

La fracción con actividad GR recuperada de esta última cromatografía consistió principalmente en dos polipéptidos de masa molecular aparente de 58 y 40 kDa, evaluado por SDS-PAGE (Fig. 4.2.3). De este modo, para la asignación de la actividad GR a uno de estos polipéptidos se realizó un PAGE nativo con esta muestra y posteriormente se evaluó actividad GR (siguiendo la reducción dependiente de GSH del DTNB) sobre el gel, según el método descrito por Montrichard y col. La banda proteica amarilla fue electroeluida y concentrada por ultrafiltración. Posteriormente, una muestra de la proteína con actividad GR fue evaluada por SDS-PAGE, donde fue posible identificar una única banda de masa molecular aparente de 58 kDa (Fig. 4.2.3), la que fue asociada a la actividad enzimática observada inicialmente en la MO. La GR purificada (> 95% de pureza) presentó una actividad enzimática específica de 147 U mg<sup>-1</sup> a pH 7,5 y 30 °C.

Paso de purificación	MO	DEAE-Sepharosa	Blue-A-Sepharosa	2'5'ADP-Agarosa	PAGE nativo
Volumen (ml)	70	18	4,5	2,5	2,5
Actividad (U ml <sup>-1</sup> )	0,78	2,12	5,10	3,37	3,28
Conc. de Prot. (mg ml <sup>-1</sup> )	1,71	2,59	0,35	0,046	0,021
Actividad Esp. (U mg <sup>-1</sup> )	0,46	0,82	14,56	73,30	147
Purificación (veces)	1	1,8	32	161	318
Recuperación (%)	100	71	42	16	16

Tabla 4.3.1: Purificación de GR a partir de 36 g de células de *P. tricornutum*.

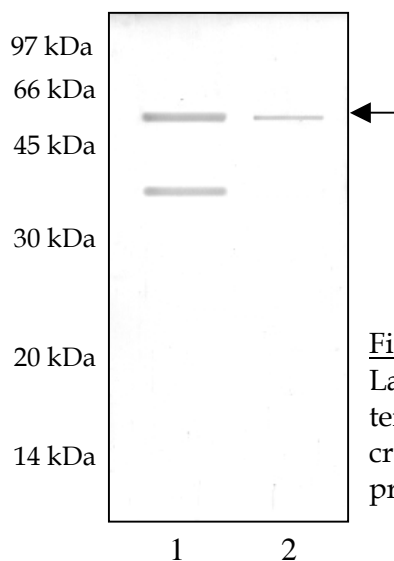
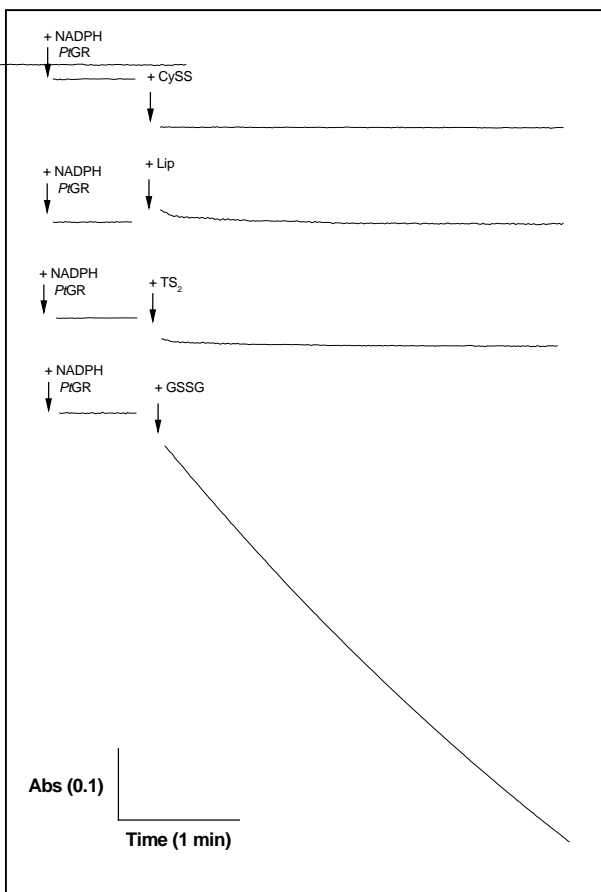


Fig 4.2.3: Análisis electroforético de GR purificada. La proteína fue resuelta por SDS-PAGE al 15% y teñida con Coomassie blue. Calle 1) elusión de cromatografía de 2,5'ADP-Agarosa y Calle 2) proteína electroeluída con actividad GR.

#### 4.2.3. Especificidad de sustrato de la GR de *P. tricornutum*.

Si bien la enzima purificada presentó actividad GR en presencia de NADPH como fuente de equivalentes de reducción, se evaluó su capacidad de emplear NADH como sustrato reductor alternativo para la reacción de reducción de GSSG. Los resultados obtenidos revelaron que la enzima purificada fue específica para NADPH, no pudiéndose detectar actividad en presencia de NADH (hasta 500  $\mu\text{M}$ ). Este resultado es coherente con lo informado para GR de otras fuentes (Dringen y col., 2002). Alternativamente, se ensayó la habilidad de la enzima para reducir otros sustratos disulfuros tales como cistina (CySS), lipoamida (Lip), tripanotión disulfuro ( $\text{TS}_2$ ) y DTNB en presencia de NADPH como sustrato reductor. Como se observa en la Fig. 4.2.4, no se detectó actividad reductasa con ninguno de estos sustratos disulfuros alternativos, lo que indica una especificidad de la enzima purificada por el GSSG. La actividad DTNB reductasa fue únicamente detectada en presencia de GSSG como mediador (el cual es reducido enzimáticamente a GSH y éste reduce directamente al DTNB), como se muestra en la Fig. 4.2.5.



**Fig. 4.2.4:** Ensayos de actividad disulfuro reductasa dependiente de NADPH de GR purificada. La actividad se evaluó siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm a pH 7,5 y 25 °C, en presencia de NADPH 200  $\mu\text{M}$ , CysS 1 mM o Lip 1 mM o  $\text{TS}_2$  0,25 mM o GSSG 1 mM, respectivamente.

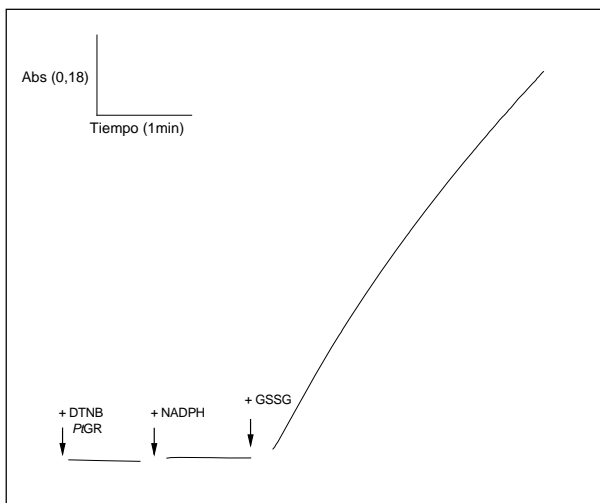


Fig. 4.2.5: Ensayo de actividad DTNB reductasa dependiente de NADPH de GR purificada. La actividad se evaluó siguiendo la reducción de DTNB a 412 nm a pH 7,5 y 25 °C, en presencia de NADPH 200  $\mu\text{M}$ , DTNB 1 mM v GSSG 1 mM.

#### 4.2.4. Estudios cinéticos en estado estacionario de GR de *P. tricornutum*.

La GR purificada fue analizada en sus propiedades cinéticas mediante estudios realizados en estado estacionario. Estos estudios demostraron que la enzima exhibió una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten con relación a los diferentes sustratos: NADPH y GSSG. El paralelismo en las rectas de los gráficos de doble recíprocos de la velocidad inicial con variables concentraciones de GSSG a diferentes concentraciones fijas de NADPH (Fig. 4.2.6), indicó que la enzima sigue un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong” o doble sustitución. Los parámetros cinéticos se exponen en la Tabla 4.2.2.

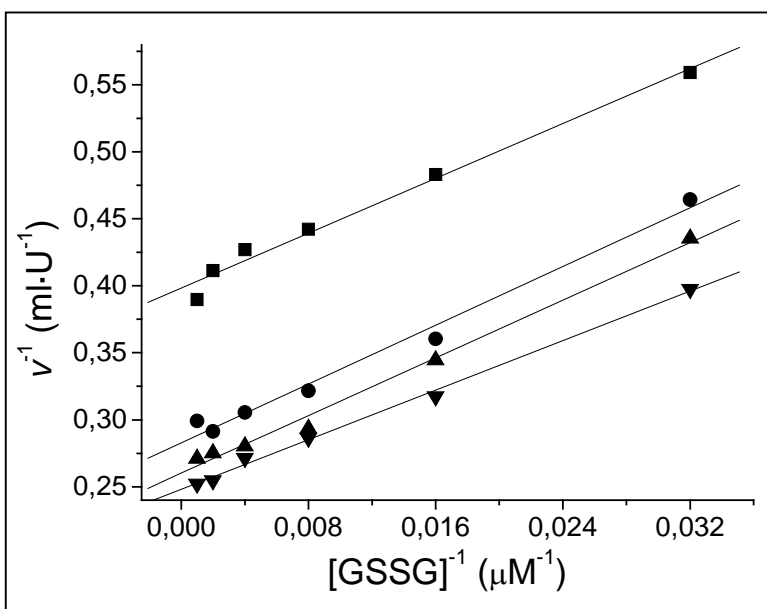


Fig. 4.2.6: Análisis cinético de GR de *P. tricornutum*. Las reacciones fueron realizadas a pH 8,0 y 30 °C, en presencia de cantidades variables de GSSG (15-1000  $\mu\text{M}$ ) y diferentes concentraciones fijas de NADPH: (!) 8,6  $\mu\text{M}$ ; (,) 17  $\mu\text{M}$ ; (7) 26  $\mu\text{M}$  y (B) 34  $\mu\text{M}$ .

Los parámetros cinéticos obtenidos para NADPH y GSSG se encuentran dentro de los valores reportados para otras GR (Carlberg y col., 1985; Dringen y col., 2002). Adicionalmente, se evaluó la capacidad de la enzima de reducir a un derivado del GSH, el S-nitrosoglutatión (GSNO). Como se mencionó en el capítulo anterior, los S-nitrosotioles son portadores de NO· y pueden actuar como potenciales oxidantes de tioles en las proteínas (Al-Sa'doni y col., 2000). Como se puede apreciar en la Fig. 4.2.7, la enzima purificada catalizó la reducción dependiente de NADPH de GSNO, siguiendo una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos de la reducción de GSNO se muestran en la Tabla 4.2.2.

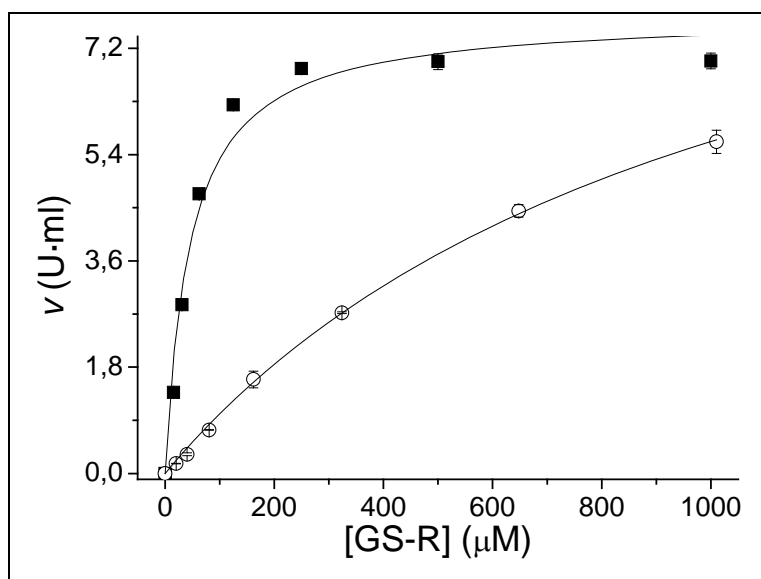


Fig. 4.2.7: Análisis cinético de reducción de (●) GSSG y (■) GSNO por GR de *P. tricornutum*. Los ensayos se realizaron a pH 8,0 y 30 °C con NADPH 300 μM.

Sustrato	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
NADPH	190	14	1,36 · 10 <sup>7</sup>
GSSG	190	60	3,17 · 10 <sup>6</sup>
GSNO	181	818	2,21 · 10 <sup>5</sup>

Tabla 4.2.2: Parámetros cinéticos de GR de *P. tricornutum* determinados a pH 8,0 y 30 °C.

En forma complementaria, se evaluó la influencia del pH sobre la actividad GR de la enzima purificada. En primer lugar, la enzima fue incubada a diferentes pH (entre 6,5 y 10) por 10 min a 30 °C, mostrando ser estable en este rango de pH (Fig. 4.2.8). Por otro lado, se determinó como variaba su actividad enzimática a diferentes pH de reacción. En la Fig. 4.2.7, se presenta el perfil de actividad enzimática en función del pH, obteniéndose valores similares a pH entre 6,5 y 7,5, el máximo de actividad fue exhibido a pH 8,0; mientras la actividad decreció significativamente por arriba de pH 8,0 (Fig. 4.2.8).

