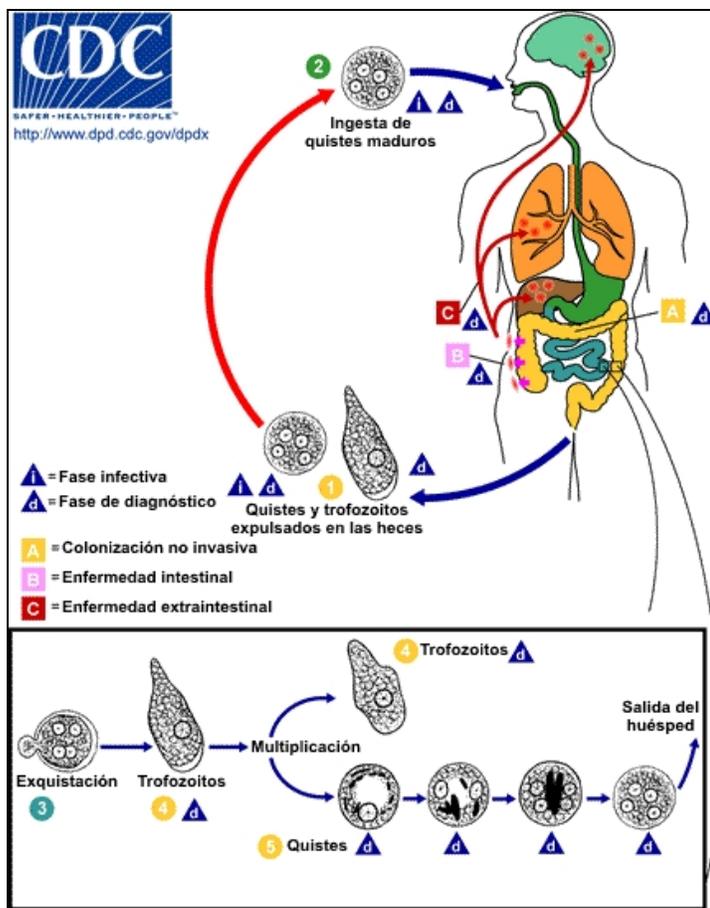


Fig. 1.23: Morfología y ciclo de vida de *E. histolytica*. Imagen tomada de www.cdc.gov.

- Patología.

Las lesiones por *E. histolytica* pueden ser intestinales (disentería) o extraintestinales, involucrando potencialmente a varios órganos.

(Centers_for_Disease_Control_and_Prevention)

- Lesiones intestinales: La patología intestinal ocurre principalmente en cualquier parte del colon, en particular el ciego, sigmoides y el recto. La interacción inicial del trofozoito conlleva la lisis de las células diana, probablemente por acción proteolítica. Una vez atravesado el epitelio intestinal, penetra e instala hábitat en la submucosa. La reacción inflamatoria resultante en el tejido intestinal produce nódulos que progresan a úlceras y subsecuente necrosis localizada como resultado de trastornos del riego sanguíneo. La resistencia del parásito al ataque del sistema del complemento, hace que pueda sobrevivir en medio de una sobrepoblación infiltrativa de células linfocitarias.

- Lesiones extraintestinales:

1. Localización pulmonar, generalmente originada por contigüidad de las lesiones hepáticas, observándose con más frecuencia en el pulmón derecho. Se caracteriza por necrosis del parénquima pulmonar con posible infección bacteriana secundaria.
2. Localización cerebral, causada por diseminación sanguínea. Es una complicación bastante rara.
3. Localización en la piel, causando úlceras dérmicas, viéndose con más frecuencia en la región perianal, peneal y la pared abdominal.
4. Absceso hepático. Es la lesión más frecuente.

Varios factores se encuentran caracterizados en la patogenicidad de este parásito (Kobiler y col., 1980; Mattern y col., 1980; Spinella y col., 1997; Spinella y col., 1999; Hughes y col., 2000; Upcroft y col., 2001; Bruchhaus y col., 2003; Marion y col., 2004; McCoy y col., 2005; Ocadiz y col., 2005), como ser:

- Lectinas Gal/GalNAc: son proteínas de transmembranas heterodiméricas codificadas por una familia multigénica que permiten la adhesión de la ameba a mucinas de la mucosa intestinal. La adhesión es un paso clave para la fagocitosis y citotoxicidad mediada por el parásito.
- Cisteína-proteasas: grupo de proteasas codificadas por una familia multigénica, importantes en la generación de abscesos amebicos.
- Amebotoxina o amebaporas: son proteínas de aproximadamente 77 aminoácidos, contenidas en las vesículas de secreción, empleadas para dañar y destruir a bacterias y a células del huésped por generación de poros en la membrana plasmática.

- Diagnóstico y Tratamiento.

Las infecciones humanas asintomáticas son usualmente diagnosticadas con la demostración directa de los quistes del parásito en las heces. En las infecciones sintomáticas, la forma trofozoito puede ser observada en las heces frescas mediante microscopía directa. Los exámenes serológicos existen y la mayoría de los individuos resultarán positivos para la presencia de anticuerpos, tengan o no sintomatología. Los niveles de anticuerpos resultan mayores en pacientes con abscesos hepáticos. Los procedimientos más recientes incluyen una prueba que detecta la presencia de proteínas amebianas en las heces, y otra que demuestra la presencia de ADN de la ameba en heces. (Upcroft y col., 2001; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

Las infecciones con *E. histolytica* se tratan por prescripción médica de antiparasitarios. La droga de preferencia es el metronidazol (más del 90% de los casos); pero también se emplean otras, tales como iodoquinol, paramomicina o furoato de diloxanida y tinidasol. Los abscesos hepáticos avanzados pueden requerir de tratamiento quirúrgico. A pesar de la importancia de la enfermedad como problema de salud pública, se cuenta con un número relativamente reducido de medicamentos para el tratamiento de la disentería y el absceso hepático amebianos. La mayoría de ellos con un margen terapéutico estrecho y con diversos efectos secundarios en el hombre. Además, han aparecido informes de resistencia de *E. histolytica* a algunos de los fármacos antiparasitarios más usuales en la práctica médica (tales como metronidazol). Por ello resulta conveniente la búsqueda permanente de compuestos antiparasitarios más eficientes y mejor tolerados por el hombre (Upcroft y col., 2001; Bansal y col., 2006a; Bansal y col., 2006b; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

- Metabolismo redox en *E. histolytica*.

Los trofozoitos de *E. histolytica* usualmente viven en un ambiente anaerobio o microaerófilo dentro del intestino, donde son expuesto a bajas concentraciones de oxidantes generados por el metabolismo de la flora normal que reside allí. No obstante, durante la invasión a otros tejidos, *E. histolytica* es expuesta a un incremento en la presión de oxígeno y a altas cantidades de ERO generadas por células efectoras de la respuesta primaria, tales como neutrófilos y macrófagos. Estudios previos han demostrado que el

parásito puede tolerar hasta un 5% de oxígeno gaseoso. Desde este punto de vista, cuatro enzimas han sido identificadas siendo importantes como sistemas antioxidantes en este parásito:

- Una superóxido dismutasa que contiene hierro (Fe-SOD), la cual cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Bruchhaus y col., 1994a).

- Se ha caracterizado una flavin reductasa bifuncional (NADPH:flavina oxidorreductasa, *Ehp34*), relacionada a las AhpF y a L-TRXR, que posee tanto actividad disulfuro reductasa como la capacidad de reducir el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno (Bruchhaus y col., 1998).

- Se ha evidenciado la presencia de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa sobre la membrana plasmática y en una estructura compacta en el citoplasma. Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA y CO₂ para generar ferredoxina reducida. Se le ha atribuido un papel importante en la activación y efectividad de metroimidazol contra la infección con este parásito (Wassmann y col., 1999).

- Una peroxirredoxina (2-Cys-Prx típica, *Ehp29*), estudiada por varios grupos de trabajo, con capacidad de eliminar peróxido de hidrógeno, producido durante la reducción del oxígeno molecular por *Ehp34* o durante la dismutación del anión superóxido por la Fe-SOD amébrica. La reacción de remoción de peróxido de hidrógeno mediada por la Prx es dependiente de la presencia de tioles o de la actividad disulfuro reductasa de *Ehp34*. Una diferencia marcada entre la Prx de *E. histolytica* y otros miembros de la familia es que aquella posee una extendida región rica en cisteínas hacia el extremo N-terminal y que variantes truncadas en esta región poseen menor actividad peroxidasa respecto a la versión nativa. Dado que este parásito no posee catalasa, la Prx es considerada como un importante protección contra el ataque oxidativo durante la infección a los tejidos (Tannich y col., 1991; Bruchhaus y col., 1992; Bruchhaus y col., 1994a; Bruchhaus y col., 1997; Bruchhaus y col., 1998; Tekwani y col., 1999; Cheng y col., 2000; Hughes y col., 2003; Akbar y col., 2004; Cheng y col., 2004; Choi y col., 2005).

Se ha observado la fuerte inducción de los genes que codifican a estas tres enzimas arriba mencionadas por altos niveles de oxígeno ambiental o bajo condiciones de estrés oxidativo. Por otro lado, la resistencia a metroimidazol está fuertemente asociada al

incremento en la expresión de Fe-SOD y de la Prx y una represión en la expresión de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa. Además, se ha demostrado que la acción de la Fe-SOD disminuye la susceptibilidad por el metroimidazol bajo condiciones microaerófilas y no en condiciones de anaerobiosis (Bruchhaus y col., 1994a; Wassmann y col., 1999; Wassmann y col., 2000; Upcroft y col., 2001).

Distintivamente, *E. histolytica* es un eucariota que carece de glutatión y de todas las enzimas asociadas. El principal tiol de bajo peso molecular en este organismo, al igual que en *Trichomonas* y *Giardia*, es la cisteína. Ésta se encuentra presente en altos niveles en la ameba, generándose por medio de la enzima cisteína sintetasa, la cual había sido descrita originalmente en bacterias y plantas (Tekwani y col., 1999; Loftus y col., 2005). Estudios realizados describen que *E. histolytica* puede tomar glutatión del medio y convertirlo en tripanotión, un ditiol "exclusivo" de kinetoplastidos. Los mismos autores han detectado actividad TR en extractos parcialmente purificados de este protozoo. Contrariamente, otros estudios realizados por otro grupo de trabajo, no ha podido demostrar la existencia de tripanotión en esta ameba. Más aún, la ausencia de genes que codifiquen para enzimas relacionadas al tripanotión en el proyecto genoma, recientemente finalizado, hacen que la existencia del metabolismo asociado al tripanotión en *E. histolytica* siga siendo un tema controversial (Ondarza y col., 1997; Ariyanayagam y col., 1999; Ondarza y col., 1999a; Ondarza y col., 1999b; Loftus y col., 2005; Tamayo y col., 2005).

1.7.2. *Phaeodactylum tricornutum*.

Phaeodactylum tricornutum es una diatomea única en el género *Phaeodactylum*. Las diatomeas son organismos fotosintéticos que viven en agua dulce o marina, constituyendo una parte muy importante del fitoplancton. El modelo experimental dentro de las diatomeas es la especie *P. tricornutum*, la cual tiene un genoma relativamente pequeño, un tiempo de generación corto y es factible de ser transformada genéticamente. Uno de los rasgos característicos de las diatomeas es la presencia de una cubierta de sílice (dióxido de silicio hidratado) llamado frústulo. La evidencia fósil sugiere que se originaron durante o antes del período Jurásico temprano (Bhaya y col., 1991; Zaslavskaia y col., 2000; Scala y col., 2002; Gruber y col., 2007; Kroth y col., 2008).