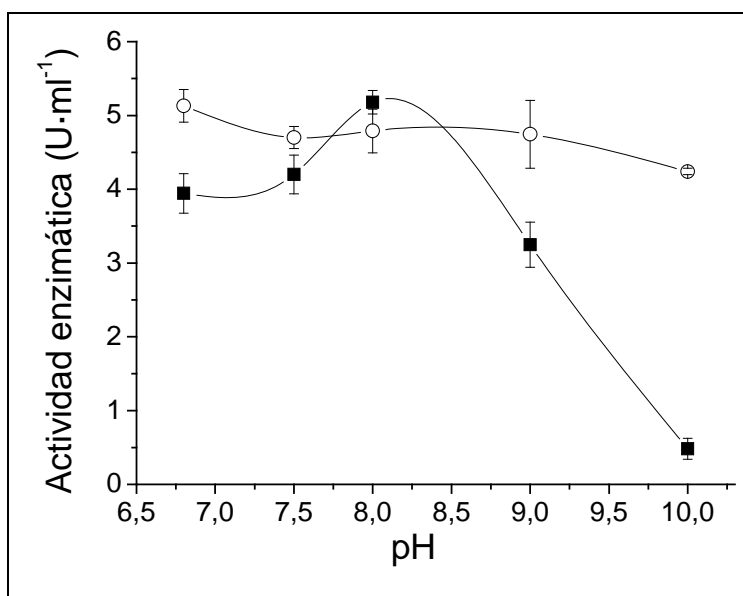


Fig. 4.2.8: Análisis del efecto del pH sobre la actividad (○) y estabilidad (■) de GR purificada de *P. tricornutum*. Las reacciones se llevaron a cabo en TRIS-HCl 100 mM; EDTA 2 mM; NADPH 300  $\mu$ M y GSSG 1 mM, a 30 °C.

En adición, se determinó la temperatura óptima de reacción por medición de la actividad GR a diferentes temperaturas, entre 15 y 50 °C. En la Fig. 4.2.9 se expone el perfil obtenido, observándose un incremento de la actividad al superar los 25 °C, exhibiendo un máximo de 32 °C y luego decrece bruscamente al superar los 35 °C. La energía de activación aparente de la reacción de reducción de GSSG dependiente de NADPH fue calculada en 19536 J mol<sup>-1</sup> a pH 8,0. Alternativamente, se estudió la estabilidad térmica de la enzima mediante la incubación de ésta a diferentes temperaturas (en ausencia de sustratos) por 10 min a pH 8,0. En la Fig. 4.2.9, se exhibe el perfil de estabilidad térmica como función de la actividad GR remanente.

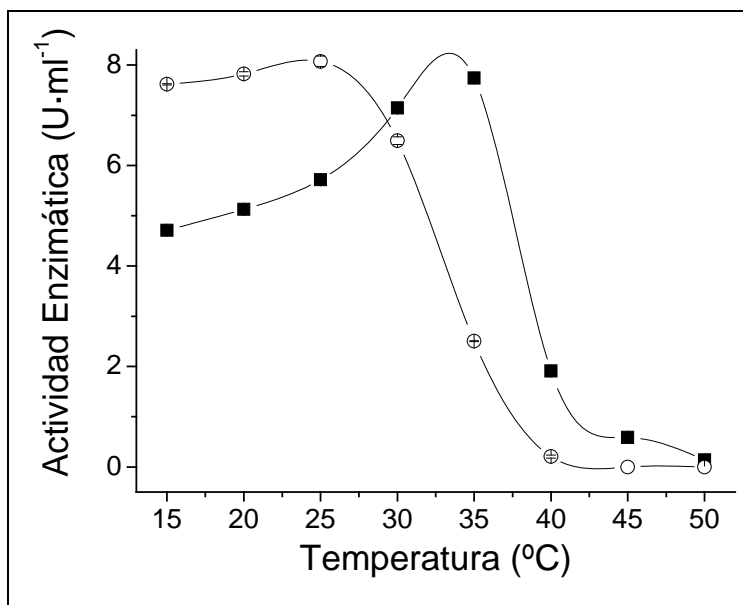


Fig. 4.2.9: Análisis del efecto de la temperatura sobre la actividad (¡) y estabilidad (–) de GR purificada de *P. tricornutum*. Las reacciones se llevaron a cabo en TRIS-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 2 mM; NADPH 300  $\mu$ M y GSSG 1 mM.

#### 4.2.5. Estudio de inhibición de GR de *P. tricornutum* por metales pesados y por productos de reacción.

Con el fin de contribuir a la caracterización de la enzima, se ensayó la actividad GR en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . La enzima exhibió una alta sensibilidad a estos metales, particularmente a  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  a concentraciones menores de 10  $\mu$ M (Fig. 4.2.10). Estos resultados indicarían la importancia de residuos de cisteína activos en la proteína en la participación en la vía de reacción de reducción de GSSG. En la Tabla 4.2.3 se presentan las  $\text{IC}_{50}$  de cada ión metálico. Este mismo tipo de análisis fue extendido a otros tipos de iones tales como:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , los que no afectaron significativamente la actividad GR de la enzima.

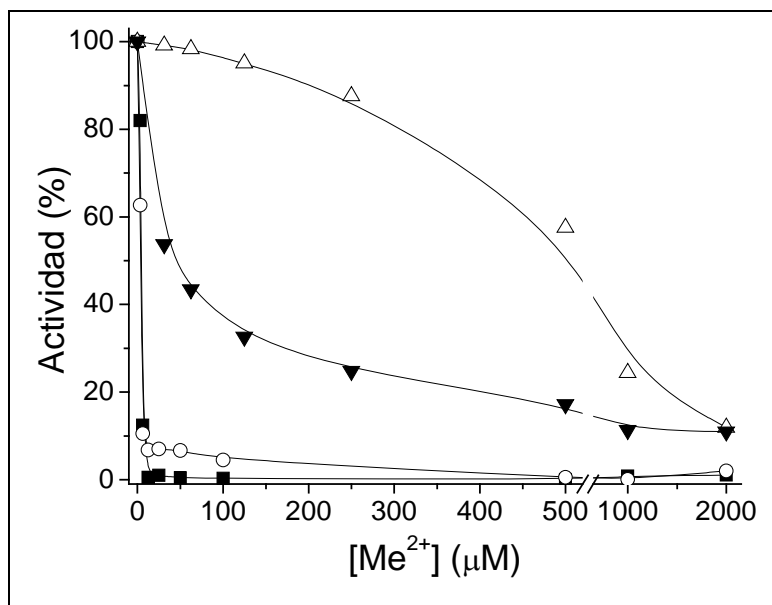


Fig. 4.2.10: Inhibición de GR de *P. tricornutum* por metales pesados. Las reacciones se realizaron en presencia de TRIS-HCl 100 mM pH 8,0; NADPH 300 µM; GSSG 1 mM; y diferentes concentraciones de iones de metales pesados: (!) Zn<sup>2+</sup>; (-) Cu<sup>2+</sup>; (8) Ni<sup>2+</sup> y (B) Co<sup>2+</sup>, a 30 °C.

Metal	IC <sub>50</sub> (µM)
Zn <sup>2+</sup>	4,22
Cu <sup>2+</sup>	3,43
Ni <sup>2+</sup>	534
Co <sup>2+</sup>	36

Tabla 4.2.3: Valores de IC<sub>50</sub> de GR de *P. tricornutum* para varios iones de metales pesados, a 30 °C y pH 8,0.

Como caracterización complementaria se estudió el efecto de los productos de la reacción de reducción de GSSG a expensas del NADPH (GSH y NADP<sup>+</sup>) sobre la actividad de la enzima purificada. Estos estudios revelaron que tanto el NADP<sup>+</sup> como el GSH presentaron propiedades inhibitorias bajo condiciones de no saturación para los sustratos: NADPH (<50 µM) o GSSG (<200 µM). Es de remarcar que elevadas concentraciones de NADP<sup>+</sup> (hasta 1 mM) no fueron inhibitorias para la enzima en presencia de NADPH 300 µM y GSSG 1 mM. En el mismo sentido, el GSH actuó como inhibidor únicamente a altas concentraciones (>1 mM). Los estudios de inhibición en estado estacionario

mostraron que el GSH actuó como un inhibidor no competitivo del NADPH y como competitivo del GSSG, mientras el NADP<sup>+</sup> presentó características de inhibidor competitivo respecto al NADPH y de no competitivo frente al GSSG. En la Tabla 4.2.4 se presentan los valores de  $K_i$  calculados para cada tipo de inhibición. Los altos valores de  $K_i$  obtenidos tanto para el NADP<sup>+</sup> como para el GSH (lo que indicaría un pobre efecto inhibitorio de la reacción de reducción de GSSG) es coherente con la escasa reversibilidad de la reacción catalizada, observada al incubar la enzima en presencia de NADP<sup>+</sup> 300  $\mu$ M y GSH 2 mM. Esta falta de actividad de reducción del NADP<sup>+</sup> indicaría que la función fisiológica de la enzima es efectivamente la reducción de GSSG y no la oxidación del GSH.

Inhibidor	Tipo de inhibición	$K_i$
NADP <sup>+</sup>	Competitivo respecto a NADPH	52 $\mu$ M
NADP <sup>+</sup>	No competitivo frente a GSSG	1 mM
GSH	No competitivo respecto a NADPH	10 mM
GSH	Competitivo frente a GSSG	5 mM

**Tabla 4.2.4:** Constantes de inhibición de productos de reacción de reducción de GSSG a expensas de NADPH por GR de *P. tricornutum*, calculadas a 30 °C y pH 8,0.

#### 4.2.6. Propiedades físicas de GR de *P. tricornutum*.

La GR purificada presentó un perfil de absorción típico de proteínas que contienen flavinas (flavoenzimas) (Fig. 4.2.11), caracterizado por dos picos de absorción a 358 nm y 452 nm. La reducción de la enzima con un exceso de NADPH generó una disminución de la absorbancia a 452 nm con una concomitante formación de una banda de absorción entre 550 a 560 nm. Este fenómeno es, probablemente, la consecuencia óptica de una transferencia de equivalentes de reducción dentro el complejo GR-NADPH entre el anión tiolato (de las cisteínas reactivas) y el anillo de isoalloxazina (de la flavina reducida previamente por el NADPH), como ya se había reportado previamente por otros autores (Serrano y col., 1984).



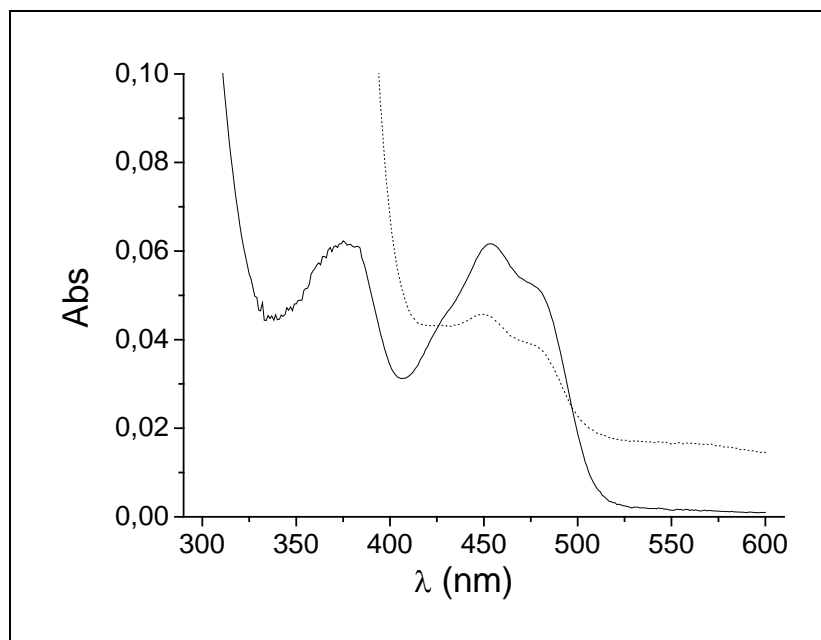


Fig. 4.2.11: Espectro de absorción de GR purificada a partir de *P. tricornutum* en estado oxidado (línea continua) y reducida con un exceso de NADPH (línea de trazos). Los ensayos se realizaron en TRIS-HCl 20 mM pH 8,0 y EDTA 1mM a 25 °C.

Se determinó mediante SDS-PAGE que la enzima GR purificada de *P. tricornutum* estaba compuesta por un único polipéptido de 58 kDa (Fig. 4.2.3) El perfil de migración de la enzima en SDS-PAGE no fue dependiente de la presencia o ausencia de agentes reductores como DTT (no mostrado). Por otro lado, la masa molecular nativa de la GR fue determinado en 118 kDa por PAGE nativo (siguiendo la técnica de Ferguson, ver punto 3.7.1), como se muestra en la Fig. 4.2.12. Estos resultados revelarían que esta enzima posee una estructura cuaternaria homodimérica con la presencia de FAD o FMN como grupo prostético. Lo hallado en estos experimentos concuerda con lo reportado para otras GR de otras fuentes (Carlberg y col., 1985; Lopez y col., 2000; Dringen y col., 2002).