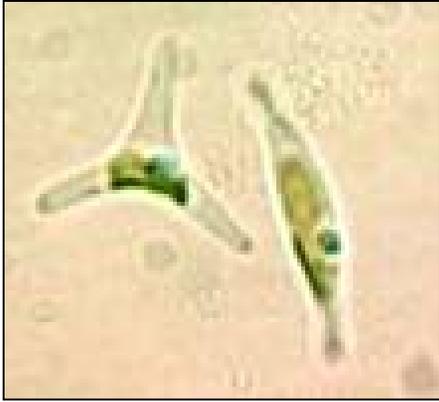


Fig. 1.24: Fotografía de *P. tricornutum*.
Imagen tomada de www.wikipedia.org.

- Taxonomía.

Reino: Protista

Filo: Heterokontophyta

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Naviculales

Familia: Phaeodactylaceae

Género: *Phaeodactylum*

Especie: *P. tricornutum*

- Diatomeas - Clasificación.

Tradicionalmente se han distinguido las diatomeas centrales, con simetría radial circular o trímica y las pennales, con simetría bilateral y forma alargada. Las primeras son parafiléticas con respecto a las segundas. Una clasificación más reciente divide las diatomeas en tres clases: diatomeas céntricas (Coscinodiscophyceae), diatomeas pennales sin rafe (Fragilariophyceae) y diatomeas pennales con rafe (Bacillariophyceae) (Mann, 1989; Round y col., 1990; Falciatore y col., 2002).

- Diatomeas - Características.

Las diatomeas son organismos fotosintéticos que forman parte del fitoplancton. Tienen un color dorado oliváceo, debido a su juego de pigmentos fotosintéticos, que como en otros Chromistas incluye clorofila c_1 y c_2 , así como carotenoides como pigmentos auxiliares y fucoxantina. Las reservas de alimento se almacenan como hidratos de carbono o aceites que, además de servir de reserva, contribuyen a su flotabilidad (Mann, 1989;

Falciatore y col., 2002). Poseen como cubierta al frústulo, constituido por dos piezas o valvas que encajan como una caja y su tapadera, de manera que la caja es más pequeña que la tapadera. La sílice biogénica que compone los frústulos se sintetiza intracelularmente por la polimerización de los monómeros de ácido silícico. Este material es entonces extraído al exterior de la célula y añadido al frústulo. Los frústulos muestran una gran diversidad de formas, algunos muy bellos y ornamentados y generalmente constan de dos partes asimétricas o valvas con una división entre ellas, de ahí el nombre del grupo (Mann, 1989; Falciatore y col., 2002).

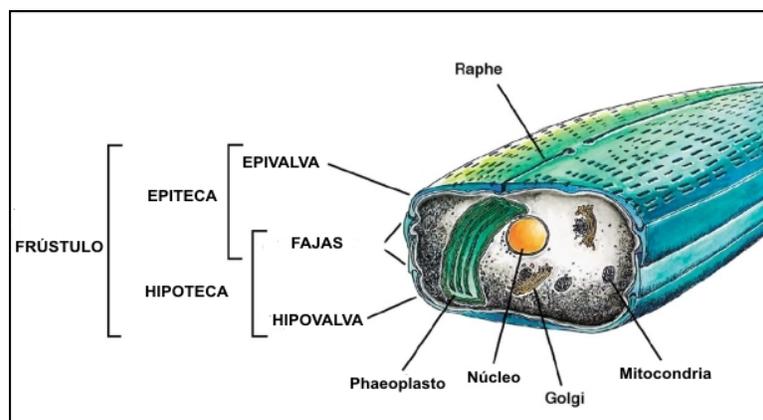


Fig. 1.25: Esquema general de la estructura de una diatomea pennal. Imagen tomada de Vrieling y col., 2005.

La forma de reproducción más frecuente de las diatomeas es de manera asexual por división celular. En este proceso debido a que una parte del frústulo es más pequeña que la otra, al dividirse, la parte pequeña genera una diatomea de menor tamaño que la original. De esta forma, en la primera generación el 50% de las diatomeas son de menor tamaño y como el frústulo no puede crecer, las diatomeas se van haciendo más pequeñas en cada generación sucesiva. Pero luego de una determinada cantidad de generaciones, las diatomeas se reproducen de forma sexual, formando gametos sin frústulos. Este mecanismo ayuda a restablecer el tamaño original de las diatomeas porque el cigoto que se forma crece mucho antes de producir un nuevo frústulo (Mann, 1989; Falciatore y col., 2002).

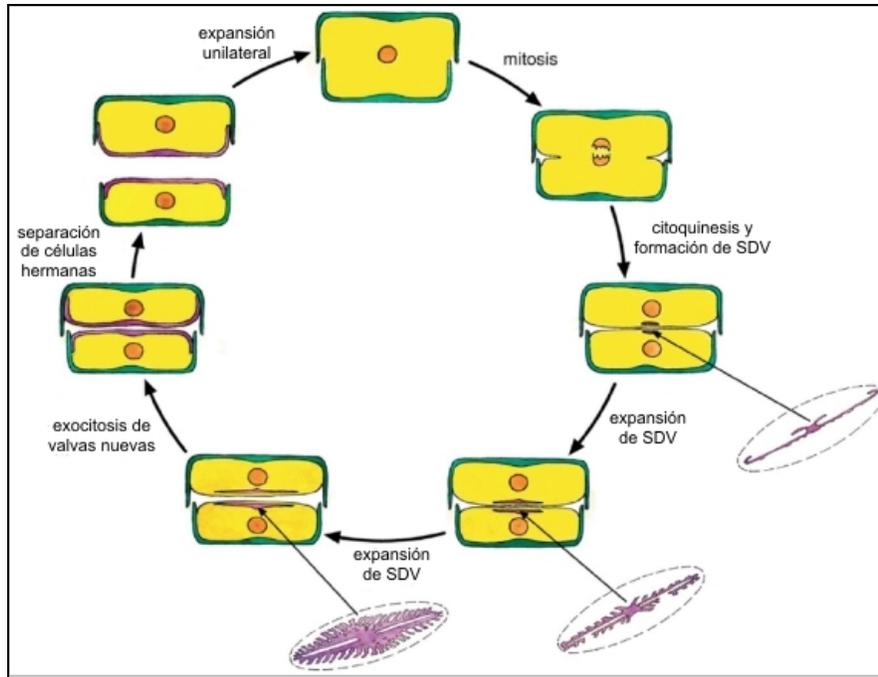


Fig. 1.26: División mitótica de una diatomea penal. (SDV - depósito vesicular de sílice). Imagen tomada de Vrieling y col., 2005.

- Importancias biológicas e industriales.

Actualmente se conocen más de 200 géneros vivientes de diatomeas y se estiman alrededor de 100.000 especies extintas. Como colonizadores, estos protistas se distinguen por encontrarse en cualquier tipo de ambiente, ya sea marino o dulceacuícola (Scala y col., 2002; Kroth y col., 2008). También se encuentran en ambientes donde existen condiciones extremas de temperatura o salinidad y de igual forma las encontramos interactuando con otros organismos (Scala y col., 2002; Maheswari y col., 2005; Kroth y col., 2008). Las diatomeas son especialmente importantes en los océanos, donde se calcula que proporcionan hasta un 45% del total de la producción primaria oceánica, siendo responsables de generar alrededor del 20% de la fijación global de carbono (Maheswari y col., 2005; Kroth y col., 2008). Esto las colocan en una posición importante en las cadenas tróficas y es por ello que son de relevancia en la ecología acuática; a la vez, son de importancia en el reciclaje de minerales, tal como el sílice (Vrieling y col., 2005). Este rol como grandes productores tróficos, hacen a las diatomeas primordiales en la regulación de los niveles atmosféricos de CO₂, ahora de gran interés dado el especial aumento que este "gas de invernadero" presenta y por consiguiente el calentamiento global (Scala y col., 2002; Maheswari y col., 2005; Akcha y col., 2008; Kroth y col., 2008).

Las diatomeas poseen diversas utilidades en biotecnología e industria como la alimentación humana y animal, las industrias farmacéutica y cosmética, la producción de fertilizantes, el acondicionamiento de suelos para la agricultura y la depuración de aguas residuales (Vrieling y col., 2005; Grachev y col., 2008). Los cultivos de microalgas poseen numerosas ventajas: a gran escala son simples en su implementación y económicos (Cifuentes y col., 2003; Carvalho y col., 2005). Muchas microalgas crecen en ambientes salinos e hipersalinos, por lo que no compiten con la agricultura tradicional por los limitados recursos de tierra arable y agua fresca (Converti y col., 2006). Son excelentes fuentes alimenticias, dado que poseen concentraciones de nutrientes poco comunes, superior a la observada en cualquier especie vegetal. Pero aún es mayor su elevada concentración de vitaminas, minerales y otros nutrientes (Raja y col., 2007). En el campo de la medicina humana y veterinaria es considerable su potencial. Algunas especies contienen luteína, que puede reducir el riesgo de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y oftalmológicas, así como otros compuestos con acción anticarcinogénica, antimutagénica, estimuladora del sistema inmune, reductora de hipertensión, desintoxicante y reductora de colesterol (Domergue y col., 2002; Domergue y col., 2003).

Por otra parte las microalgas representan una importante reserva de ácidos grasos omega-3, cuyos derivados son efectivos en la prevención y el tratamiento de ciertas patologías, incluyendo enfermedades coronarias, agregación plaquetaria, y niveles anómalos de colesterol (Yongmanitchai y col., 1991). Se emplean como aditivos para forraje para ganadería y en la acuicultura dado su alto contenido proteico (Cifuentes y col., 2003; Lodi y col., 2003). Se usan como colorantes en la industria alimenticia en margarinas, mayonesas, jugos de naranja, helados, quesos y productos de panificación (Banerjee y col., 2002). Las microalgas se utilizan también como biofertilizantes y acondicionadores del suelo (Domergue y col., 2003). También son empleadas como indicadoras de contaminación por su tolerancia a los metales pesados tales como cobre, cadmio y plomo, así como a los hidrocarburos clorados (Akcha y col., 2008). La utilización de microalgas, constituye un método muy conocido para tratar aguas residuales, sin muchas inversiones adicionales, aportando el oxígeno que resulta tan necesario a las bacterias en su papel degradador (Lodi y col., 2003; Converti y col., 2006). Hoy es indiscutible la importancia económica de las microalgas como organismos de los cuales se pueden extraer productos beneficiosos. Además de ser productoras primarias de los ambientes acuáticos, son

indicadoras de contaminación (Akcha y col., 2008). A pesar de las importancias biotecnológicas y ecológicas, solamente se han estudiado desde el punto de vista fisiológico y bioquímico unas 50 especies de diatomeas de las 30.000 las especies de microalgas existentes, por lo que representan un recurso prácticamente inexplorado con un amplio potencial a ser explotado (Kroth, 2007).

- Metabolismo antioxidante en *P. tricornutum*.

A pesar de la importancia ecológica, industrial y biotecnológica que presentan las diatomeas, existen pocos antecedentes sobre el metabolismo antioxidantes en estos organismos. Unos pocos trabajos han descrito que en cultivos *P. tricornutum* expuestos a metales pesados como cobre, zinc, cadmio, mercurio, etc., existe un cambio en los niveles de tioles de bajo peso molecular y de enzimas antioxidantes (Holdsworth y col., 1977; Reiriz y col., 1994; Kawakami y col., 2006). Se ha demostrado la presencia de GSH en células de *P. tricornutum*, así como se ha detectado actividades enzimáticas en extractos crudos libres de células, de enzimas como: glutatión reductasa, superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y pirogallol peroxidasa (Morelli y col., 2004).

Además, se evidenció la existencia de un mecanismo activo en la detoxificación por el envenenamiento por metales pesados que implica el secuestro intracelular de los iones del metal por medio de glutatión y péptidos relacionados al glutatión, tales como fitoquelatinas (FQ). Estos compuestos son péptidos de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, sintetizados enzimáticamente por una fitoquelatina sintasa, que utiliza glutatión reducido como sustrato y es activada por los iones metálicos (como Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+}) (Holdsworth y col., 1977; Reiriz y col., 1994; Morelli y col., 1997; Morelli y col., 2001; Morelli y col., 2005; Kawakami y col., 2006).

1.7.3. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo de la clase Kinetoplastidae, familia Trypanosomatidae, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual se encuentra el genoma ordenado en una red compleja y compacta denominada kinetoplasto. *T. cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, siendo un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra a mamíferos (hospederos) e insectos hematófagos (vectores) (TDR-Home_Page).

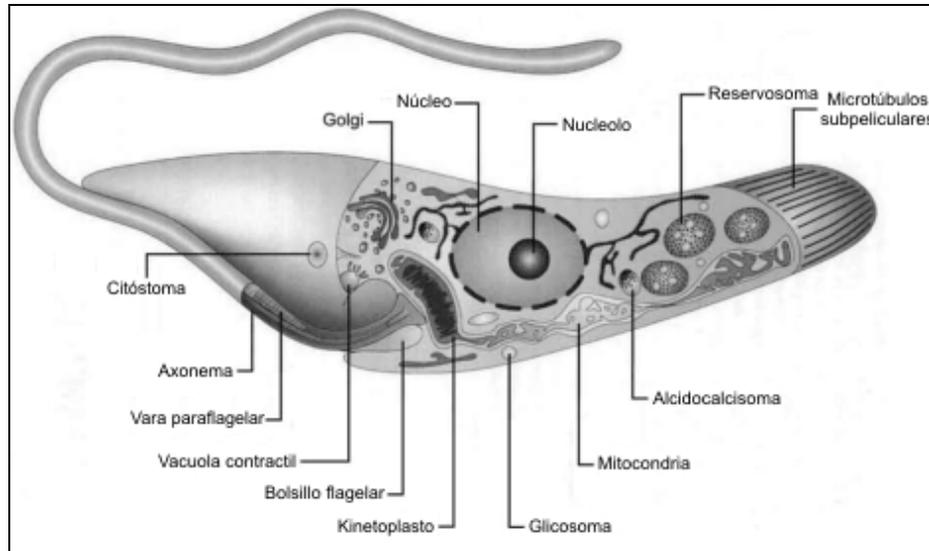


Fig. 1.27: Esquema de organización subcelular de epimastigote de *T. cruzi*. Imagen tomada de Souza 2008.

- Taxonomía.

Reino: Protista

Filo: Euglenozoa

Clase: Kinetoplastidae

Orden: Trypanosomatida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *T. cruzi*

- Características de los kinetoplastidos.

- Poseen una organela derivada de las mitocondrias llamada kinetoplasto, la cual contiene ADN distinto al que se encuentra en el núcleo. El ADN del kinetoplasto es muy particular y consiste de mini y maxi-círculos que se encuentran concatenados. Los maxi-círculos codifican para varios genes mitocondriales en tanto que los mini-círculos son más heterogéneos y contienen información codificante para los ARNg (ARN guías), los cuales son necesarios para la edición de los ARNm provenientes de los maxi-círculos (Budde, 2003; Souza, 2008).

- Tienen una organela derivada de los peroxisomas, llamada glicosoma en donde ocurre la mayor parte de la vía glicolítica. La alta concentración de las enzimas responsables de

los pasos iniciales de la glucólisis en los glicosomas hace de éste un proceso altamente eficiente y rápido. En esta organela ocurre la vía glucolítica desde la hexoquinasa hasta la fosfogliceratoquinasa. Otras funciones del glicosoma incluyen la biosíntesis de pirimidinas, la β -oxidación de ácidos grasos y el salvataje de purinas (Parsons, 2004; Michels y col., 2006; Souza, 2008).

- Poseen una única mitocondria muy ramificada (Souza, 2008).
- Se caracterizan por tener 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).
- Contrariamente a lo que ocurre en otros eucariotas, el ADN de este organismo es transcrito continuamente en forma de un mensajero policistrónico. La maduración de este mensajero es llevado a cabo por un proceso de “*trans-splincig*” (Teixeira, 1998; Guerrero, 2000; Teixeira y col., 2003).
- No existe ninguna la regulación transcripcional, en consecuencia todos los genes son transcritos, siendo un caso excepcional en los eucariotas. La regulación reside a nivel post-transcripcional (Teixeira, 1998; Guerrero, 2000; Teixeira y col., 2003).
- Características energéticas:

La glucólisis se inicia en una organela del tipo de los microcuerpos llamada glicosoma. No se produce una degradación total de la glucosa, ni aún en presencia de O_2 . Se elimina una mezcla de CO_2 , ácidos dicarboxílicos (succínico y málico) y alanina. En las formas sanguíneas de los tripanosomas, por lo general no se detecta generación de ATP asociada a la mitocondria. Ausencia de reservas en forma de lípidos o polisacáridos. Se encontraron polifosfatos y fosfágenos. En las formas presentes en el insecto vector, las mitocondrias se vuelven mas activas, aparecen crestas y aumenta la expresión de enzimas necesarias para la fosforilación oxidativa. También se observa catabolismo de aminoácidos (Michels y col., 2006).

- Morfología.

T. cruzi presenta tres formas distintas: amastigote, epimastigote y tripomastigote (Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

- Amastigote: esférico u ovalado, es la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas.
- Epimastigote: alargado y con el kinetoplasto localizado anteriormente al núcleo, es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los insectos vectores y en medios de cultivo.
- Tripomastigote: también alargado, pero con el kinetoplasto localizado posteriormente al núcleo. Se encuentra en la sangre de los mamíferos y es la forma infecciosa de ellos. Esta forma no se divide.

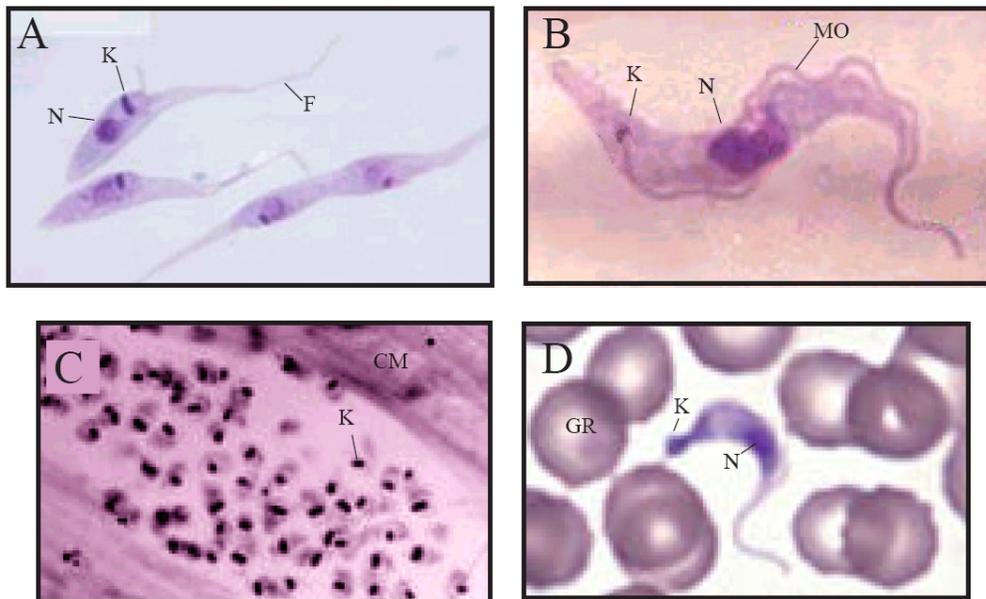


Fig. 1.28: Formas celulares de *T. cruzi*. A) Epimastigotes, B) Tripomastigote metacíclico, C) Amastigotes en el interior de una célula muscular, D) Tripomastigote sanguíneo en sangre periférica. N: núcleo; K: kinetoplasto; F: flagelo; MO: membrana ondulante; GR: glóbulo rojo; CM: célula muscular. Imagen tomada de Igoillo Esteve, 2005.

- Ciclo de vida.

El ciclo de vida del *T. cruzi* se puede dividir en dos etapas principales: en el huésped (mamífero) y en el vector (insecto). Este parásito es transmitido principalmente por triatomas, en Argentina el principal vector es *Triatoma infestans* (vinchuca) (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

- Etapas en el ser humano: El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago infectado pica a un ser humano y defeca. Los *tripomastigotes metacíclicos* se transmiten en las heces (Fig. 1.29-1). Entran en el huésped a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas. Cuando entran en una célula humana, se convierten en *amastigotes* (2). Esta es

una etapa reproductiva a través de la mitosis. Después de la reproducción, una gran cantidad de amastigotes se encuentran en la célula infectada, formándose pseudoquistes (3). El amastigote se convierte de nuevo en *tripomastigote* y la célula se lisa. El tripomastigote vuelve a infectar otra célula repitiéndose el ciclo de multiplicación (4).

- Etapas en el insecto: Cuando el insecto pica a un huésped infectado, algunos *tripomastigotes* pasan a él a través de la sangre (5). En el intestino del insecto, se transforman en *epimastigotes* (6), los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva (7). Después de la reproducción a través de mitosis, los epimastigotes pasan al recto. Allí se convierten en *tripomastigotes metacíclicos* (8) y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo huésped (1), repitiéndose el ciclo.