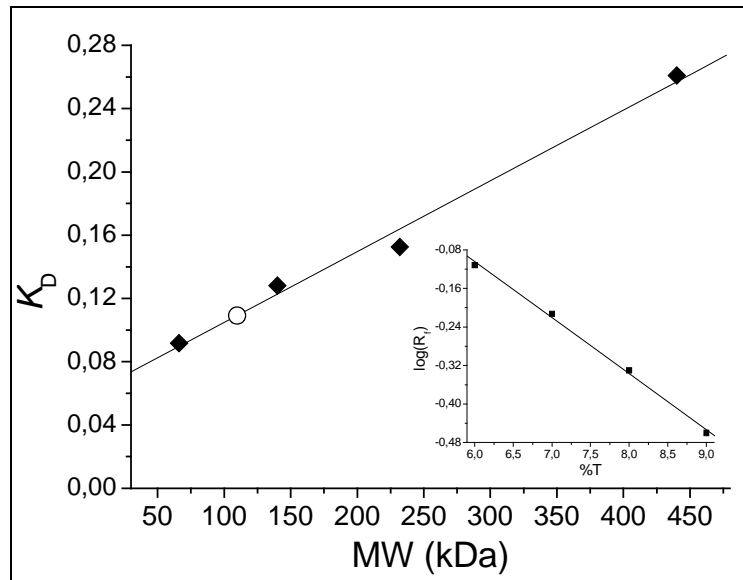


Fig. 4.2.12: Determinación de masa molecular nativa de GR de *P. tricornutum*. El Gráfico de Ferguson secundario fue generado al graficar los coeficientes de retardo ( $K_D$ ) de proteínas patrones en función de las respectivas masas moleculares ( $\Delta$ ). El coeficiente de retardo de la GR purificada (O) fue calculado en 0,111; lo cual se correlaciona con una masa molecular de 118 kDa. En recuadro: Gráfico de Ferguson primario de GR purificada, Log de la movilidad electroforética ( $\log R_f$ ) en función de la concentración de gel (%T).

#### 4.2.7. Discusión.

Las diatomeas son, actualmente, organismos con un creciente valor biotecnológico, siendo empleadas para diversos procesos tales como biorremediación, así como para la obtención de un amplio espectro de compuestos químicos de utilidad industrial y farmacéutica (Kroth, 2007; Grachev y col., 2008). No obstante, pese a la gran importancia económico-tecnológica que presentan, son escasos los estudios en relación a su bioquímica y fisiología, pilares esenciales para una mejor comprensión y aprovechamiento biotecnológico de estos organismos. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, y con el objeto de contribuir al conocimiento, avanzamos en la caracterización del metabolismo redox de *P. tricornutum*, puntualmente sobre el metabolismo redox dependiente de tioles.

Como primera aproximación, se han evaluado actividades enzimáticas de diferentes oxidorreductasas en extractos proteicos de *P. tricornutum*, tales como TR, cistina reductasa, TRXR (con *Ec*TRX como sustrato), dihidrolipoamida deshidrogenasa y GR, habiéndose detectado actividad de las dos últimas mencionadas. Se logró detectar además, en los extractos obtenidos, actividad reductora de DTNB, el cual, según la bibliografía, podría ser sustrato alternativo de TRXR (Arner y col., 1999; Gromer y col., 2002). En forma complementaria, se realizaron experimentos de *western blot* contra los extractos proteicos, al emplear el antisuero contra *Eh*TRXR se detectó una banda de reconocimiento de aproximadamente 50 kDa, que coincide con el tamaño molecular de al menos una TRXR de alto peso molecular (Williams y col., 2000).

Contrariamente a lo observado en los ensayos de actividad enzimática en los cuales no se ha detectado actividad TR, el anticuerpo contra *Tc*TR detectó dos bandas de reconocimiento, entre 50 y 60 kDa. Estos tamaños moleculares concuerdan con los tamaños moleculares informados para GR y dihidrolipoamida deshidrogenasa (Serrano, 1992; Dringen y col., 2002) (las cuales presentaron actividad enzimática en los extractos proteicos del alga). Una posibilidad es que estas proteínas hayan sido detectadas por el anticuerpo debido a la presencia de epitopes conservados en este tipo de proteínas, las cuales pertenecen a la familia de las piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas (Flohe y col., 1999). Además, los anticuerpos contra *Eh*TRX41 y contra *Tc*PMR10 (descrito en el Capítulo 3) detectaron bandas de reconocimiento coherentes con los tamaños reportados para este tipo de proteínas. Estos resultados fueron, *a priori*, las primeras evidencias que

obtuvimos de la presencia de distintos componentes del metabolismo redox del alga, reforzando la idea acerca de la presencia de un metabolismo dependiente del glutatión, cuya existencia se había puesto en evidencia en un informe previo donde se evaluó actividad de GR y el contenido de glutatión en la diatomea frente al estrés por cobre (Morelli y col., 2004).

En base a los hallazgos obtenidos, se propuso realizar la purificación y caracterización de la GR de *P. tricornutum*. El procedimiento de purificación descrito en este trabajo fue capaz de obtener una enzima a homogeneidad, en base a un criterio electroforético, con una actividad enzimática específica de 147 U mg<sup>-1</sup> a pH 7,5 y 195 U mg<sup>-1</sup> a pH 8,0. Estos valores de actividad enzimática son similares a los informados para GR de otras fuentes (Carlberg y col., 1985; Dringen y col., 2002). Las GR han sido extensivamente estudiadas en animales (Scott y col., 1963; Dringen y col., 2002; Erat y col., 2005), levaduras (Icen, 1971; Moroff y col., 1975; Rakauskiene y col., 1989; Tsai y col., 1991), plantas superiores (Connell y col., 1986; Anderson y col., 1990; Madamanchi y col., 1992), bacterias (Asnis, 1955; Vanoni y col., 1990) y cianobacterias (Serrano y col., 1984), pero pobremente estudiadas en diatomeas. En el caso de protozoos fotosintéticos, sólo ha sido estudiada la enzima de *Euglena gracilis* z (Shigeoka y col., 1987; Montrichard y col., 1999).

La GR purificada a partir de *P. tricornutum* fue caracterizada en forma nativa como un homodímero de 118 kDa, lo cual concuerda con el tamaño molecular de muchas GR (Carlberg y col., 1985; Dringen y col., 2002), a excepción de la enzima caracterizada de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Chung y col., 1975) y algunas otras provenientes de tejidos de mamíferos [tales como el cerebro (Dringen y col., 2002)], las cuales son proteínas monoméricas. La enzima purificada exhibió propiedades espectroscópicas típicas de las flavoenzimas (proteínas que contienen FAD o FMN como grupo prostéticos). Adicionalmente, el espectro de absorción fue modificado (observándose una disminución de los picos típicos de la flavina y el ensanchamiento de una banda a 550-560 nm) posteriormente a la incubación de la enzima con un exceso de NADPH. Este fenómeno ha sido descrito para otras GR cuando son reducidas por el nucleótido-piridina como la formación de un complejo de resonancia paramagnética, el cual se debería a la transferencia de equivalentes de reducción entre el NADPH/flavina y entre la flavina/disulfuros (Scott y col., 1963; Serrano y col., 1984; Carlberg y col., 1985).

Los ensayos de actividad enzimática demostraron que la GR purificada presentó especificidad por NADPH como sustrato reductor y por GSSG como sustrato disulfuro. Esta preferencia por el NADPH (principal producto de la vía fotosintética de transporte de electrones) es conservada en otros organismos fotosintéticos y en no fotosintéticos (Carlberg y col., 1985; Dringen y col., 2002), existiendo escasos ejemplos de GR que prefieran al NADH como sustrato reductor, como la enzima caracterizada de *Chromatium vinosum* (Chung y col., 1975). Los estudios cinéticos en estado estacionario, revelaron que la enzima GR sigue un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong” o de doble sustitución, siendo consistente con el mecanismo planteado para otras GR de otras fuentes (Scott y col., 1963; Chung y col., 1975; Erat y col., 2005). Los valores de  $k_{cat}$  y  $K_m$  para NADPH y GSSG fueron similares a los valores hallados para otras GR, así como los valores de pH y temperatura de reacción óptimos (8,0 y 32 °C, respectivamente) (Dringen y col., 2002).

Alternativamente la enzima presentó capacidad de reducir al derivado nitrosilado del glutatión, el GSNO. Si bien la eficiencia catalítica de reducción de GSNO es un orden de magnitud menor a la reducción de GSSG, es superior respecto a lo informado para otras enzimas de la familia piridina-nucleótido oxidorreductasa, tales como TRXR de mamífero (Nikitovic y col., 1996) o de otros protozoos [como *Plasmodium falciparum* (Kanzok y col., 2000) o *Entamoeba histolytica*, esta última se describió en el capítulo anterior]. Estos resultados son interesantes teniendo en cuenta que otras GR como la de humano (Becker y col., 1995), de levadura (Nikitovic y col., 1996) y de hígado de rata (Nikitovic y col., 1996) no presentan capacidad de reducción de GSNO, lo que indica que esta enzima (y posiblemente junto a otras proteínas relacionadas a vías dependientes de GSH, como las Grx) participaría en mecanismos de regulación de las concentraciones de GSNO, el cual sería un potencial oxidante endógeno generado a partir del metabolismo aerobio fotosintético propio de la diatomea.

Se ha observado que la enzima GR purificada fue fuertemente inhibida por iones de metales pesados (principalmente  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ), los cuales podrían actuar mediante la unión irreversible de los cationes a los tioles reactivos de la enzima, bloqueando su capacidad de reducir GSSG. Esta característica inhibitoria es común para enzima que poseen grupos tioles reactivos que participen en el ciclo catalítico (Serrano y col., 1984). En adición, este efecto de los metales pesados ya había sido observado sobre la actividad disulfuro reductasa de *Eh*TRXR, como se describió en el Capítulo 1. En forma alternativa,

se advirtió que tanto NADP<sup>+</sup> como GSH (los productos de la reacción de reducción de GSSG) inhibieron a la enzima con altos valores de  $K_i$ . Este fenómeno podría deberse al alto potencial de reducción que presenta el GSH (-240 mV) respecto al NADPH (-320 mV), lo que favorece la reacción de reducción de GSSG y no la reacción inversa, lo que indicaría un cierto grado de irreversibilidad de la reacción y por ello un pobre efecto de los productos sobre ésta (Scott y col., 1963; Shigeoka y col., 1987).

En adición, los perfiles de inhibición por productos de reacción (junto con el perfil de reacción de los sustratos mencionado anteriormente), indicaron que la enzima GR posee un mecanismo de tipo “ping-pong híbrido”, lo que apoya en primer lugar, la presencia de dos sitios de unión, uno para cada sustrato y la capacidad de la enzima de encontrarse tanto en estado reducido como oxidado durante el ciclo catalítico (Bironaite y col., 1998; Cenas y col., 2004). El mecanismo de reacción aquí determinado concuerda con lo hallado para otras GR de otras fuentes (Scott y col., 1963; Serrano y col., 1984), así como con el mecanismo de reacción propuesto para GR de eritrocitos humanos resuelto mediante estudios de cristalografía y difracción de rayos x (Pai y col., 1983).

El glutatión, principal tiol intracelular en *P. tricornutum* (Morelli y col., 2004), posee un rol importante en la protección contra las ERO generadas durante la actividad fotosintética y también en el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular. Alternativamente, el GSH y péptidos derivados de él, tales como las fitoquelatinas, forman la primera línea de defensa contra la formación de radicales libres mediados por metales pesados (Morelli y col., 2004). Por todo lo mencionado, la GR, la enzima responsable de preservar a este compuesto en estado reducido, presenta una gran importancia en el pobremente dilucidado escenario redox en esta diatomea. Los resultados obtenidos dan evidencias sólidas de la existencia de un sistema dependiente de glutatión en *P. tricornutum*, siendo esto información valiosa para la incipiente proteómica de esta diatomea. En adición, éste es el primer estudio detallado sobre GR proveniente de una diatomea.

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo de tesis no permitieron lograr una caracterización extensiva de los sistemas redox dependientes de tioles en *P. tricornutum*, constituyen un aporte más para lograr este objetivo. A pesar de que es necesario más trabajo para esclarecer en su totalidad el metabolismo redox en esta diatomea, parece claro que estos organismos representan un sistema simple y apropiado para realizar estudios de

las relaciones entre este metabolismo y los diversos procesos fotosintéticos. Es importante resaltar la existencia de una base de datos de marcadores de secuencia expresada o EST (acrónimo del inglés *expressed sequence tag*) de esta diatomea ([www.biologie.ens.fr/diatomics/EST3/index.php](http://www.biologie.ens.fr/diatomics/EST3/index.php)). Esta base de datos presentó secuencias nucleotídicas que contienen ORF codificantes para dos tiorredoxinas, dos glutatión peroxidases, dos metionina sulfóxido reductasas A, una peroxirredoxina Q, dos glutarredoxinas, dos glutatión-S-transferasas, una ascorbato peroxidasa, una glutatión sintetasa, una dehidroascorbato reductasa, una ferredoxina-tiorredoxina reductasa, dos flavodoxinas, una nucleorredoxina, una tiorredoxina reductasa, una dihidrolipoamida deshidrogenasa y una glutatión reductasa, siendo la presencia de estas tres últimas coherentes con lo detectado en los extractos crudos del alga mediante los ensayos de actividad enzimática y *western blot*. La existencia en esta diatomea de genes codificantes para las proteínas arriba mencionadas dan idea de un amplio contexto metabólico a nivel del metabolismo redox, principalmente de vías dependientes de TRX, glutatión, ascorbato y de los fotosistemas.

Para finalizar, el estudio del metabolismo redox en *P. tricornutum* podría ser una herramienta importante, no sólo para comprender la capacidad de este organismo de sobrellevar el estrés oxidativo (y otros de naturaleza abiótica), sino también como base para la ingeniería metabólica [con ayuda de la ingeniería genética, dado que existe un sistema para la expresión de proteínas recombinantes en la diatomea, el plásmido pPha-T1 (Apt y col., 1996)] en este organismo, de forma tal de “direccionar” la producción de metabolitos secundarios de potencial importancia tecnológica y económica.

### 4.3 CAPÍTULO 3: Caracterización funcional de MsrA de *Trypanosoma cruzi*.

#### 4.3.1. Identificación, clonado y expresión de genes codificantes para MsrA de *T. cruzi*.

En la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* (Wellcome Trust, Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit, [www.genedb.org](http://www.genedb.org)) se identificaron dos posibles secuencias, Tc00.1047053510855.10 y Tc00.1047053509611.180, codificantes para dos MsrA, TcPMSR10 y TcPMSR180, respectivamente. Estas enzimas se encuentran codificadas por dos genes alelos de 534 bp localizados en diferentes *loci* en el genoma de *T. cruzi*. Ambas proteínas poseen una masa molecular, estimada *in silico*, en 20 kDa, similar a otros miembros de la superfamilia Msr. Estas enzimas han sido caracterizadas desde diversas fuentes: bacterias, levaduras, plantas y mamíferos (Weissbach y col., 2002; Ezraty y col., 2005; Moskovitz, 2005). En la Fig. 4.3.1 se presenta un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TcPMSR10 y TcPMSR180, en donde se puede observar la alta identidad (96%) que exhiben estas proteínas. Las variaciones halladas se presentan, principalmente, en el contenido de residuos ácidos (Asp y Glu). En adición, en la Fig. 4.3.2, se muestra un alineamiento de secuencias más amplio de estas proteínas con otras MsrA de distintos orígenes, pudiéndose identificar la presencia del motivo redox activo (GCFWG) característicos de este tipo de enzimas (Kauffmann y col., 2005; Banerjee, 2008).

		Section 1																																																					
	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	54																																												
TcPMSR10	(1)	M	A	S	G	V	P	A	T	F	A	A	G	C	F	W	G	T	E	R	F	F	V	K	K	F	G	D	A	L	L	S	H	E	V	G	Y	M	G	G	A	E	S	D	E	V	V	T	Y	P	A	V	K	K	G
TcPMSR180	(1)	M	A	S	G	A	P	A	T	F	A	A	G	C	F	W	G	T	E	R	F	F	V	K	K	F	G	D	A	L	L	S	H	E	V	G	Y	M	G	G	A	E	S	D	E	V	V	T	Y	S	A	V	K	K	G
Consensus	(1)	M	A	S	G		P	A	T	F	A	A	G	C	F	W	G	T	E	R	F	F	V	K	K	F	G	D	A	L	L	S	H	E	V	G	Y	M	G	G	A	E	S	D	E	V	V	T	Y		A	V	K	K	G
		Section 2																																																					
	(55)	55	60	70	80	90	100	110	120	130	108																																												
TcPMSR10	(55)	T	T	G	H	A	E	V	L	H	V	K	Y	N	P	E	K	V	N	Y	Q	Q	L	L	D	F	F	F	R	I	H	D	P	T	T	V	N	R	Q	G	V	D	V	G	T	Q	Y	R	S	A	I	F	Y	H	D
TcPMSR180	(55)	T	T	G	H	A	E	V	L	H	V	K	Y	N	P	E	K	V	T	Y	Q	Q	L	L	D	F	F	F	R	I	H	N	P	T	T	V	N	R	Q	G	V	D	V	G	T	Q	Y	R	S	A	I	F	Y	H	D
Consensus	(55)	T	T	G	H	A	E	V	L	H	V	K	Y	N	P	E	K	V		Y	Q	Q	L	L	D	F	F	F	R	I	H		P	T	T	V	N	R	Q	G	V	D	V	G	T	Q	Y	R	S	A	I	F	Y	H	D
		Section 3																																																					
	(109)	109	120	130	140	150	160	170	180	190	162																																												
TcPMSR10	(109)	D	Q	Q	L	K	E	A	K	D	Y	I	S	R	L	N	G	E	D	P	A	L	R	E	G	F	V	K	A	F	G	D	A	Q	V	T	S	L	E	K	A	S	R	L	H	V	A	E	D	Y	H	Q	M	Y	
TcPMSR180	(109)	D	Q	Q	L	K	E	A	K	D	Y	I	S	R	L	N	G	A	D	P	A	L	R	E	G	F	V	K	A	F	G	D	A	Q	V	A	T	S	L	E	K	A	S	R	L	H	V	A	E	D	Y	H	Q	M	Y
Consensus	(109)	D	Q	Q	L	K	E	A	K	D	Y	I	S	R	L	N	G		D	P	A	L	R	E	G	F	V	K	A	F	G	D	A	Q	V		T	S	L	E	K	A	S	R	L	H	V	A	E	D	Y	H	Q	M	Y
		Section 4																																																					
	(163)	163	170	177																																																			
TcPMSR10	(163)	L	E	K	N	P	D	R	V	C	S	H	R	I	H	W																																							
TcPMSR180	(163)	L	E	K	N	P	D	R	V	C	S	H	R	I	H	W																																							
Consensus	(163)	L		K	N	P	D	R	V	C	S	H	R	I	H	W																																							

Fig. 4.3.1: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de TcPMSR10 y TcPMSR180. El alineamiento se realizó utilizando el algoritmo Clustal-X del programa Vector NTI v9.0 (Invitrogen) Las flechas indican las cisteínas reactivas.



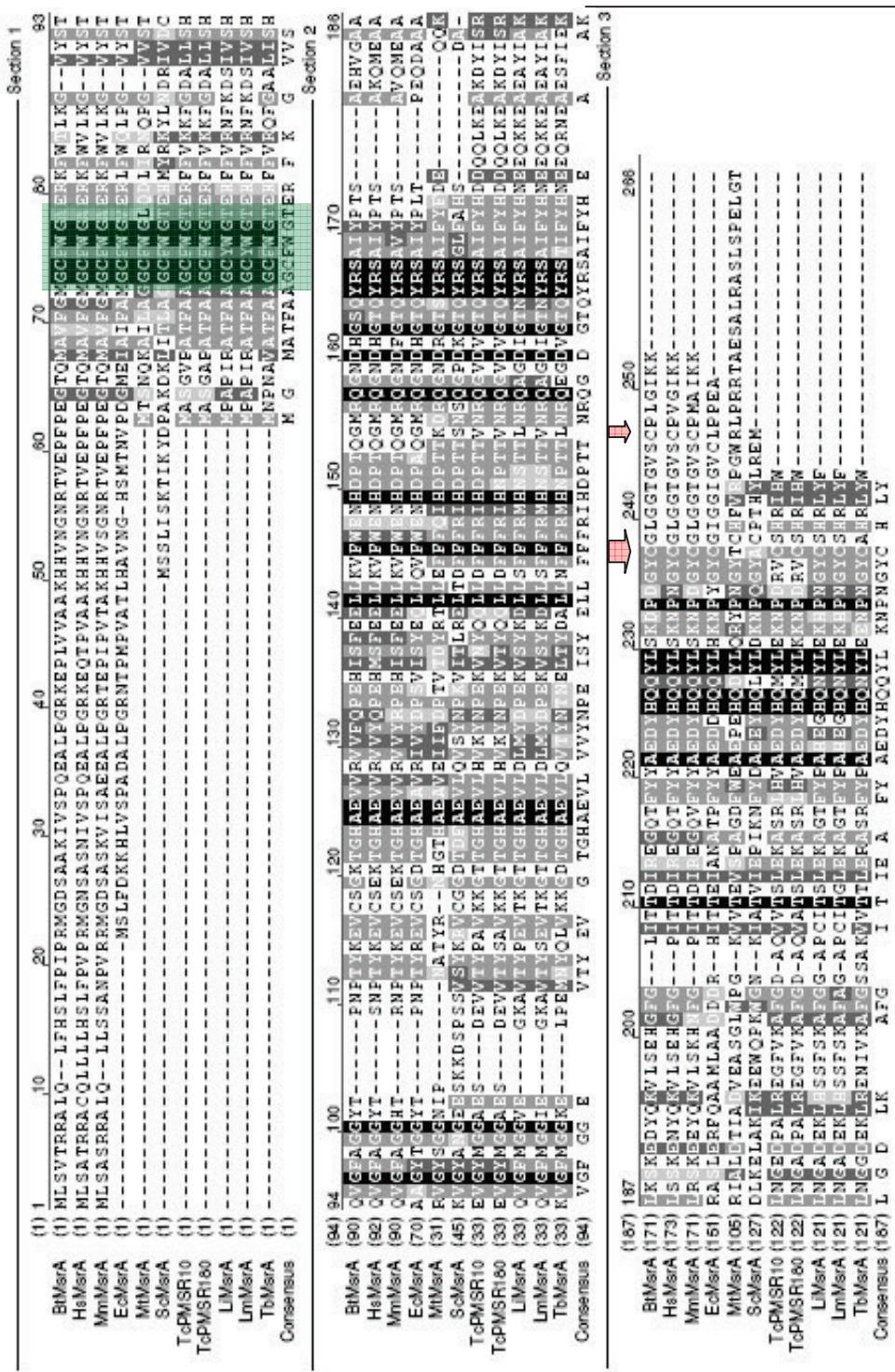


Fig. 4.3.2: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de TcPMSR10 y TcPMSR180 con MsrA de *Bos taurus* (NCBI - AA102981), *Homo sapiens* (NCBI - NP\_036463), *Mus musculus* (NCBI - AAH14738) *E. coli* (NCBI - AAA97115), *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI - P0A5L0), *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI - NP\_010960), *Leishmania infantum* (NCBI - XP\_001470311), *L. major* (NCBI - P\_001681026) y *T. brucei* (NCBI - XP\_829255). El recuadrado muestra el motivo redox activo y la flecha la cisteína resolutiva. El alineamiento se realizó utilizando el programa Vector NTI v9.0 (Invitrogen).

Los genes codificantes para ambas proteínas fueron amplificados mediante técnicas de PCR utilizando oligonucleótidos específicos (ver puntos 3.7.3 y 3.7.4) y ADN genómico del parásito como molde. Posteriormente se clonaron en el vector pGEM-T *Easy* y se confirmaron sus identidades a través de la secuenciación completa de los mismos. Ambos genes fueron subclonados en el vector de expresión pRSET-A y expresados en células de *E. coli* BL21 (DE3). Las proteínas producidas de esta forma se obtuvieron como polipéptidos fusionados a una cola de poli-His en el extremo N-terminal, adicionando aproximadamente 3 kDa más a la masa molecular de las proteínas ( $\approx 23$  kDa). La inducción de la expresión de los genes fue llevada a cabo como se describe en Materiales y Métodos (ver punto 3.6.1) de forma tal de optimizar la expresión de las proteínas recombinantes en forma soluble.

La purificación de *TcPMSR10* y *TcPMSR180* se realizó mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) en condiciones nativas (punto 3.6.3), obteniéndose un alto grado de pureza ( $> 90\%$ ), evaluado por SDS-PAGE (Fig. 4.3.3). Las proteínas purificadas se almacenaron a  $-80$  °C, sin pérdida de actividad enzimática al menos doce meses. Los rendimientos obtenidos fueron de 25 mg/l de cultivo y 27 mg/l de cultivo para *TcPMSR10* y *TcPMSR180*, respectivamente.

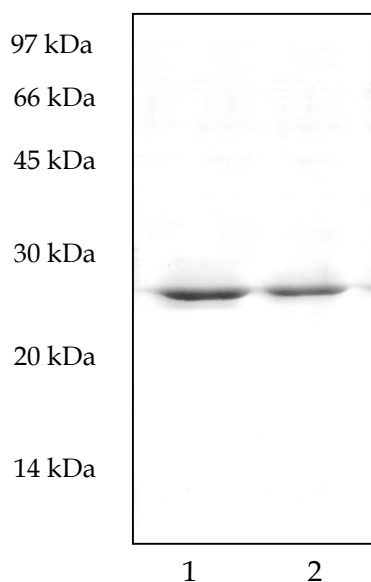
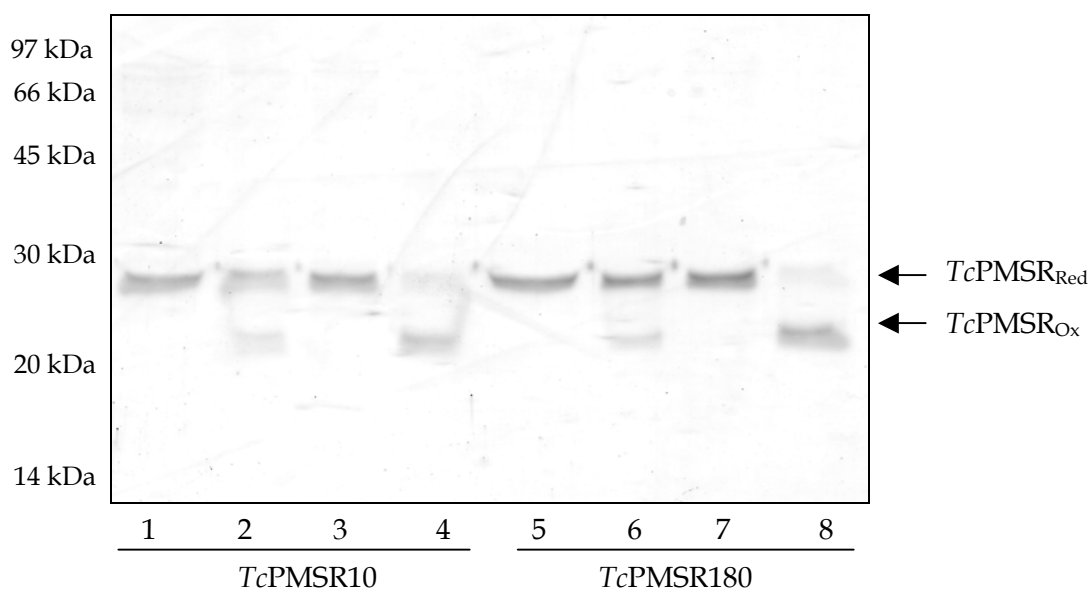


Fig. 4.3.3: SDS-PAGE de las proteínas recombinantes purificadas por IMAC. 1) *TcPMSR10* y 2) *TcPMSR180*.