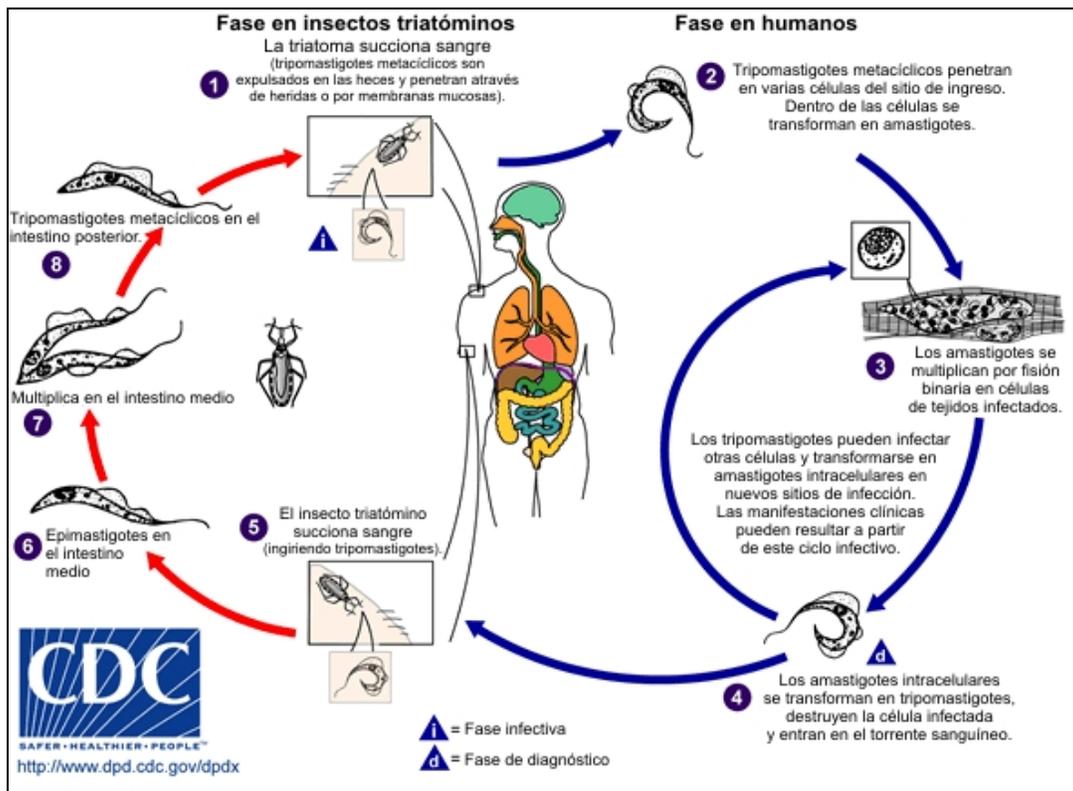


Fig. 1.29: Ciclo de vida del *T. cruzi*. Imagen tomada de www.cdc.gov.

- Patogenicidad - Manifestaciones clínicas.

El *T. cruzi* produce la llamada enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Se transmite por medio de insectos hematófagos del grupo de los triatóminos, principalmente el *Triatoma infestans*. Estos insectos son insectos hematófagos que viven en las rendijas,

agujeros y espacios desaseados de viviendas o bodegas en las regiones de América del Sur y América Central (Chagas_Disease_Alliance, ; Organización_Mundial_de_la_Salud, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).



Fig. 1.30: Insecto vector *Triatoma infestans*.
Imagen tomada de www.wikipedia.org.

Estos insectos se infectan después de picar a un animal o persona que ya padece la enfermedad. En general, la infección se propaga a los seres humanos cuando un insecto infectado deposita heces en la piel mientras que la persona está durmiendo en la noche. La persona a menudo se frota las picaduras, introduciendo accidentalmente las heces en la herida, un corte abierto, los ojos o la boca. Los animales pueden infectarse de la misma forma. Otras formas de transmisión menos frecuentes incluyen el ingerir comida contaminada con el parásito, transfusiones de sangre y transmisión fetal (TDR-Home_Page, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

En el hombre, la enfermedad de Chagas presenta tres estadios: la fase aguda, poco después de la infección y la fase crónica que puede desarrollarse incluso pasado diez años (TDR-Home_Page, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

En la fase aguda, un nódulo cutáneo local llamado *chagoma* puede aparecer en el sitio de inoculación. Cuando el sitio de inoculación es la membrana mucosa conjuntival, el paciente puede desarrollar edema periorbital unilateral, conjuntivitis y linfadenitis preauricular. Esta constelación de manifestaciones se refiere como signo de Romana el cual esta presente en muy pocos casos. La fase aguda suele ser asintomática, pero pueden presentarse fiebre, anorexia, linfadenopatía, hepatosplenomegalia leve y miocarditis. La fase crónica es sintomática y puede aparecer años o décadas después de la infección inicial. La enfermedad afecta al sistema nervioso, al aparato digestivo y al corazón. Las infecciones crónicas darán como resultado desórdenes neurológicos como por ejemplo la demencia, daño en el músculo cardíaco (miocardiopatía) y algunas veces la dilatación del tracto digestivo (megacolon y megaesófago) así como también puede haber pérdida de

peso. Sin tratamiento, la enfermedad de Chagas puede ser mortal, por lo general debido al componente de miocardiopatía (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; TDR-Home_Page, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

- Epidemiología.

La organización mundial de la salud (OMS) estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 16-18 millones de personas. Unos 100 millones (25% de la población de Latinoamérica) de personas estarían en riesgo de contraer la enfermedad y se estima que cada año mueren 50 mil personas. La enfermedad crónica de Chagas sigue siendo un gran problema de salud en muchos países de América Latina, a pesar de la eficacia de medidas preventivas e higiénicas. (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; TDR-Home_Page, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention).

La enfermedad de Chagas se distribuye por toda América, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina, mayormente en áreas pobres y rurales de Centro y Suramérica. La enfermedad está establecida casi exclusivamente en áreas rurales, donde el insecto transmisor, correspondiente a la subfamilia de los Triatominae, puede reproducirse y alimentarse en su reservorio natural (las más comunes son el armadillo y marsupiales). Dependiendo de las especiales interacciones locales de los vectores y sus hospedadores, otros animales como los animales domésticos como gatos, perros, ratones domésticos y animales salvajes pueden servir también como reservorios. (Chagas_Disease_Alliance, ; Organización_Mundial_de_la_Salud, ; TDR-Home_Page).

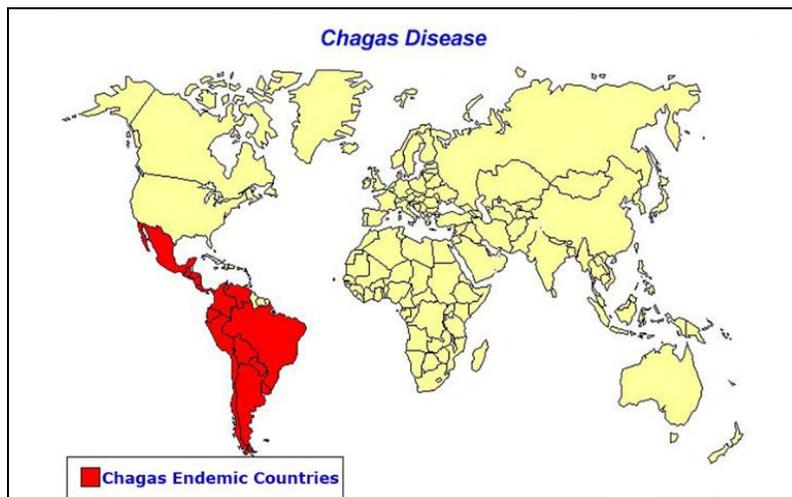


Fig. 1.31: Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas. OMS 2004.

- Diagnostico.

El procedimiento diagnóstico consiste en la demostración directa del agente causal (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; TDR-Home_Page).

Es casi siempre preciso en los resultados y puede ser logrado por:

1. Examen al microscopio, buscando la motilidad del parásito en la sangre no-coagulada del paciente, lo que es posible sólo en la fase aguda.
2. En el diagnóstico basado en la detección indirecta del organismo por xenodiagnóstico.
3. Detección del ADN del parásito por PCR.
4. Varias pruebas inmunológicas. Detección de anticuerpos específicos contra el parásito en la sangre.
 - Fijación del complemento
 - Hemoaglutinación indirecta
 - ELISA
 - Aglutinación directa
 - Aglutinación de partículas

- Tratamiento

La medicación para la enfermedad de Chagas es generalmente eficaz cuando se administra durante la etapa aguda de la infección. Las drogas de la opción son azoles o nitroderivados tales como benzonidazol o nifurtimox. Se ha informado que estas drogas curan completamente y disminuyen la probabilidad de cronicidad en más de un 90% de los casos, pero desafortunadamente, la resistencia a las mismas y a es un hecho registrado. Además, estos agentes son altamente tóxicos y poseen considerables efectos nocivos. (TDR-Home_Page, ; Centers_for_Disease_Control_and_Prevention). En la etapa crónica, no existe de una quimioterapia antiparasitaria eficaz, por lo que sólo se realizan cuidados paliativos, mejorando las sintomatologías manifestadas por los pacientes (Organización_Mundial_de_la_Salud, ; TDR-Home_Page).

El genoma de *T. cruzi* (así como el de otros tripanosomátidos) ha sido secuenciado recientemente (El-Sayed y col., 2005), siendo así un logro de gran ayuda para la identificación de posibles blancos moleculares para el diseño racional de nuevas drogas terapéuticas que sean eficientes y seguras para el tratamiento de estas afecciones. Esto,

sumado a la implementación de planes de educación y prevención, de saneamiento y erradicación de los diferentes vectores permitirá desarrollar armas importantes en la lucha contra este flagelo que acecha a toda Latinoamérica.

- Metabolismo redox dependiente de tioles en *T. cruzi*.

El metabolismo redox de *T. cruzi* (así como de otros tripanosomátidos) es único, ya que se basa principalmente en el tripanotión. Este parásito carece tanto de catalasa, como de glutatión peroxidasa del tipo selenoenzima y de GR. El sistema dependiente del tripanotión protege al parásito contra el daño oxidativo, intoxicación por metales pesados y provee equivalentes de reducción para la síntesis de desoxirribonucleótidos (Flohe y col., 1999; Krauth-Siegel y col., 2003b; Muller y col., 2003; Mehlotra, 2004; Jaeger y col., 2006; Krauth-Siegel y col., 2008b). El tripanotión es sintetizado a partir de la conjugación de una molécula de espermidina con dos moléculas de glutatión, mediante la acción en una enzima, la TS. Se ha observado que la TS de *T. cruzi* puede aceptar otras poliaminas como sustratos, lo cual es de importancia bajo condiciones en donde la espermidina puede ser limitante (Oza y col., 2002). El rol central del tripanotión sobre la viabilidad, virulencia y defensa contra el estrés oxidativo en tripanosomátidos ha sido demostrado mediante ensayos de “knock-down” de la TR (enzima encargada de regenerar específicamente el TS₂ a T(SH)₂ a expensas del NADPH) y mediante ensayos de ARN de interferencia sobre la TS en *T. brucei* (Tovar y col., 1998; Comini y col., 2004).

Esta función crítica del tripanotión es entendida mejor si se considera su multifacética participación en el metabolismo redox, que es esquematizada en la Fig. 1.33. Este tiol provee equivalentes de reducción a las TXN, las cuales son oxidorreductasas multipropósitos relacionadas a la TRX (Flohe y col., 1999). Las TXN son sustratos reductores específicos para diversos tipos de Prx encontradas en el parásito: una del tipo de 2CysPrx típica, la TXNPx (Flohe y col., 2002), y a una proteína homóloga a glutatión peroxidasa, GPxI (que poseen Cys en lugar de SeCys en su sitio activo) (Wilkinson y col., 2002a). En la vía de detoxificación de peróxidos, el flujo de equivalentes de reducción parte desde el tripanotión hacia la TXN y finalmente a los hidroperóxidos, mediante alguna de las Prx. Esta única vía de detoxificación de peróxidos es conservada en todas las especies de tripanosomátidos, reemplazando al sistema del glutatión característico de los hospederos mamíferos (Mehlotra, 2004; Irigoín y col., 2008; Krauth-Siegel y col., 2008b). Se

ha descrito la existencia en este parásito de una Prx homóloga a las fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasas (GPxII), residente en retículo endoplasmático liso, la cual sólo acepta equivalentes de reducción del GSH (Wilkinson y col., 2002c). Se postula que la función de esta enzima es la protección contra la peroxidación lipídica en una organela clave en la síntesis de fosfolípidos.

Como se muestra en la Fig. 1.33, la regeneración del GSH a partir del GSSG en tripanosomátidos puede ocurrir por reducción directa con el T(SH)₂ (Krauth-Siegel y col., 2003b) o por medio de la actividad transhidrogenasa de una proteína únicamente descrita en *T. cruzi*, la TcP52 (Moutiez y col., 1995). Esta última enzima cataliza la reducción de GSSG a expensas de T(SH)₂ reconstituyendo el GSH. También se ha descrito en *T. cruzi* la existencia de un ascorbato peroxidasa similar a la de plantas, que es un tipo de hemoperoxidasa ubicadas en el retículo endoplasmático del parásito, las cuales emplean los equivalentes de reducción del ascorbato para la reducción de hidropéroxidos (Wilkinson y col., 2002b). La regeneración del ascorbato se lleva a cabo por la reducción no enzimática del dehidroascorbato por tripanotión (Krauth-Siegel y col., 2003b). Hasta el momento, no se ha descrito la existencia de alguna TRXR en *T. cruzi*, pero se ha demostrado que posee una TRX típica (Piattoni y col., 2006), pero cuya participación funcional no han sido completamente elucidada hasta el momento.

La sensibilidad de los tripanosomátidos al estrés oxidativo y la ausencia del metabolismo del tripanotión en hospedadores mamíferos, hace a las enzimas del metabolismo redox en estos protozoos excelentes blancos para el diseño racional de nuevas drogas tripanocidas (Flohe y col., 1999; Krauth-Siegel y col., 2003b; Muller y col., 2003; Mehlotra, 2004; Jaeger y col., 2006; Krauth-Siegel y col., 2008b). En la Fig. 1.32 se esquematiza las diferentes funciones metabólicas del tripanotión; mientras que la distribución subcelular de las enzimas que participan en el metabolismo redox se muestra en la Fig. 1.33.

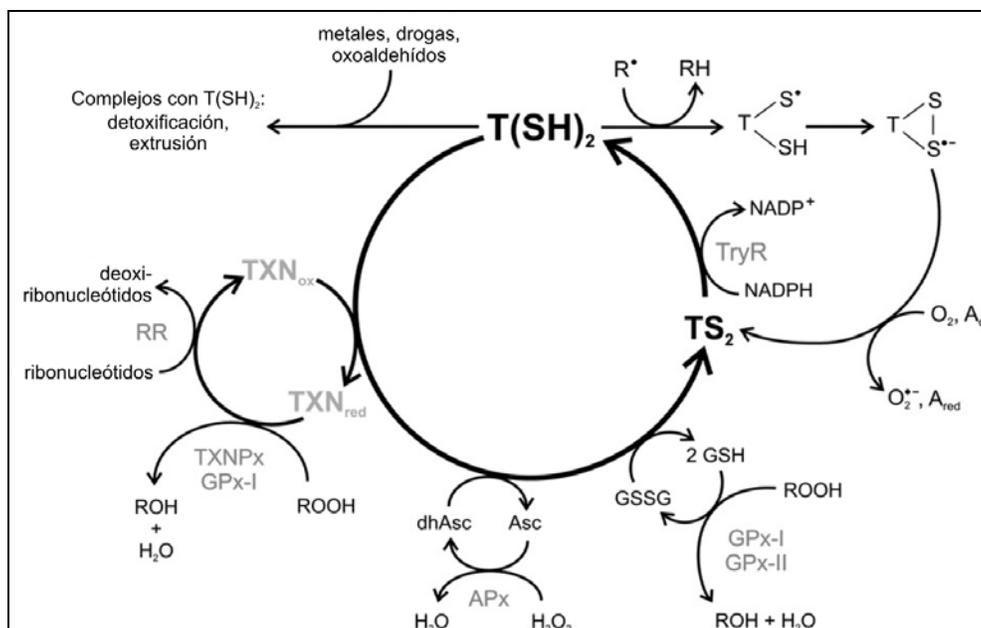


Fig. 1.32: Reacciones dependientes de tripanotión. El tripanotión es mantenido en forma reducida a expensas del NADPH, en una reacción catalizada por tripanotión reductasa (TryR). El T(SH)₂ reduce directamente a TXN, al dehidroascorbato (dhAsc) para formar ascorbato (Asc), al GSSG para formar GSH. Vía estos intermediarios, el T(SH)₂ participa en la síntesis de deoxirribonucleótidos y en la descomposición de peróxidos. El T(SH)₂ puede interactuar directamente con varios compuestos electrófilos en la detoxificación de oxoaldehídos, metales, y drogas. También, el T(SH)₂ puede reaccionar con radicales libres (RU) en reacciones de detoxificación y de reparación. RR, ribonucleotido reductasa; ROOH, hidroperóxidos; A, oxidante de un-electrón; TXNPx, triparredoxina peroxidasa; GPxI, GPxII, glutatión peroxidasa; APx, ascorbato peroxidasa. Fig. tomada de Irigoín y col. 2008.

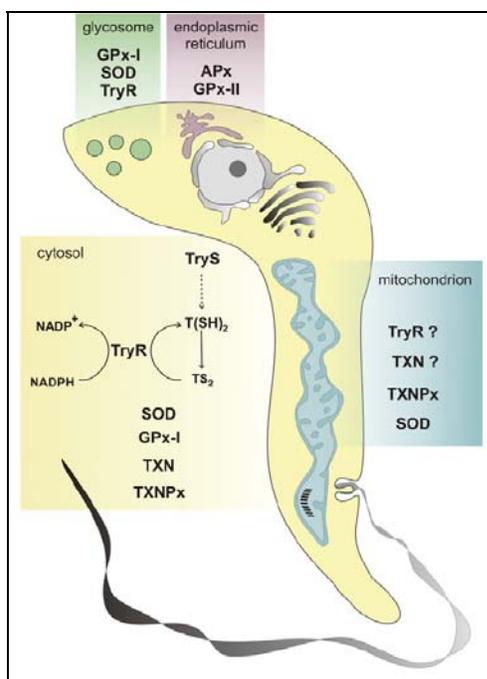


Fig. 1.33: Distribución subcelular de enzimas involucradas en el metabolismo redox. Una representación esquemática de un epimastigote de *T. cruzi* muestra la localización de las diferentes enzimas involucradas en el metabolismo redox. Amarillo, citosol; verde, glucosoma; púrpura, retículo endoplasmático; celeste, mitocondria. TryS, tripanotión sintetasa; TryR, tripanotión reductasa; TXN, triparredoxina; TXNPx, triparredoxina peroxidasa; GPxI y GPxII, glutatión peroxidasa; APx, ascorbato peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa. Imagen tomada de Irigoín y col. 2008.

1.7.4. El enclave evolutivo de los protistas.

En el proceso evolutivo que condujo a la aparición de los eucariotas con capacidades de respirar y/o fotosintéticos comienza con la captura endosimbiótica de una célula procariota primitiva (bacteriana o cianobacteria, respectivamente) por parte de un eucariota heterotrófico. De esto derivan organelas como las mitocondrias y los llamados plástidos primarios (fotosintéticos) encontrados en algas verdes y rojas y en plantas (Rogers y col., 2004). En este proceso evolutivo, las algas, algunos protozoos y las diatomeas ocupan una posición de relevancia. En este sentido, las diatomeas son producto de lo que se conoce como endosimbiosis secundaria, siendo el resultado de que una célula eucariota haya fagocitado a un eucariota fotosintético, probablemente un alga roja (Armbrust y col., 2004; Bradbury, 2004). La endosimbiosis secundaria también dio lugar a otra serie de organismos y a determinar relaciones evolutivas estrechas entre células autótrofas y heterótrofas. Así, por ejemplo, las algas verdes euglenoides son producto de una endosimbiosis secundaria y están relacionadas con tripanosomátidos que sufrieron un similar proceso pero que a continuación perdieron el cloroplasto, aunque mantuvieron un número importante de enzimas relacionadas con el metabolismo fotosintético del carbono (Hannaert y col., 2003; Martin y col., 2003).

Estas variaciones en el proceso evolutivo hacen que en los diferentes organismos se encuentren enzimas que catalizan reacciones similares pero que están reguladas según el contexto metabólico particular al cual son funcionales. A partir de esto, es de importancia estudiar las relaciones de estructura proteica a función y regulación de estas proteínas. Es por ello que es relevante la realización de estudios comparativos de las rutas metabólicas y de las propiedades de las proteínas involucradas entre los mismos. En este sentido, el metabolismo de óxido-reducción (redox) es uno particularmente importante para su caracterización entre estos organismos ubicados en un enclave evolutivo. Más arriba en esta introducción se resaltó la importancia de este metabolismo para la fisiología y la capacidad de respuesta a estrés en diferentes organismos. El estudio del metabolismo redox resulta de potencial relevancia en protozoos (en los cuales ha sido caracterizado en forma parcial o relativamente escasa, según el microorganismo), ya sea para una aplicación/mejora biotecnológica (en el caso de *P. tricornutum*) o de utilidad para el diseño racional de nuevos agentes terapéuticos (en el caso de *E. histolytica* o *T. cruzi*).

2. OBJETIVOS.

- **Objetivo general:**

Realizar estudios a nivel del metabolismo redox, en la identificación de los sistemas tiorredoxina y dependientes del glutatión y tripanotión en protozoos, específicamente en *Entamoeba histolytica*, *Phaeodactylum tricornutum*, y *Trypanosoma cruzi* a fin de hacer un análisis funcional de las proteínas involucradas en estos organismos.

- **Objetivos específicos:**

1. Identificación, clonado, expresión recombinante y caracterización funcional de componentes del sistema tiorredoxina en *E. histolytica*.
2. Identificación y caracterización de componentes del metabolismo redox dependiente de tioles en *P. tricornutum*.
3. Identificación de las enzimas relacionadas a la reparación del daño oxidativo de proteínas en *T. cruzi*. Caracterización funcional del sistema metionina sulfóxido reductasa.
4. Avanzar sobre el conocimiento de la genómica y proteómica de *E. histolytica*, *P. tricornutum* y *T. cruzi* para comenzar a establecer nuevas líneas de estudio de sus metabolómicas.

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 Fermentas. Los materiales para purificación de proteínas fueron adquiridos de la firma GE Healthcare. Todos los demás reactivos químicos empleados fueron de las más altas calidades comercialmente disponibles (Sigma-Adrich, Merck o similares). Los aceites esenciales de peperina (*Bystropogon mollis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) se extrajeron mediante destilación por arrastre con vapor (Bandoni, 2000).

3.2. Cepas de protozoos y procedimiento de cultivo.

- *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente en el Laboratorio del Dr. Hugo Luján (INIMEC, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina) a 36,5 °C en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino de adulto inactivado por calentamiento al 12 % (v/v) y complejo vitamínico de Diamond al 2 % (p/v) (Diamond y col., 1978).

- *Phaeodactylum tricornutum*

Las células de *P. tricornutum* fueron cultivadas bajo condiciones autotróficas, con iluminación ($92 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en un medio de cultivo a base de agua de mar artificial (Armbrust y col., 2004) a 22 °C con aireación. Las células fueron provistas por el Dr. Alejandro Beccaria (Laboratorio de Fermentaciones - Facultad de Bioquímica y Ciencias biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina).