#### 4.3.2. Caracterización básica de *TcPMSR10* y *TcPMSR180*.

En una primera aproximación, se observó que las *TcPMSR* modificaban su perfil de migración electroforético en SDS-PAGE no reductores, cuando se las preincubaban con

agentes químicos reductores (tales como DTT), u oxidantes (como diamida). Ambas enzimas tratadas con diamida poseían una migración electroforética mayor respecto a las tratadas con DTT (las cuales exhibieron una masa molecular aparente de aproximadamente 23 kDa, concordantes con el tamaño esperado para el polipéptido), como se muestra en la Fig. 4.3.4. El efecto obtenido por tratamiento de las proteínas con diamida, indicaría una posible formación de un puente disulfuro intracatenario. Téngase en cuenta que: 1) ambas enzimas sólo poseen dos residuos de cisteína en su estructura primaria (ver Fig. 4.3.1), 2) la diamida es un oxidante que favorece la formación de puentes disulfuros en las proteínas y tioles de bajo peso molecular y 3) el DTT es un agente químico que reduce inespecíficamente disulfuros (Cleland, 1964). Es de destacar que cada residuo se encuentra ubicado en el extremo opuesto del polipéptido, por lo que la formación del puente disulfuro, generaría una estructura más compacta respecto a las tratadas con DTT, disminuyendo así el volumen específico de la molécula (Chrambach y col., 1971). Esto último es coincidente con el aumento en la movilidad electroforética, observado en la Fig. 4.3.4, de las enzimas oxidadas.



**Fig. 4.3.4:** Ensayo de oxido reducción de  $TcPMSR$ , revelado en SDS-PAGE no reductor. Las proteínas (4  $\mu$ M), se trataron según protocolo estándar (calles 1 y 5); no tratadas (calles 2 y 6); preincubadas con DTT 10 mM (calles 3 y 7) y preincubadas con diamida 10 mM (calles 4 y 8). Los tratamientos se realizaron a 37 °C por 10 min.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se evaluó el efecto del sustrato oxidante fisiológico, L-MetSO, sobre la movilidad electroforéticas de ambas enzimas. Se

preincubaron ambas proteínas (previamente reducidas químicamente con DTT), con diferentes concentraciones del sulfóxido. Posteriormente, se realizó una corrida electroforética en SDS-PAGE no reductor y, como se puede observar en la Fig. 4.3.5, se obtuvo el mismo efecto que el obtenido por tratamiento con diamida. Esto sugiere que en el mecanismo de reducción de L-MetSO intervienen los residuos de cisteína presentes en las proteínas, con la resultante formación de un puente disulfuro intramolecular. Además, estos resultados demostraron, *a priori*, que ambas *TcPMSR* eran activas, dado que la L-MetSO es un oxidante químico altamente específico (a diferencia de la diamida) y por lo tanto la oxidación de las proteínas debería ocurrir por medio de una interacción enzima-sustrato.

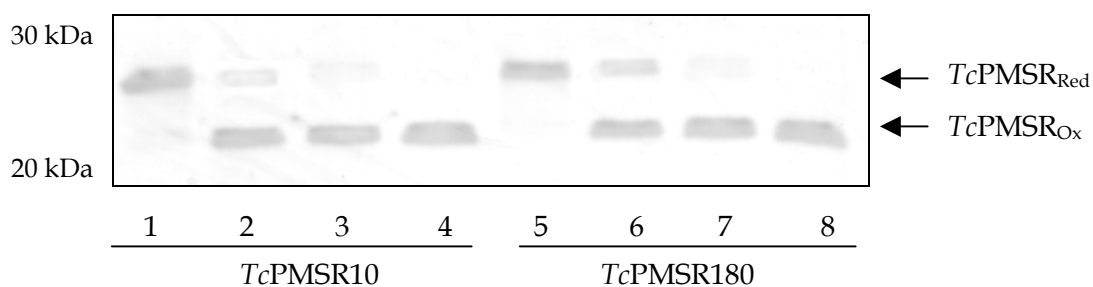


Fig. 4.3.5: Ensayo de oxidación de *TcPMSR* por L-MetSO, revelado en SDS-PAGE no reductor. Las proteínas (4  $\mu$ M), se preincubaron a 37 °C por 10 min con diferentes concentraciones de L-MetSO: sin agregado, control (calles 1 y 5); 1 mM (calles 2 y 6); 5 mM (calles 3 y 7) y 10 mM (calles 4 y 8).

Según lo reportado anteriormente (Boschi-Muller y col., 2005), se conoce que los sustratos reductores naturales de MsrA o MsrB pueden ser tioles de bajo peso molecular, como por ejemplo GSH, o proteínas tioles, tales como TRX. En el caso de *T. cruzi*, el T(SH)<sub>2</sub> es el tiol de bajo peso molecular mayoritario, el cual reemplaza al GSH en varias funciones fisiológicas (Krauth-Siegel y col., 2008a). En este organismo se ha caracterizado una isoforma de TXN (*TcTXNI*) (Wilkinson y col., 2002a), la cual posee como sustrato reductor específico al T(SH)<sub>2</sub>. En adición, se ha identificado la existencia de una TRX clásica (*TcTRX*), la cual (al igual que *TcTXNI*) posee ubicación citoplasmática (Piattoni y col., 2006). En vista de que las *TcPMSR* recombinantes eran oxidadas por un sustrato fisiológico como la L-MetSO, se investigó la capacidad de *TcTRX* y *TcTXNI* de regenerar a estas proteínas al estado reducido. Como se puede apreciar en la Fig. 4.3.6, la preincubación de *TcPMSR10* o *TcPMSR180* (previamente oxidadas con L-MetSO) con DTT, *TcTRX* o

*TcTXNI*, revirtió la oxidación de ambas proteínas. Este resultado confirma la capacidad de reducción por parte de las proteínas tioles, sugiriendo una posible interacción específica entre sustratos reductores fisiológicos y las *TcPMSR*.

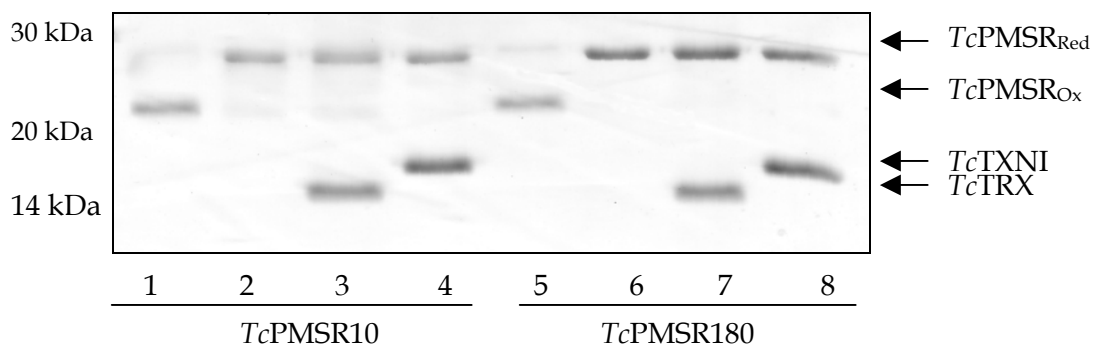


Fig. 4.3.6: Ensayo de reducción de *TcPMSR* por proteínas tiol, revelado en SDS-PAGE no reductor. *TcPMSR10* o *TcPMSR180* (4  $\mu\text{M}$ ) previamente oxidadas con L-MetSO (calles 1 y 5) se preincubaron a 37 °C por 10 min con DTT 1,25 mM (calles 2 y 6); o *TcTRX* 5  $\mu\text{M}$  (calles 3 y 4); o *TcTXNI* 5  $\mu\text{M}$  (calles 4 y 8).

Con el fin de poder evaluar la actividad biológica de *TcPMSR* de forma más analítica, se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando un sistema acoplado que permite seguir la reducción, dependiente de *TcPMSR*, de L-MetSO mediante el monitoreo de la oxidación de NADPH a 340 nm. Como ya se mencionó en Materiales y Métodos (punto 3.7.2.18), se decidió evaluar al sistema acoplado únicamente con *TcTXNI*. La cascada de óxido-reducción consta de tres etapas: 1) la reducción dependiente de NADPH de  $\text{TS}_2$  a  $\text{T(SH)}_2$  mediante la acción de la TR; 2) reducción de *TcTXNI* a expensas de  $\text{T(SH)}_2$ ; 3) reducción de *TcPMSR10/180* por *TcTXNI* reducida y 4) reducción de L-MetSO por estas últimas. Se empleó L-MetSO como sustrato oxidante para *TcPMSR* debido a que, si bien varios informes han evidenciado que estas enzimas reducen preferentemente MetSO de proteínas, poseen capacidad de reducir L-MetSO libre. Otro factor importante en la elección de este sustrato fue su disponibilidad comercial en un alto grado de pureza. En la Fig. 4.3.7 se puede observar que ambas enzimas fueron activas, exhibiendo sólo actividad en presencia de *TcTXNI*. Esto demuestra la necesidad de las *TcPMSR* por *TcTXNI* como mediador en la transferencia de electrones provenientes del  $\text{T(SH)}_2$ , lo que implicaría a *TcTXNI* en una posible función fisiológica en la reducción de MetSO, libre o en proteínas, dentro el parásito. Un punto interesante fue que *TcPMSR180*

exhibió una  $k_{\text{cat app}}$  13 veces menor que  $TcPMSR10$  en las condiciones evaluadas, a pesar que ambas proteínas poseen un alto grado de identidad.

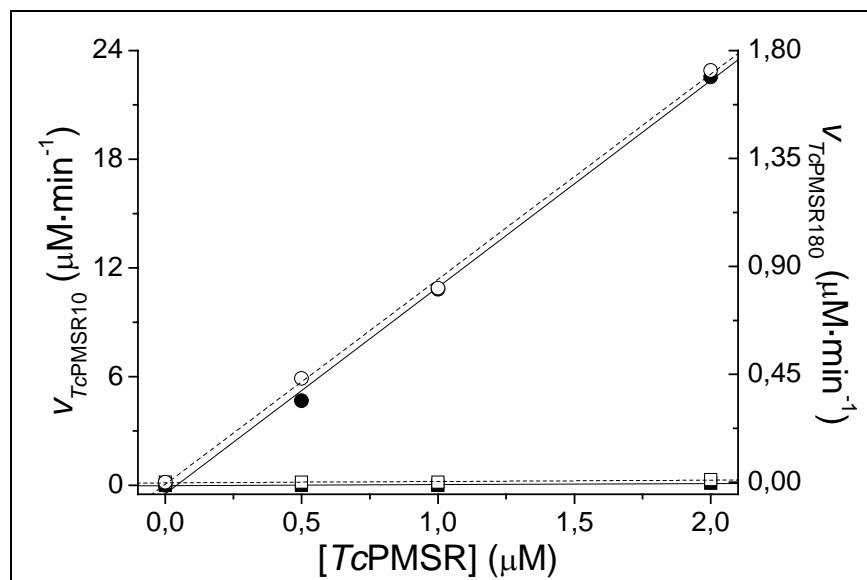


Fig. 4.3.7: Ensayo de actividad enzimática de  $TcPMSR$  acoplado a la oxidación de NADPH. Las condiciones ensayadas fueron pH 7,5 a 30 °C, en presencia de NADPH 300 μM;  $TcTR$  1 U ml<sup>-1</sup>; T(SH)<sub>2</sub> 100 μM; L-MetSO 5 mM; en presencia de diferentes concentraciones de  $TcPMSR10$  (cerrado) o  $TcPMSR180$  (abierto) y en ausencia (cuadrados) o presencia (círculos) de  $TcTXNI$  10 μM.