- *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 $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ y suero fetal bovino al 10%, como se describió anteriormente (Gomez y col., 1989). Los tripomastigotes metacíclicos fueron obtenidos por cultivo axénico bajo condiciones de diferenciación espontánea de epimastigotes (Allaoui y col., 1999). Las células de *T. cruzi* amastigotes se obtuvieron mediante la infección de monocapas de células Vero con tripomastigotes metacíclicos, como se describió anteriormente (Andrews y col., 1982). Las células fueron suministradas por el Bioq. César Gutiérrez (Laboratorio de Bioquímica Microbiana - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina).

3.3. Cepas bacterianas, plásmidos y procedimiento de cultivo.

3.3.1. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de esta tesis 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) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG
- ✓ *E. coli* **JM109 F'** (Stratagene): [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]/recA1 endA1 gyrA96 (Nal¹)thi hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac-proAB) mcrA
- ✓ *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)

3.3.2. Plásmidos utilizados.

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

Plásmido	Características	Referencia
pGEM®-T Easy	Vector de clonado (3,0 kb) para productos de PCR, alfa complementación, resistencia a ampicilina.	Invitrogen
pRSET-A	Vector de expresión (2,9 kb) inducible por IPTG, promotor T7, fusión a cola de histidina en N-terminal, resistencia a ampicilina.	Invitrogen
pMAL-C2	Vector de expresión (6,0 kb) inducible por IPTG, promotor Lac, fusión a MBP en N-terminal, resistencia a ampicilina.	New England - Biolabs
pG-KJE8	Vector (11,1 kb) para coexpresión de chaperoninas moleculares (dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL) inducible por tetraciclina y arabinosa, promotor <i>araB</i> y <i>Pzt1</i> , resistencia a cloranfenicol.	Takara

Tabla 3.1: Plásmidos empleados para el clonado y expresión en sistemas procariotas.

3.3.3. Cultivo de *Escherichia coli*.

Las células de *E. coli* TOP10 F' fueron utilizadas para mantenimiento y replicación de plásmidos. Las cepas BL21 (DE3), JM109 y Rosetta (DE3) se emplearon para la expresión de las proteínas recombinantes. Las células fueron cultivadas a 25-37 °C en medio LB o LB-Glc o TB, según el experimento realizado, con agitación a 180 rpm. Para la selección de las bacterias que portaban plásmidos, se cultivaron en presencia de ampicilina 100 µg ml⁻¹ o kanamicina 50 µg ml⁻¹ o cloranfenicol 34 µg ml⁻¹, según el caso. Para almacenamientos de corto tiempo, las bacterias transformadas se conservaban en placas con medio LB-agar a 4 °C por un mes. Para tiempos mayores, los cultivos líquidos se suplementaron con glicerol al 50 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

La composición de los medios se detalla a continuación:

- Medio Luria-Bertani (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 se le adicionó 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).

3.4. Métodos utilizados en biología molecular.

Varios de los métodos de biología molecular empleados en este trabajo fueron acorde a lo descrito por Maniatis y Sambrook (Maniatis y col., 1982; Sambrook y col., 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., 1982) a partir de células de trofozoitos 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., 1982) a partir de células 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 (Invitrogen), MgCl₂ 3 mM (Invitrogen) y PCR *buffer* 1X (Invitrogen), dNTP 0,4 mM de cada uno (Promega), cebadores 1 μM de cada uno, como templados se utilizo ADN genómico o ADN plasmídico, según sea el caso, y agua estéril para completar un volumen de reacción de 20-50 μl finales.

El programa utilizado en las PCR fue:

- ✓ 95 °C durante 10 min
 - ✓ 95 °C durante 1 min
 - ✓ *T_m* durante 1 min
 - ✓ 72 °C durante 1 min
 - ✓ 72 °C durante 10 min
-) 30 ciclos

y se corrió en un termociclador Eppendorf Mastercycler[®] gradient.

3.4.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos desalados y liofilizados utilizados en este estudio fueron sintetizados por Sigma, por pedido realizado a partir del diseño de los mismos en nuestro laboratorio. En la Tabla 3.2 se detallan las secuencias de los mismos.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción	T _m (°C)
EhTRXR Fow	GGATCC ATGAGTAATATTCATGATGT	<i>Bam</i> HI	63
EhTRXR Rev	AAGCTTATGAGTTTGAAGCCATTTTC	<i>Hind</i> III	69
EhTRX6 Fow	GGATCC ATGTCAAACCTCAGTTCATTA	<i>Bam</i> HI	67
EhTRX6 Rev	AAGCTT GAGATGGG AAAATTCATATT	<i>Hind</i> III	67
EhTRX8 Fow	GGATCC ATGGCTGTACTTCATATTAAC	<i>Bam</i> HI	65
EhTRX8 Rev	AAGCTTTATGCTGTTTCAACCATTG	<i>Hind</i> III	67
EhTRX41 Fow	GGATCC ATGTCTCTTATTCATTTAAATTC	<i>Bam</i> HI	64
EhTRX41 Rev	AAGCTTTTATTGAAAAGCAGCCAC	<i>Hind</i> III	68
EhTRX111 Fow	GGATCC ATGTCTGTAGAACATATCAAC	<i>Bam</i> HI	64
EhTRX111 Rev	AAGCTTTTAGTTTATTACTTTC	<i>Hind</i> III	50
Eh2CysPrx Fow	GGATCC ATGTCTTGCAATCAACAAAAAG	<i>Bam</i> HI	75
Eh2CysPrx Rev	AAGCTTTTAATGTGCTGTAAATATT	<i>Hind</i> III	62
TcPMSR10 Fow	GGATCC ATGGCTTCTGGTGTCCAGCG	<i>Bam</i> HI	79
TcPMSR180 Fow	GGATCC ATGGCTTCTGGTGTCCAGCG	<i>Bam</i> HI	79
TcPMSR Rev	AAGCTTTT CACCAATGAATTCGGT GCG	<i>Hind</i> III	74
TcTXNIC43S Fow	GGTGCCCGCC CAGCGCGGCTTC	---	87
TcTXNIC43S Rev	GAAGCCGCGGCTGGGCGGGCACC	---	87

Tabla 3.2: Secuencia de oligonucleótidos empleados como cebadores. En negrita se muestran los sitios de restricción especificados o nucleótidos que no hibridan en el molde original.

3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN fueron resueltos electroforéticamente en geles de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (TRIS 40 mM pH 8,0; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM) con la adición de bromuro de etidio a una concentración final de 0,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, utilizando el sistema Mini-Sub[®] Cell GT (Bio-Rad). La visualización de los fragmentos se realizó bajo luz UV (310 nm) del transiluminador Fotodyne.

3.4.5. Purificación de ADN del gel de agarosa.

Para la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema comercial *Wizard[®] Plus PCR Preps DNA Purification System* (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

3.4.6. Precipitación de ADN.

Para la precipitación de ADN se agregó a las soluciones que lo contenían 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4,8) y 2 Vol de etanol absoluto, se mezclaron suavemente y se incubaron a -20 °C por 30 min. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm a 4 °C por 15 min. El ADN precipitado se resuspendió en agua desionizada estéril.

3.4.7. Minipreparación de ADN plasmídico.

Para realizar extracción de ADN plasmídico se usó el equipo comercial *Wizard[®] Plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad y cantidad de ADN plasmídico se verificó electroforéticamente en geles de agarosa al 1% (p/v). El plásmido recuperado se conservó a -20 °C hasta su utilización.

3.4.8. Digestión enzimática del ADN.

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo a 37 °C durante 3 h, utilizando enzimas de restricción comerciales (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.9. Ligación de los fragmentos de ADN.

Para la reacción de ligación se empleó 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 15 μl . Los volúmenes de inserto y vector se ajustaron de manera de lograr una

relación molar de 3:1, respectivamente. Se incubó la mezcla de ligación a 16 °C durante toda la noche.

3.4.10. Secuenciación del ADN.

Secuenciación nucleotídica automática del ADN fue llevada a cabo por MacroGen (Corea del sur).

3.4.11. Transformación de *E. coli* por el método de CaCl₂.

Las bacterias se cultivaron toda la noche en agitación, a 37 °C, en medio LB. Luego el cultivo fue diluido 1/100 en medio fresco, y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0,5 - 0,6. Las bacterias se colocaron en hielo por 10 min y se centrifugaron a 4 °C, 4000 rpm por 10 min. Luego se resuspendieron las células en la mitad del volumen original con la solución de CaCl₂ (CaCl₂ 100 mM; MOPS 10 mM pH 5,6-7,0), estéril y fría. La suspensión se mantuvo en hielo por 30 min y se procedió a la centrifugación en iguales condiciones que la anterior. Luego se resuspendió el paquete celular en un volumen 1/15 del original con la misma solución de CaCl₂.

A 100 µl de una suspensión de bacterias competentes se le agregaron 2 µl de ADN plasmídico y se incubó en hielo durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron a 42 °C durante 30 s y en hielo durante 2 min. Seguidamente, las células se diluyeron en 800 µl de medio LB-Glc, se incubaron durante 1 h a 37 °C y se sembraron en placas de Petri que contenían medio LB-Agar suplementado con ampicilina o kanamicina o cloranfenicol (100 µg ml⁻¹, 50 µg ml⁻¹, 34 µg ml⁻¹, respectivamente), según la cepa bacteriana que utilizada. Estas placas se incubaron toda la noche, a 37 °C, hasta la visualización de colonias.

3.4.12. Mutagénesis sitio dirigida.

La generación de proteínas con mutaciones sitio-dirigidas se llevó a cabo por adaptación del protocolo del equipo comercial *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Brevemente, se diseñaron dos oligonucleótidos cebadores totalmente complementarios entre sí, conteniendo la base a ser mutada en el centro de dichos oligonucleótidos (Tabla 3.2). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como molde 10 ng de plásmido purificado a partir de bacterias con capacidad de metilar el ADN,

125 ng de cada uno de los oligonucleótidos cebadores, 0,2 mM de cada uno de los dNTP, y 2,5 U de *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas), en el medio de reacción específico para la enzima. Una vez finalizada la PCR, el producto de reacción se trata durante 3 h a 37 °C con 10 U de *DpnI* (Fermentas), la cual posee la capacidad de degradar el ADN metilado del plásmido parental, no mutado. Posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 F' con el producto anterior y luego se seleccionaron clones con la construcción recombinante para corroborar la presencia de la mutación mediante secuenciación.

3.5. Métodos bioquímicos.

3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando como soporte geles discontinuos de poliacrilamida al 10-15% y el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM en TRIS-HCl 50 mM pH 6,8 y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. En caso de realizar SDS-PAGE no reductor, se omite la presencia del agente reductor y el calentamiento en el tratamiento de la muestra. Terminada la corrida, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con Coomassie brilliant blue R-250.

3.5.2. Preparación de antisueros

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

3.5.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección.

Realizada la SDS-PAGE, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Sigma). Ésta se llevó a cabo durante 45 min a 180 mA en un equipo de Mini

Protean II (Bio-rad) que contenía solución de transferencia 1X [TRIS base 0,025 M pH 8,3, glicina 0,192 M, metanol 20% (v/v)]. La membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con una solución de TBS (TRIS-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) más leche descremada al 4% (p/v), incubándose 1 h a 37 °C. Luego, se incubó con anticuerpos primarios de conejo en dilución adecuada, durante 1 h a 30 °C. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-IgG totales de conejo, Sigma) en dilución 1/5000 y se incubó 1 h a 30 °C. Los lavados entre las incubaciones se realizaron con solución de TBS más Tween 20 al 0,1% (v/v) y las diluciones de los anticuerpos con solución TBS suplementada de leche descremada al 1% (p/v). La reacción de revelado se llevó a cabo mediante dos formas: 1) por la adición de una solución de TBS adicionada de DAB 0,05% (p/v) y H₂O₂ 10 volúmenes 0,01% (v/v), dejándose reaccionar hasta aparición de señal, en oscuridad a temperatura ambiente, 2) empleando el reactivo de detección ECL *Western blotting Substrate* (PerkinElmer).