Para la caracterización cinética en estado estacionario se diseñó un sistema acoplado equivalente al anterior, en donde se reemplazó al T(SH)<sub>2</sub> por GSH y a la  $TcTR$  por GR comercial, debido a las dificultades que existen para la adquisición comercial de tripanotión en el país. Existen trabajos previos que describen el empleo de GSH como un sustrato reductor para TXN de diferentes fuentes (Gommel y col., 1997; Castro y col., 2008). De forma de evaluar las eficiencias de reducción de  $TcTXNI$  y  $TcTRX$  por GSH, se valoró la actividad de estas proteínas utilizando el sistema acoplado arriba mencionado. Como sustrato oxidante se empleó  $TcPMSR10$  dado que era la isoforma que presentó mayor actividad enzimática. En la Tabla 4.3.1 se detallan las eficiencias de reducción de  $TcTXNI$  por ambos tioles. Como se puede observar en la Fig. 4.3.8, la velocidad de reducción de  $TcTXNI$  dependiente de GSH fue lineal en todo el rango de concentración evaluado, indicando una cinética de no saturación para este sustrato reductor. Contrariamente al caso anterior, el GSH no exhibió capacidad de reducir a  $TcTRX$  en el rango de concentraciones ensayadas.

Tiol de bajo peso molecular	$k$ de reducción de $TcTXNI-S_2$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$pK_a$	$E^{\circ'}$ (mV)
$T(SH)_2$	$7,6 \cdot 10^3$ #	7,4*	-242*
GSH	31§	8,3*	-240*

Tabla 4.3.1: Constantes de cinéticas de reducción de  $TcTXNI$  por  $T(SH)_2$  y GSH. (§) Determinado en este trabajo a pH 7,5 y 30 °C. (#) Tomado de Wilkinson y col., 2002. (\*) Valores tomado de Schmidt y col., 2003.

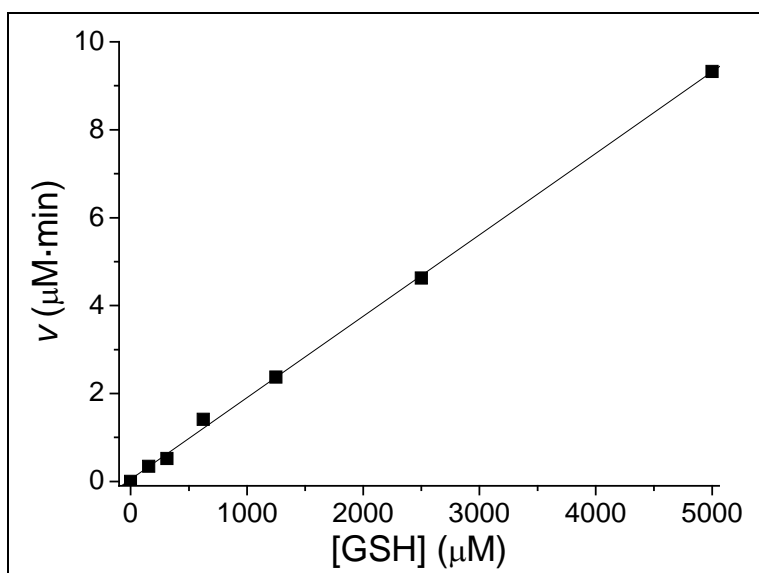


Fig. 4.3.8: Cinética de reducción de  $TcTXNI$  por GSH. Los ensayos se realizaron a 30 °C a pH 7,5 en presencia de diferentes concentraciones de GSH;  $TcTXNI$  1  $\mu M$ ;  $TcPMSR10$  4  $\mu M$  y L-MetSO 5 mM.

Con el fin de corroborar que las condiciones experimentales del nuevo ensayo eran las apropiadas para la caracterización cinética de las  $TcPMSR$ , se evaluó la actividad de ambas enzimas utilizando al sistema GSH como dador de electrones para la  $TcTXNI$ . Como se expone en la Fig. 4.3.9, nuevamente, la actividad enzimática de ambas  $TcPMSR$  es proporcionalmente lineal en el rango de concentraciones evaluadas. De forma similar al experimento anterior,  $TcPMSR180$  exhibió una  $k_{cat\ app}$  15 veces menor que  $TcPMSR10$ . En la Tabla 4.3.2 se exponen las actividades enzimáticas obtenidas para cada  $TcPMSR$  evaluadas con ambos ensayos acoplados, obteniéndose respuestas similares.

Enzima	$k_{cat\ app}$ con sistema tripanotión ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat\ app}$ con sistema glutatión ( $\text{min}^{-1}$ )	Relación
<i>TcPMSR10</i>	11,4	11,1	1,03
<i>TcPMSR180</i>	0,85	0,72	1,18

Tabla 4.3.2: Números de recambio aparentes obtenidos para *TcPMSR* utilizando sistema tripanotión y glutatión. Los ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7,5, en presencia de *TcTXNI* 10  $\mu\text{M}$  y L-MetSO 5 mM.

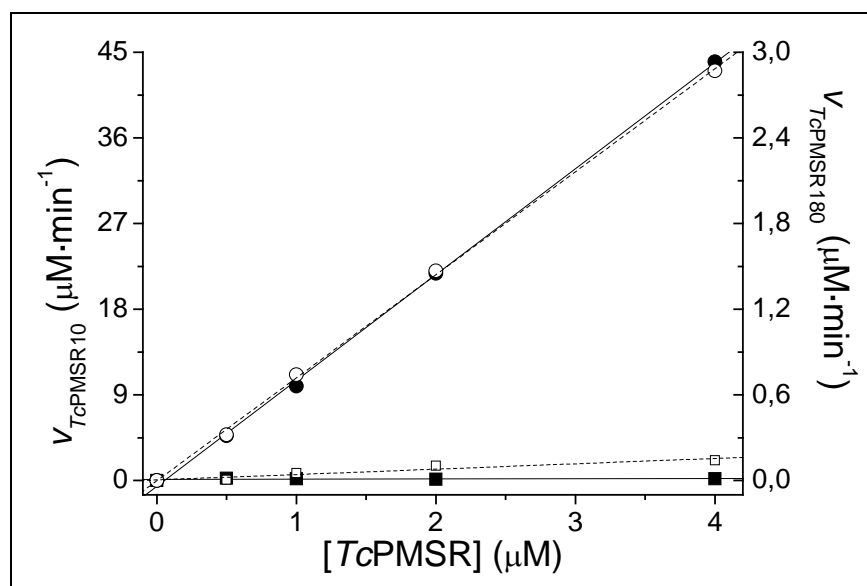


Fig. 4.3.9: Ensayo de actividad enzimática de *TcPMSR* acoplado a la oxidación de NADPH utilizando sistema glutatión. Las condiciones ensayadas fueron pH 7,5 a 30 °C, en presencia de NADPH 300  $\mu\text{M}$ ; GR comercial 1 U  $\text{ml}^{-1}$ ; GSH 3 mM; L-MetSO 5 mM; en presencia de diferentes concentraciones de *TcPMSR10* (sólidos) o *TcPMSR180* (vacíos) y en ausencia (cuadrados) o presencia (círculos) de *TcTXNI* 10  $\mu\text{M}$ .

#### 4.3.3. Caracterización cinética en estado estacionario de *TcPMSR*.

Para los estudios cinéticos en estado estacionario se empleó el sistema acoplado dependiente de GSH para la reducción de *TcTXNI* evaluado en el punto anterior. De forma similar a otras MsrA de diferentes especies (Boschi-Muller y col., 2005), los gráficos de dobles recíprocos de la velocidad inicial a concentraciones variables de L-MetSO con diferentes concentraciones fijas de *TcTXNI* como sustrato reductor, tanto para *TcPMSR10* (Fig. 4.3.10) como para *TcPMSR180* (Fig. 4.3.11) generaron rectas paralelas lo que indicaron que estas enzimas siguen un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong” o de doble sustitución. Es de destacar que estos estudios demostraron que estas enzimas poseen



perfiles cinéticos diferentes. *TcPMSR10* presentó una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten con relación a *TcTXNI* y L-MetSO; por el contrario, *TcPMSR180* mostró una cinética de no saturación respecto a los sustratos en estudio. Los resultados obtenidos concuerdan con reportes previos de enzimas de otras fuentes (Boschi-Muller y col., 2005), que muestran una cinética de no saturación para este tipo de enzimas cuando se empleó como sustrato reductor al DTT (Boschi-Muller y col., 2001). Los parámetros cinéticos para *TcPMSR10* y *TcPMSR180* recombinantes son expuestos en la Tabla 4.3.3.

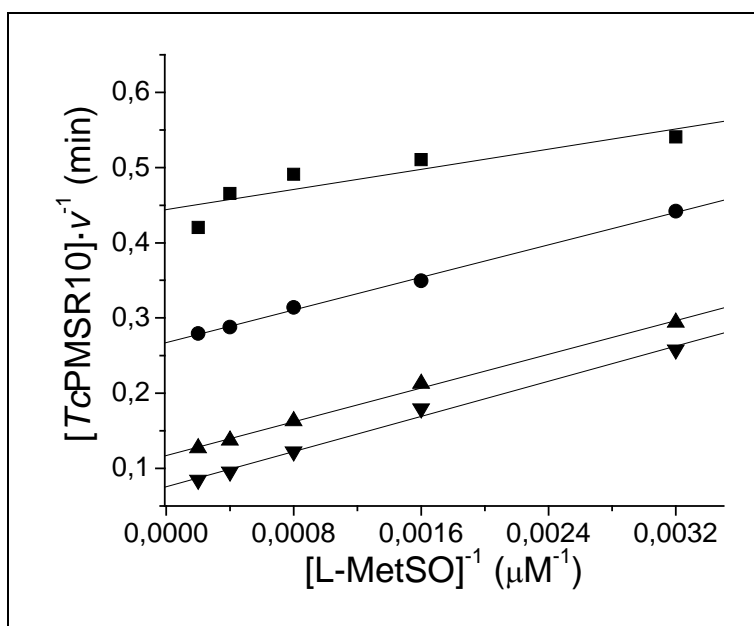


Fig. 4.3.10: Análisis cinético de *TcPMSR10*. Las reacciones se realizaron a 30 °C y pH 7,5 en presencia de *TcPMSR10* 0,5 μM; L-MetSO desde 300 a 5000 μM; y diferentes concentraciones de *TcTXNI*: (!) 2,5; (,) 5; (7) 10 y (B) 20 μM.

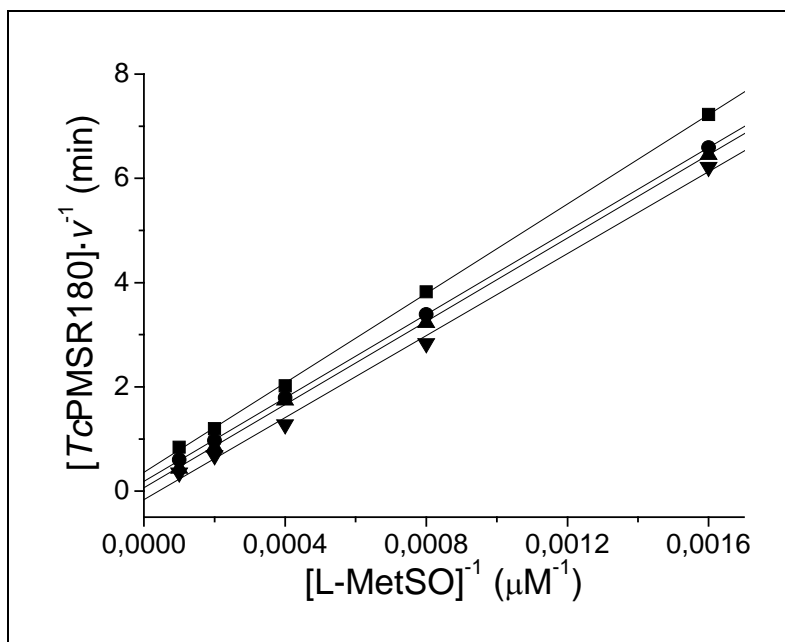
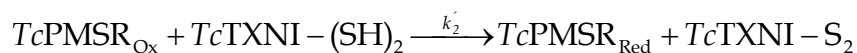
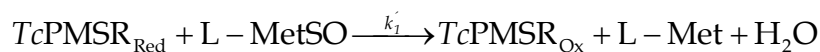


Fig. 4.3.11: Análisis cinético de *TcPMSR180*. Las reacciones se realizaron a 30 °C y pH 7,5 en presencia de *TcPMSR180* 2 μM; L-MetSO desde 300 a 5000 μM; y diferentes concentraciones de *TcTXNI*: (!) 0,5; (,) 1; (7) 2 y (B) 4 μM.

Enzima	Sustrato	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
<i>TcPMSR10</i>	L-MetSO	31,5	1447	$3,6 \cdot 10^2$ ( $k'_1$ )
	<i>TcTXNI</i>	31,5	33,3	$1,8 \cdot 10^4$ ( $k'_2$ )
<i>TcPMSR180</i>	L-MetSO	N.D.	N.D.	4,3 ( $k'_1$ )*
	<i>TcTXNI</i>	N.D.	N.D.	$7,7 \cdot 10^4$ ( $k'_2$ )*

Tabla 4.3.3: Parámetros cinéticos de *TcPMSR* recombinantes, determinados a 30 °C y pH 7,5. N.D.: no determinables por falta de saturación. \*Calculado a partir de la pendiente del gráfico secundario  $V_{m_{app}}$  en función de [*TcTXNI*].

Como se mencionó anteriormente, estas enzimas exhibieron un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong”, el cual se puede describir como una serie de reacciones en dos etapas independientes:



A partir de las eficiencias catalíticas calculadas expuestas en la Tabla 4.3.3 se puede concluir que para ambas enzimas la etapa lenta de reacción es la reducción de L-MetSO. En adición, es de destacar que *TcPMSR10* fue 100 veces más eficiente que *TcPMSR180* en la reducción de este compuesto. Probablemente, las diferencias en los residuos aminoacídicos que presenta *TcPMSR180* respecto a *TcPMSR10* (Fig. 4.3.1), modifiquen la unión del sulfóxido a la enzima o el proceso de catálisis en si mismo. No obstante, estas diferencias en la composición aminoacídicas, aparentemente, no interfirieron en la interacción entre la enzima y la *TcTXNI*, dado que se obtuvieron eficiencias catalíticas similares para ambas isoenzimas.

A fin de poder efectuar un estudio cinético más completo, se realizaron curvas de saturación del sustrato en estudio manteniendo constante la concentración del cosustrato, estas curvas se muestran en las Fig. 4.3.12 y Fig. 4.3.13. A partir de estos ensayos se pudo determinar que *TcPMSR180* posee 50 veces más afinidad aparente por *TcTXNI* que *TcPMSR10*, y que presentó inhibición por sustrato a concentraciones de *TcTXNI* mayores de 10  $\mu\text{M}$ . Contrariamente, *TcPMSR10* mostró mayor afinidad aparente por L-MetSO que *TcPMSR180*, la cual no presentó saturación en el rango de concentraciones ensayadas (hasta 5 mM) del sustrato oxidante. Los parámetros cinéticos determinados se exponen en la Tabla 4.3.4.

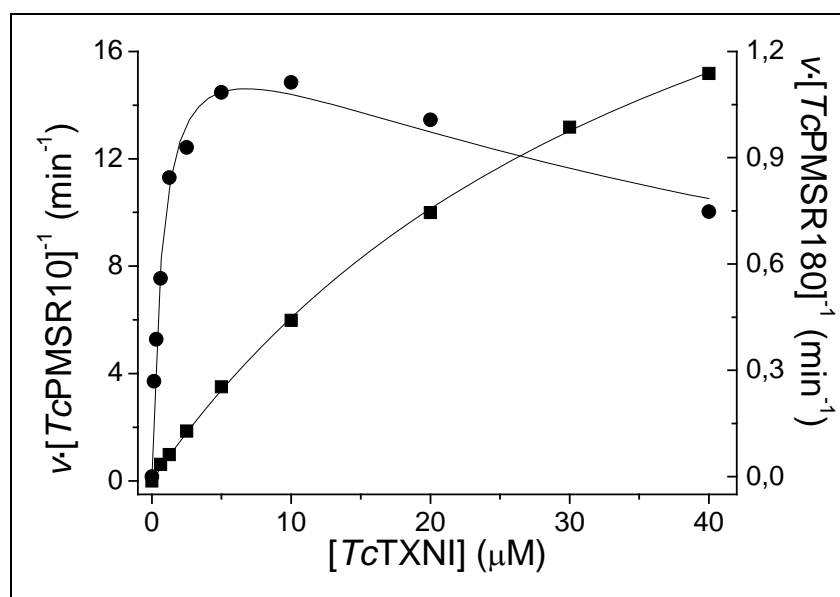


Fig. 4.3.12: Curvas de saturación de *TcTXNI*. Los ensayos se realizaron en presencia de (!) *TcPMSR10* 0,5  $\mu\text{M}$  o (.) *TcPMSR180* 4  $\mu\text{M}$ ; L-MetSO 5 mM y diferentes concentraciones de *TcTXNI* a 30 °C y pH 7,5.

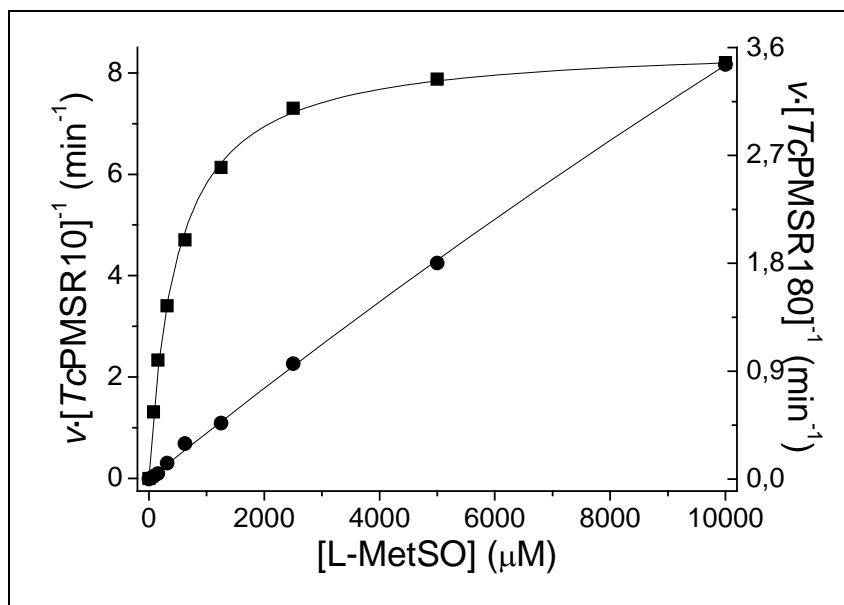


Fig. 4.3.13: Curvas de saturación de L-MetSO. Los ensayos se realizaron en presencia de (!) *TcPMSR10* 0,5  $\mu\text{M}$  o (.) *TcPMSR180* 2  $\mu\text{M}$ ; *TcTXNI* 10  $\mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de L-MetSO a 30 °C y pH 7,5.

Sustrato	Parámetro	Cosustrato	<i>TcPMSR10</i>	<i>TcPMSR180</i>
L-MetSO	$k_{\text{cat app L-MetSO}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	<i>TcTXNI</i>	8,58	N.D.
	$K_{\text{m app L-MetSO}}$ ( $\mu\text{M}$ )		474	> 10000
	$k_{\text{cat app}} \cdot K_{\text{m app}}^{-1}$ L-MetSO ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	10 $\mu\text{M}$	$3 \cdot 10^2$	5,77
<i>TcTXNI</i>	$k_{\text{cat app TcTXNI}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	L-MetSO	24,71	1,19
	$K_{\text{m app TcTXNI}}$ ( $\mu\text{M}$ )		32,85	0,62
	$k_{\text{cat app}} \cdot K_{\text{m app}}^{-1}$ <i>TcTXNI</i> ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )		5 mM	$1,2 \cdot 10^4$
	$K_{\text{is TcTXNI}}$ ( $\mu\text{M}$ )		---	56

Tabla 4.3.4: Parámetros cinéticos aparentes de *TcPMSR* recombinantes, determinados a 30 °C y pH 7,5. N.D.: no determinable.

Las diferencias observadas en la afinidad por los sustratos entre estas isoenzimas, podría deberse a diferencias en el perfil de cargas superficiales que presentan cada una de ellas. Esta última observación se basa en un análisis predictivo *in silico* (Vector NTI v9.0) que permitió estimar valores de *pI* significativamente diferentes: 6,14 para *TcPMSR10* y 7,28 para *TcPMSR180*. Esta diferencia de una unidad en el *pI* podría afectar en la

interacción de las enzimas con sus sustratos dependiendo del pH al que se realiza la reacción. Como se puede apreciar en la Fig. 4.3.14, ambas enzimas presentaron perfiles de actividad enzimática similares, exhibiendo pH óptimos entre 7,2 a 7,5. No obstante, *TcPMSR180* fue más activa que *TcPMSR10* a pH más alcalinos.

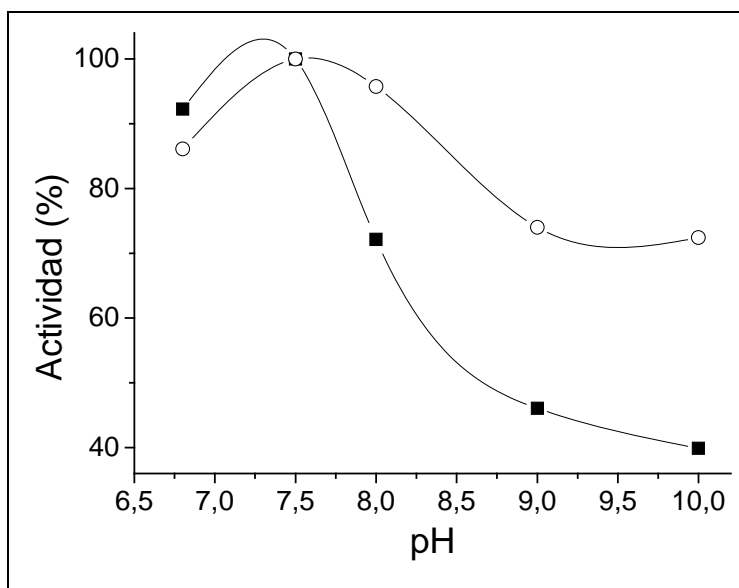


Fig. 4.3.14: Perfil de actividad enzimática de (○) *TcPMSR10* y (■) *TcPMSR180* en función del pH.

Se observó ausencia de un efecto inhibitorio significativo del producto de reacción (L-Met) sobre la actividad de las *TcPMSR*. Como se muestra en la Fig. 4.3.15, aún en presencia de 400 veces más de L-Met respecto a L-MetSO, no se observó ningún tipo de inhibición sobre la actividad de ambas enzimas. Esto indicaría que tanto *TcPMSR10* como *TcPMSR180* poseerían muy baja afinidad por la L-Met, o posiblemente, la reacción presenta un alto grado de irreversibilidad.

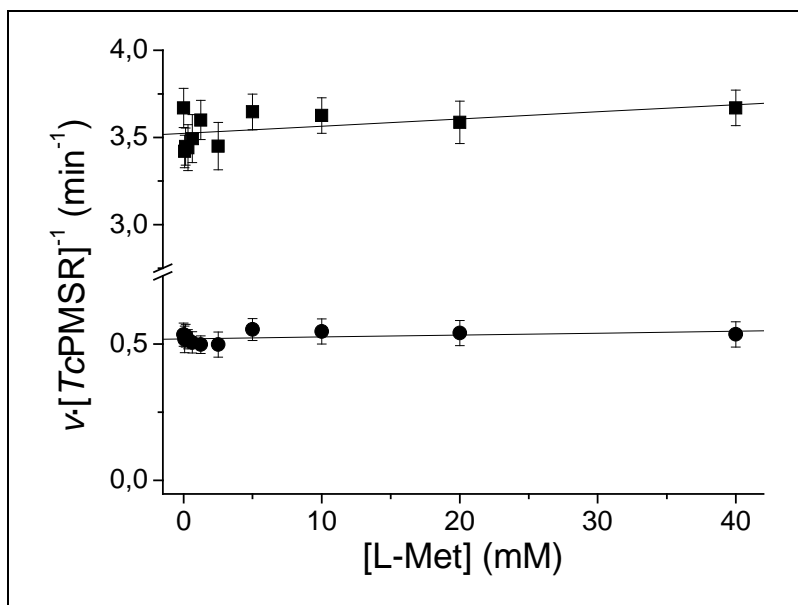


Fig. 4.3.15: Efecto de la L-Met sobre la actividad de *TcPMSR*. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y pH 7,5, en presencia de *TcTXNI* 10  $\mu\text{M}$ ; L-MetSO 0,1 mM; (□) *TcPMSR10* 0,5  $\mu\text{M}$  o (○) *TcPMSR180* 2  $\mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de L-Met.

#### 4.3.4. Titulación redox de *TcPMSR*.

Con el fin de evaluar propiedades termodinámicas de ambas *TcPMSR*, se realizaron titulaciones redox mediante incubaciones de las proteínas con diferentes relaciones de GSH/GSSG. Las proporciones de las especies oxidadas y reducidas fueron resueltas por SDS-PAGE no reductor, como se describe en el punto 3.7.5, y estimadas mediante densitometría. Con estos datos se construyó una gráfica de fracción reducida en función del potencial de reducción (generado para cada combinación de GSH/GSSG a 33 °C y pH 7,5). En la Fig. 4.3.16-A se muestra el perfil de bandas obtenidas para *TcPMSR10* y *TcPMSR180*, respectivamente. A partir de la gráfica de titulación (Fig. 4.3.16-B) se determinó el  $E_{m7,5}$  global de  $-176 \pm 5$  mV para *TcPMSR10* y de  $-178 \pm 5$  mV para *TcPMSR180*. Como se puede observar, ambos potenciales redox son iguales (dentro de los errores experimentales), lo que indicaría que las discrepancias en las propiedades cinéticas observadas no se deberían, en principio, a diferencias en las capacidades redox (reactividad) de los residuos de cisteína que participan en el ciclo catalítico de estas enzimas.