3.5.4. Cuantificación de proteínas totales.

La cuantificación de la proteínas totales se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando patrones de BSA (Sigma). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis METROLAB 325 BD.

3.5.5. Desalado y cambio de medio de solución de proteínas.

El medio de las soluciones proteicas fue cambiado por filtración por geles empleando una *HiTrap™ Desalting Column* (GE), siguiendo indicaciones del fabricante.

3.5.6. Concentración de soluciones de proteínas.

Para la concentración de soluciones proteicas, se emplearon dispositivos de ultrafiltración Amicon (Millipore), de apropiado MWCO para cada proteína, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

3.5.7. Preparación de S-nitrosotioles.

Los S-nitrosotioles fueron preparados según el método descrito anteriormente (Gordge y col., 1998). Brevemente, GSH 100 mM o cisteína 100 mM y NaNO₂ 100 mM fueron incubados en presencia de HCl 20 mM en hielo por 30 min, luego fueron

estabilizados por la adición de EDTA 1 mM. Los compuestos se prepararon frescos cada día de uso y fueron almacenados en hielo y en oscuridad hasta su empleo. La concentración de *S*-nitrosotioles fue estimada mediante sus coeficientes de extinción molar a 334 nm, GSNO 0,85 mM⁻¹·cm⁻¹ y CySNO 0,74 mM⁻¹·cm⁻¹, en un espectrofotómetro UV-Vis METROLAB 325 BD.

3.6. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

3.6.1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes.

Las bacterias de *E. coli* recombinantes se cultivaron en medio TB líquido suplementado con ampicilina o kanamicina y/o cloranfenicol, según el experimento realizado, durante toda la noche a 37 °C en agitación (180 rpm). Este cultivo se diluyó 1/100 con medio fresco suplementado con antibiótico y se incubó a 37 °C, con agitación a 180 rpm. En el caso de utilizar el sistema de coexpresión de chaperonas moleculares se adicionó tetraciclina 5 ng ml⁻¹ y arabinosa al 0,02 % (p/v) para su inducción. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ de 0,5 - 0,6, se procedió a la inducción de la expresión de la proteína mediante el agregado de IPTG 0,1-0,5 mM y se continuó con la incubación a 25 °C, durante 3-16 h. El tiempo de inducción se ajustó de forma de optimizar la expresión de cada proteína recombinante (ver Tabla 3.3). Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se guardaron los paquetes celulares a -20 °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 con la solución apropiada para purificación u otras finalidades. La ruptura celular fue llevada a cabo usando un procesador ultrasónico de alta intensidad Vibra-cell™ VCX-600 (Sonics & Materials Inc.) con pulsos de 30 s durante una sesión de 3-10 min en baño de hielo. Los lisados celulares se centrifugaron a 4 °C y 13000 rpm durante 15-30 min, con el fin de separar fracciones solubles e insolubles. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la purificación de la proteína de interés, o almacenado a -20 °C para posteriores análisis.

3.6.3. Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.

Para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a etiquetas de polihistidinas se utilizó una matriz Co^{2+} -IDA-Agarosa (GE). Las células fueron resuspendidas y lisadas en una solución de equilibrado (TRIS-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 300 mM). Luego de la siembra, la columna fue lavada con 10 volúmenes de columna de solución de equilibrado. La elusión se realizó por medio de un gradiente lineal de 0 a 500 mM de imidazol en la misma solución base. Las fracciones que contenían las proteínas de interés se recogieron, se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en solución de almacenamiento [TRIS-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, glicerol al 2 % (v/v), más el agregado de DTT 0,5 mM, según la proteína en estudio].

Proteína recombinante	Fusión	Plásmido	Cepa de <i>E. coli</i>	Tiempo de inducción	Origen
<i>Eh</i> TRXR	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	16 h	<i>E. histolytica</i>
<i>Eh</i> TRX41	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	3 h	<i>E. histolytica</i>
<i>Eh</i> TRX8	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	3 h	<i>E. histolytica</i>
<i>Eh</i> TRX6	poli-His N-term MBP N-term	pRSET-A pMAL-C2	BL21 (DE3) JM190	3 h	<i>E. histolytica</i>
<i>Eh</i> TRX111	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	3 h	<i>E. histolytica</i>
<i>Eh</i> 2CysPrx	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	16 h	<i>E. histolytica</i>
<i>Tc</i> PMSR10	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	4 h	<i>T. cruzi</i>
<i>Tc</i> PMSR180	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	4 h	<i>T. cruzi</i>
<i>Tc</i> TXNI	poli-His N-terminal	pET28a (+)	BL21 (DE3)	4 h	<i>T. cruzi</i>
<i>Tc</i> TXNIC43S	poli-His N-terminal	pET28a (+)	BL21 (DE3)	3 h	<i>T. cruzi</i>
<i>Tc</i> TRX	poli-His N-terminal	pRSET-A	BL21 (DE3)	3 h	<i>T. cruzi</i>
<i>Tc</i> TR	poli-His C-terminal	pET24a (+)	BL21 (DE3)	16 h	<i>T. cruzi</i>
<i>Ec</i> TRX	poli-His N-terminal	pET32-a	BL21 (DE3)	4 h	<i>E. coli</i>

Tabla 3.3: Condiciones de expresión de las proteínas recombinantes.
La inducción de la expresión se realizó con IPTG 0,5 mM.

3.6.4. Cromatografía de afinidad por unión a amilosa.

Para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP) se empleó la matriz amilosa-agarosa (New England Biolabs). El paquete celular fue resuspendido y lisado en solución de equilibrado (TRIS-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 200 mM). El sobrenadante fue sembrado sobre la columna previamente equilibrada con la solución especificada. A continuación se lavó la columna con 15 volúmenes de columna de solución de equilibrado. La elusión de la proteína recombinante se realizó por la adición de maltosa 10 mM en solución de equilibrado. Las fracciones que contenían las proteínas de interés se recogieron, se concentraron por ultrafiltración y almacenaron a -80 °C en solución de almacenamiento [TRIS-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, glicerol al 2 % (v/v) más el agregado de DTT 0,5 mM].

3.6.5. Digestión proteolítica de la proteína de fusión.

La reacción de proteólisis se llevó a cabo en un medio que contenía TRIS-HCl 25 mM pH 7,5; NaCl 10 mM, CaCl₂ 5 mM, 100 µg de proteína de fusión (MBP-*Eh*TRX6) y 1 µg de factor Xa (New England Biolabs®). La reacción se ensayo a 4 y 37 °C, evaluándose a diferentes tiempos de reacción.

3.6.6. Purificación de GR nativa a partir de células de *P. tricornutum*.

Para realizar la purificación de GR nativa se partió de 36 g de células de *P. tricornutum* cultivadas como se describe en el punto 3.2. El paquete celular se resuspendió y se lisó en solución A (TRIS-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). A la fracción soluble obtenida se le realizó un fraccionamiento salino con (NH₄)₂SO₄ al 30-70% de saturación. Al precipitado obtenido de la precipitación al 70% de saturación se la resuspendió en solución A y se dializó contra la misma solución. El extracto dializado se siembra en una columna de DEAE-Sepharosa, previamente equilibrada con solución A. La enzima fue eluida mediante un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl. Las fracciones que contenían actividad GR fueron recogidas, acondicionadas y sembradas en una columna de Blue-A-Sepharosa. La columna fue lavada con 10 volúmenes de solución A y posteriormente se eluyó la enzima por medio de un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl. Las fracciones que contenían actividad GR fueron recogidas, acondicionadas y sembradas en una columna de 2'5'ADP-Agarosa. La columna fue lavada con 10 volúmenes de

solución A y posteriormente se eluyó la enzima por medio de un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl. Las fracciones que contenían actividad GR fueron recogidas, concentradas por ultrafiltración y resueltas en un PAGE nativo preparativo al 6% (p/v) realizado a pH 8,8 a 4 °C con una corriente constante de 30 mA. El revelado se llevo a cabo por medio de la visualización de actividad GR sobre el gel (Montrichard y col., 1999). La GR fue recuperada de la banda que presentaba actividad por electroelusión, concentrada y almacenada a -80 °C en una solución de almacenamiento [TRIS-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM y glicerol al 2 % (v/v)].

3.7. Métodos analíticos.

3.7.1. Estimación de la masa molecular de las proteínas en estudio por PAGE nativo.

La determinación de la masa molecular nativa de las proteínas en estudio se realizó mediante PAGE nativos, 6-10% (p/v), según el método de Ferguson (Ferguson, 1964), utilizando patrones de masa molecular conocida (GE).

3.7.2. Ensayos enzimáticos.

Todos los ensayos fueron realizados a 30 °C, en un volumen final de 250 µl, utilizando el equipo *Multiskan Ascent one-channel vertical light path filter photometer* (Thermo Electron Co.). Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato por min bajo las condiciones especificadas en cada caso.

Las curvas de saturación fueron efectuadas por ensayos de las respectivas actividades enzimáticas a nivel de saturación del sustrato fijo y variando las concentraciones del sustrato variable (entre 7 y 13 puntos). Los datos cinéticos fueron graficados como velocidad inicial ($\mu\text{M min}^{-1}$ o U ml^{-1}) versus la concentración del sustrato (μM o mM). Los parámetros cinéticos fueron adquiridos mediante regresión no lineal a los datos obtenidos según el modelo de Michaelis-Menten utilizando el programa Origin™ 7.0. Los parámetros cinéticos son promedios de un mínimo de tres determinaciones independientes que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de $\pm 10\%$.

En todos los ensayos en donde se haya seguido la oxidación/reducción de NADPH/NADP⁺, se empleó el coeficiente de extinción molar de 6,23 mM⁻¹ cm⁻¹ para la realización de los cálculos, a menos que se indique lo contrario.

3.7.2.1. Determinación de actividad TRX reductasa.

La actividad TRXR se evaluó por monitoreo de la oxidación de NADPH siguiendo la absorbancia a 340 nm. El medio de reacción estaba compuesto por: fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μM; TRX (*Ec*TRX, o *Eh*TRX6, o *Eh*TRX8, o *Eh*TRX41) 20 μM; e insulina bovina 130 μM como aceptor final de electrones. Se preincubó durante 10 min y se inició la reacción por adición de diferentes concentraciones de *Eh*TRXR, en un rango de 0,1 a 2 μM (Coombs y col., 2004). Para la realización de los estudios cinéticos en estado estacionario, los ensayos se realizaron utilizando TRX en un rango de 0,15 a 30 μM y *Eh*TRXR a una concentración final de 0,5 μM.

3.7.2.2. Determinación de la capacidad de reducción de DTNB.

La actividad DTNB reductasa fue ensayada por seguimiento de la producción de TNB, monitoreando la absorbancia a 405 nm. La mezcla de reacción estaba compuesta por fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μM y DTNB 5 mM. La reacción se inició por la adición de *Eh*TRXR en un rango de 0,1 a 2 μM. La actividad enzimática fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar del TNB (13,6 mM⁻¹ cm⁻¹) y considerando que a partir de 1 mol de NADPH se obtienen 2 mol de TNB (Coombs y col., 2004). Los estudios cinéticos se realizaron empleando NADPH en un rango de 1 a 200 μM; DTNB de 0,01 a 10 mM y *Eh*TRXR a una concentración final de 0,1 μM.

3.7.2.3. Determinación de actividad NADPH oxidasa.

La actividad NADPH oxidasa fue determinada utilizando dos métodos: 1) por monitoreo de la oxidación de NADPH, siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm y 2) por seguimiento de la generación de H₂O₂ utilizando el método de punto final del ferritocianato (Chauhan y col., 2001). El medio de reacción estaba compuesto por fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μM. La reacción se inició por la

adición de *Eh*TRXR en un rango de 0,1 a 2 μ M. Para estudios cinéticos, los ensayos se realizaron utilizando NADPH en un rango de 0,5-200 μ M y *Eh*TRXR a una concentración final de 0,5 μ M.

3.7.2.4. Determinación de actividad quinona reductasa.

La capacidad de reducción de quinonas fue ensayada por monitoreo de la oxidación de NADPH, siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm. El medio de reacción estaba compuesto por: fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *Eh*TRXR en un rango de 0,1 a 2 μ M y 2-metil benzoquinona (MBQ) 500 μ M o 2,5 di-*tert*-butil benzoquinona (DTBBQ) 30 μ M (Cenas y col., 2004). La reacción se inició por adición de las quinonas. Los ensayos cinéticos se realizaron de forma similar, empleando NADPH 300 μ M, *Eh*TRXR 0,1 μ M y MBQ en un rango de 7 a 500 μ M o DTBBQ desde 0,625 a 40 μ M.

3.7.2.5. Ensayo de reducción de S-nitrosotioles.

Los ensayos de reducción de S-nitrosotioles se realizaron mediante el seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm. El medio de reacción se componía de fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *Eh*TRXR en un rango de 0,1 a 2 μ M y S-nitrosotioles (GSNO o CySNO) a concentración final de 1 mM. Los ensayos cinéticos se realizaron cubriendo un rango de 20 a 2000 μ M tanto de GSNO como de CySNO empleando *Eh*TRXR a una concentración final de 0,1 μ M y NADPH 300 μ M. La reacción se inició por la adición de los S-nitrosotioles.

3.7.2.6. Ensayo de actividad diaforasa por reducción de compuestos policíclicos.

La actividad diaforasa se evaluó por medio del monitoreo de la oxidación de NADPH a 340 nm en presencia de azul de metileno (MB) o eosina B (EB). Los ensayos cinéticos en estado estacionario se realizaron en un medio de reacción compuesto por fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *Eh*TRXR 0,1 μ M y MB en un rango de concentraciones de 0,94 a 60 μ M o EB de 0,94 a 1000 μ M. Dos tipos de controles negativos se realizaron en condiciones equivalentes, a uno se le omitió la adición de la enzima, mientras que al otro no se le agregó MB/EB a las mezclas de reacción. El

proceso de autooxidación del leuco azul de metileno (leucoMB) fue observado mediante el seguimiento de la absorbancia a 630 nm, donde el MB posee un coeficiente de extinción molar de $41,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buchholz y col., 2008a).

3.7.2.7. Estudios de inhibición de actividad DTNB reductasa.

Los ensayos de inhibición de la actividad disulfuro reductasa de *EhTRXR* se llevaron a cabo utilizando DTNB (sustrato disulfuro modelo), siguiendo su reducción a 405 nm. El medio de reacción se componía de fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μM ; DTNB en un rango de 0,5 a 5 mM y diferentes concentraciones del inhibidor en estudio. La reacción se inició por la adición de la enzima a concentración final de 0,1 μM . En la tabla 3.4 se detallan los inhibidores evaluados en este estudio.

Inhibidor	Rango de concentraciones evaluado	Característica
NADP ⁺	15-1000 μM	Producto de la reacción
MBQ	7-500 μM	Quinona
DTBBQ	0,6-40 μM	
Cu ²⁺	0,6-1000 μM	Metal pesado
Zn ²⁺		
MB	1-100 μM	Sustrato subversivo
EB	1-500 μM	
AE tomillo	0,6-60 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Aceite esencial
AE peperina		

Tabla 3.4: inhibidores ensayados para la actividad DTNB reductasa de *EhTRXR*.

3.7.2.8. Ensayo de actividad TRX.

La actividad biológica de las TRX fue determinada según el método descrito por Holmgren (Holmgren, 1979), mediante el seguimiento de la reducción de insulina bovina a 630 nm. Este método se basa en la capacidad de las TRX previamente reducidas con DTT de reducir los puentes disulfuros de la insulina bovina, resultando en la precipitación de la cadena β de ésta y por ende un aumento en la turbidez del medio. La

mezcla de reacción se componía de fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 1 mM; DTT 0,5 mM; insulina bovina 0,13 mM y diferentes concentraciones de la TRX en estudio, desde 1 a 9 μ M. Controles negativos se realizaron por omisión del agregado de TRX a la mezcla de reacción.

3.7.2.9. Determinación de actividad disulfuro reductasa del sistema TRX.

La reducción de sustratos disulfuros (RSSR) por el sistema TRX de *E. histolytica* fue seguido por medio de un ensayo acoplado compuesto de dos reacciones. En la primera reacción, *Eh*TRX6 o *Eh*TRX8 o *Eh*TRX41 es reducida por *Eh*TRXR a expensas del NADPH, luego en la segunda reacción el sustrato disulfuro en estudio es reducido por la respectiva TRX-(SH)₂. Bajo condiciones de estado estacionario, la velocidad de reducción de TRX-S₂ por *Eh*TRXR es igual a la velocidad de reducción de RSSR por TRX-(SH)₂, siendo la reducción de 1 mol de RSSR proporcional a la oxidación de 1 mol de NADPH (Cheng y col., 2007). En este ensayo la actividad disulfuro reductasa fue determinada por monitoreo de la oxidación del NADPH a 340 nm en una mezcla de reacción que contenía fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *Eh*TRXR 1 μ M; *Eh*TRX (*Eh*TRX6, o *Eh*TRX8, o *Eh*TRX41) en un rango de concentraciones de 2,5 a 10 μ M; y diferentes concentraciones de los sustratos disulfuros en estudio: insulina bovina desde 12 a 350 μ M ó cistina entre 62 y 2000 μ M ó GSSG desde 62 a 2000 μ M ó TS₂ entre 25 y 400 μ M. La reacción se inició por adición del RSSR.

3.7.2.10. Determinación de actividad TRXPx.

La actividad TRX-peroxidasa de *Eh*2CysPrx fue medida por seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm, mediante una reacción acoplada de regeneración de TRX-(SH)₂ a expensas del NADPH por *Eh*TRXR (Coombs y col., 2004). La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *Eh*TRXR 2 μ M; TRX (*Ec*TRX, o *Eh*TRX6, o *Eh*TRX8, o *Eh*TRX41) 20 μ M; *Eh*2CysPrx en un rango de concentraciones de 0,25 a 1 μ M y *t*-bOOH 500 μ M. La reacción se inició por adición del peróxido. Los estudios cinéticos en estado estacionario se realizaron utilizando *t*-bOOH en un rango de 7 a 500 μ M; TRX entre 1,5 a 30 μ M y *Eh*2CysPrx 0,5 μ M.

3.7.2.11. Determinación de actividad GPx.

La actividad GPx de *Eh2CysPrx* fue medida por seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm, mediante un ensayo acoplado de regeneración de GSH a expensas del NADPH por GR (Wendel, 1981). La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; GR de *Saccharomyces cerevisiae* comercial 1 U ml⁻¹; GSH 3 mM; *Eh2CysPrx* desde 0,25 a 2 μ M y *t*-bOOH 500 μ M. La reacción se inició por adición de *t*-bOOH.

3.7.2.12. Determinación de actividad GR.

La determinación de actividad GR se realizó por monitoreo de la oxidación de NADPH a 340 nm, en un medio de reacción que contenía TRIS-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; GSSG 1 mM y diluciones apropiadas de extractos crudos o de enzima purificada (Shigeoka y col., 1987). Las reacciones se iniciaron por adición de GSSG. Los ensayos cinéticos se realizaron cubriendo un rango de NADPH desde 1,5 a 500 μ M y GSSG desde 7 a 1000 μ M con *PtGR* purificada a una concentración final de 4 nM.

3.7.2.13. Determinación de actividad TR.

La determinación de actividad de TR se realizó por monitoreo de la oxidación de NADPH a 340 nm, en un medio de reacción que contenía TRIS-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M y diluciones apropiadas de extractos crudos como de enzima purificada. La reacción se inició por adición de TS₂ a concentración final de 250 μ M (Krauth-Siegel y col., 1987).

3.7.2.14. Determinación de actividad cistina reductasa.

La determinación de actividad de cistina reductasa se realizó siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm, en un medio de reacción que contenía TRIS-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M y diluciones apropiadas de extractos crudos como de enzima purificada (Scott y col., 1963). Para el inicio de la reacción enzimática se adicionó a la mezcla de reacción cistina a concentración final de 1 mM.

3.7.2.15. Determinación de actividad dihidrolipoamida deshidrogenasa.

La determinación de actividad de dihidrolipoamida deshidrogenasa se realizó mediante el monitoreo de la oxidación de NADH a 340 nm, en un medio de reacción que contenía TRIS-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2 mM; NADH 300 μ M; lipoamida 1 mM. La reacción se inició por adición de diluciones apropiadas de extractos crudos o de enzima purificada (Scott y col., 1963).

3.7.2.16. Estudios de inhibición de actividad GR por metales pesados.

Los ensayos de inhibición de la actividad de la GR fueron evaluados por medio del seguimiento de la oxidación del NADPH a 340 nm. El medio de reacción se componía de TRIS-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *PtGR* 4 nM y cationes de metales pesados (Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Ni^{2+} y Co^{2+}) en un rango de concentraciones de 2 a 2000 μ M. La reacción enzimática se inició por adición de GSSG a concentración final de 1 mM.

3.7.2.17. Ensayos de reducción de GSNO.

Los ensayos de reducción de GSNO se realizaron mediante el seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm. El medio de reacción se componía de TRIS-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *PtGR* 4 nM. Las reacciones se iniciaron por adición de GSNO en un rango de concentraciones de 20 a 1400 μ M.

3.7.2.18. Determinación de actividad metionina sulfóxido reductasa.

La actividad Msr de *TcPMSR10* como de *TcPMSR180* fue medida por seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm, mediante dos ensayos acoplados que garantizaron la regeneración de *TcTXNI* en su forma reducida: 1) mediante el sistema *TcTR*/ T(SH)_2 ; o 2) mediante el sistema GR/GSH. La mezcla de reacción contenía TRIS-HCl 100 mM pH 7,5; EDTA 2 mM; NADPH 300 μ M; *TcTR* o GR de *S. cerevisiae* comercial ambas a 1 U ml⁻¹; T(SH)_2 100 μ M o GSH 3 mM; *TcTXNI* 10 μ M y *TcPMSR10* entre 0,5 a 2 μ M o *TcPMSR180* entre 0,5 a 8 μ M. Las reacciones se iniciaron por adición de L-MetSO a una concentración final de 5 mM. Debido a inconvenientes para la adquisición comercial de tripanotión en Argentina (dado la ausencia de distribuidores de las firmas que lo comercializan), la realización de los estudios cinéticos en estado estacionario se realizó mediante el empleo del sistema GR/GSH. Estos ensayos se realizaron utilizando