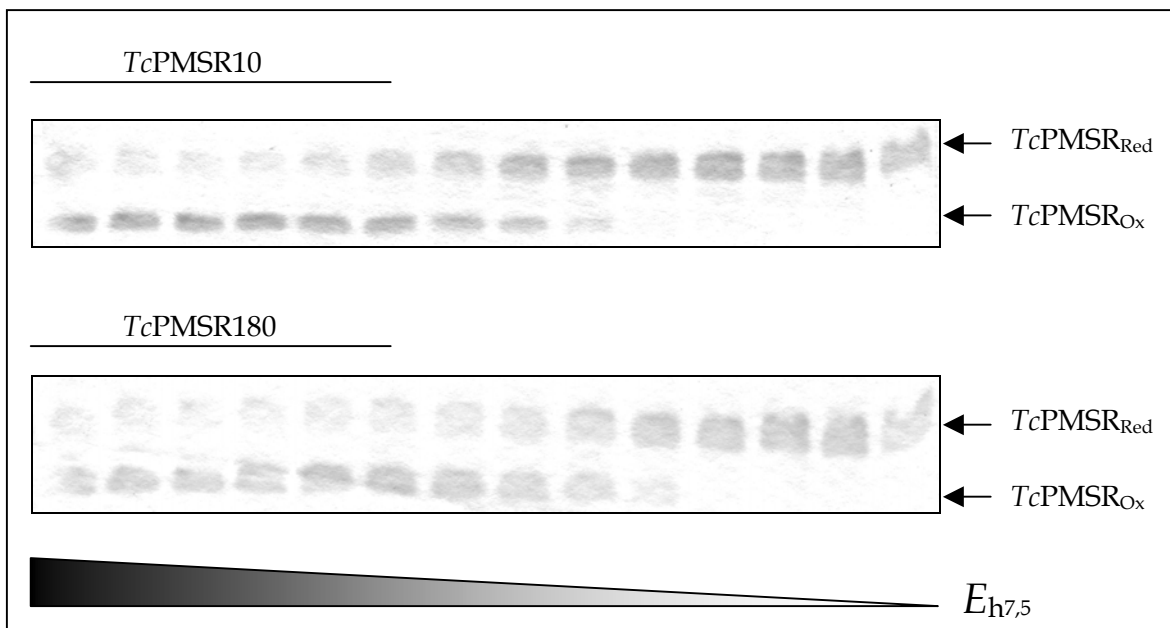


Fig. 4.3.16-A: Perfil de titulación redox de *TcPMSR* revelado por SDS-PAGE no reductor. Las proteínas se incubaron con diferentes relaciones de GSH/GSSG a 33 °C a pH 7,5 por 4 h.

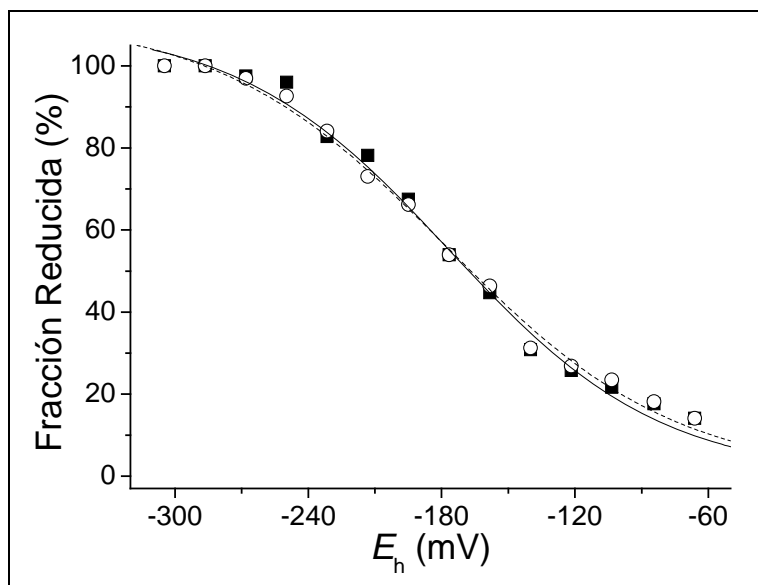
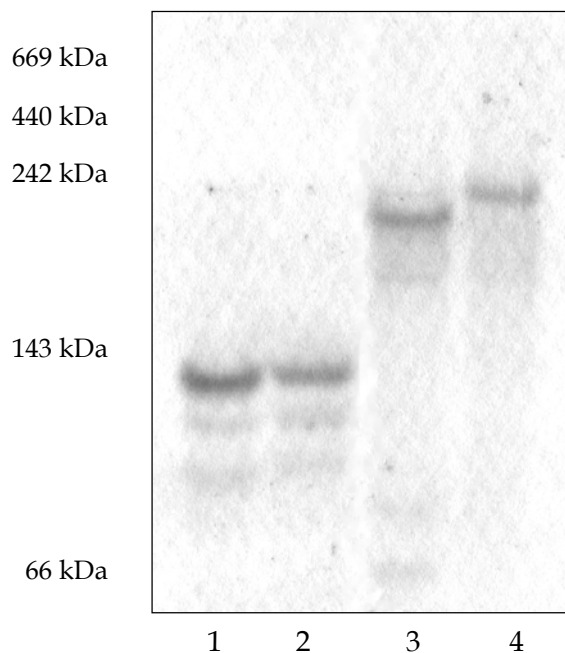


Fig. 4.3.16-B: Curvas de titulación redox de *TcPMSR10* (○) y *TcPMSR180* (■).

#### 4.3.5. Determinación de la masa molecular nativa de *TcPMSR*.

Las estimaciones de las masas moleculares nativas de *TcPMSR10* y *TcPMSR180* se efectuaron mediante corridas en PAGE nativos, siguiendo el método de Ferguson (ver punto 3.7.1), en diferentes condiciones redox. En la Fig. 4.3.17 se presenta el perfil

electroforético de ambas proteínas en estado reducido y oxidado, pudiéndose observar que *TcPMSR180* posee una migración menor que *TcPMSR10*. Al graficar el logaritmo de la movilidad electroforética relativa ( $\text{Log } R_f$ ) para cada proteína en función de la concentración de gel utilizado (%T) (Fig. 4.3.18-A), se puede observar que se obtienen rectas paralelas, lo que indicaría que ambas proteínas (tanto en estado reducido como oxidado) poseen la misma masa molecular (Rodbard y col., 1970; Chrambach y col., 1971). Por el contrario, se observó una diferencia importante en los valores de las ordenadas al origen de este gráfico para *TcPMSR10* y *TcPMSR180* (Fig. 4.3.18-B). El valor de la ordenada es el logaritmo de la movilidad electroforética libre, en ausencia de soporte (sin efecto tamiz), el cual está relacionado con la distribución de cargas superficiales de la proteína a un pH determinado. Se pudo inferir que *TcPMSR180* posee un valor menor de movilidad electroforética libre que *TcPMSR10*, lo que indicaría que esta primera posee menor carga neta al pH de trabajo que la segunda. Este efecto se correlaciona con los valores de  $pI$  predichos, siendo *TcPMSR10* más ácida que su isoforma. Esto muestra que la diferencia de migración electroforética observada se debe principalmente a las cargas superficiales distintas exhibidas por las proteínas y no a una diferencia de masas moleculares.



**Fig. 4.1.17:** Determinación de la masa molecular nativa de *TcPMSR*. Las proteínas fueron corridas en PAGE nativo al 6% y teñida con Coomassie blue en distintas condiciones; 1) *TcPMSR10* preincubada con DTT 10 mM; 2) *TcPMSR10* preincubada con L-MetSO 10 mM; 3) *TcPMSR180* preincubada con DTT 10 mM y 4) *TcPMSR180* preincubada con L-MetSO 10 mM.



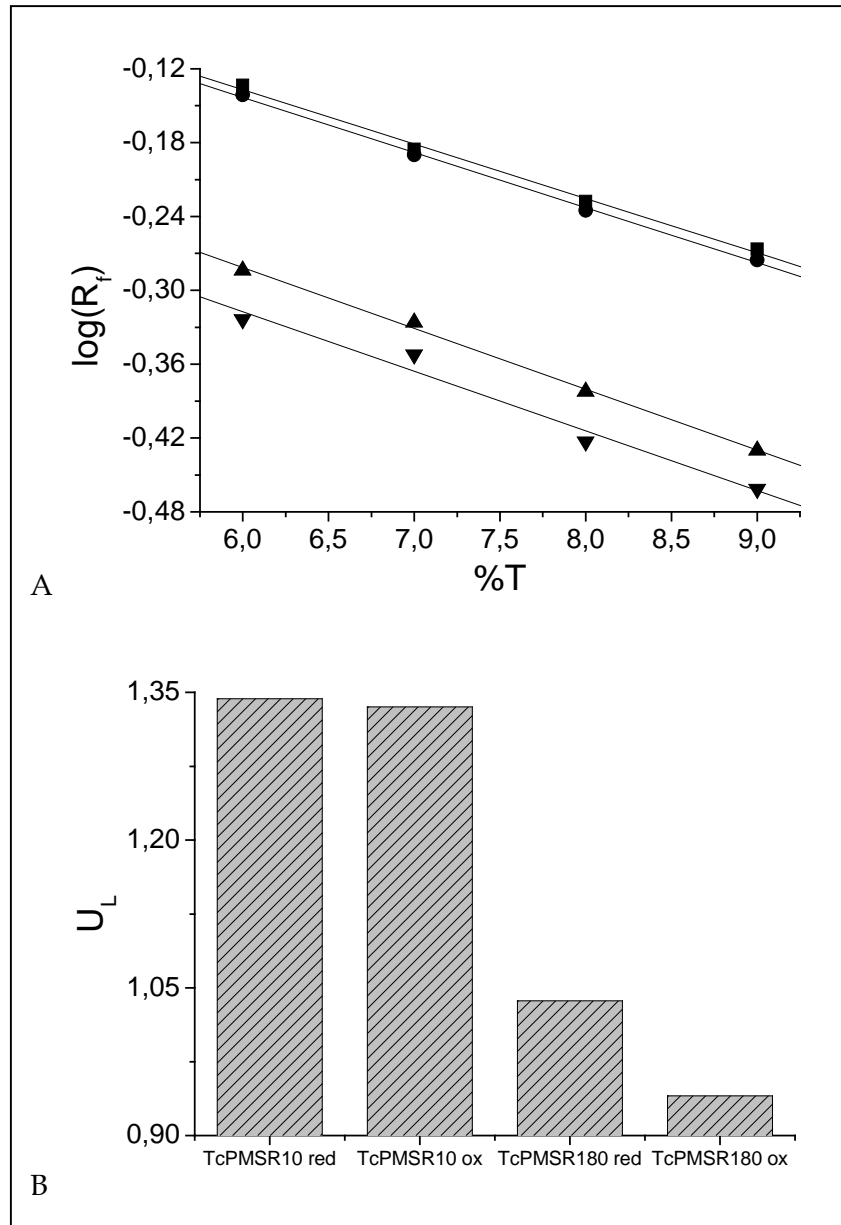


Fig. 4.3.18: A) Gráfico de Ferguson primario para (!) *TcPMSR10* preincubada con DTT 10 mM; (,) *TcPMSR10* preincubada con L-MetSO 10 mM; (7) *TcPMSR180* preincubada con DTT 10 mM y (B) *TcPMSR180* preincubada con L-MetSO 10 mM. B) Gráfico en barras de valores de movilidad electroforética libre ( $U_L$ ) para cada proteína en estado reducido y oxidado.

Mediante el uso de patrones de masa molecular conocida, se construyó una curva de calibrado utilizando el logaritmo de las masas moleculares ( $\log MW$ ) en función de la raíz cuadrada de los coeficientes de retardo ( $K_D^{0,5}$ ) estimados para cada patrón (Fig. 4.3.19). A partir de los valores de  $K_D$  obtenidos del gráfico de Ferguson primario para las *TcPMSR* (Fig. 4.3.17) se estimaron sus masas moleculares, en aproximadamente 24 kDa para

*TcPMSR*10 y 30 kDa para *TcPMSR*180. Estos valores indicarían que ambas proteínas poseen una estructura nativa monomérica, similar a lo reportado para este tipo de enzimas de otras fuentes (Taylor y col., 2003; Kauffmann y col., 2005; Coudeville y col., 2007).

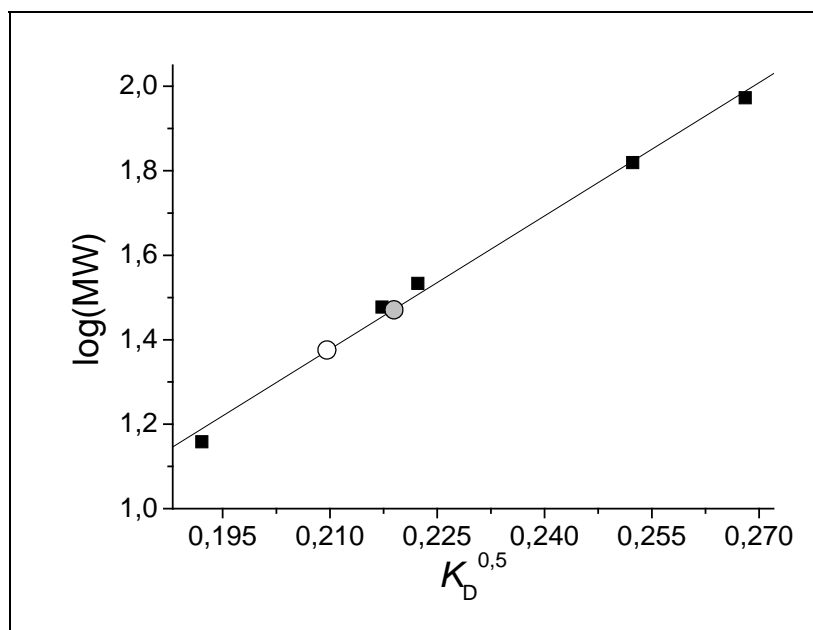
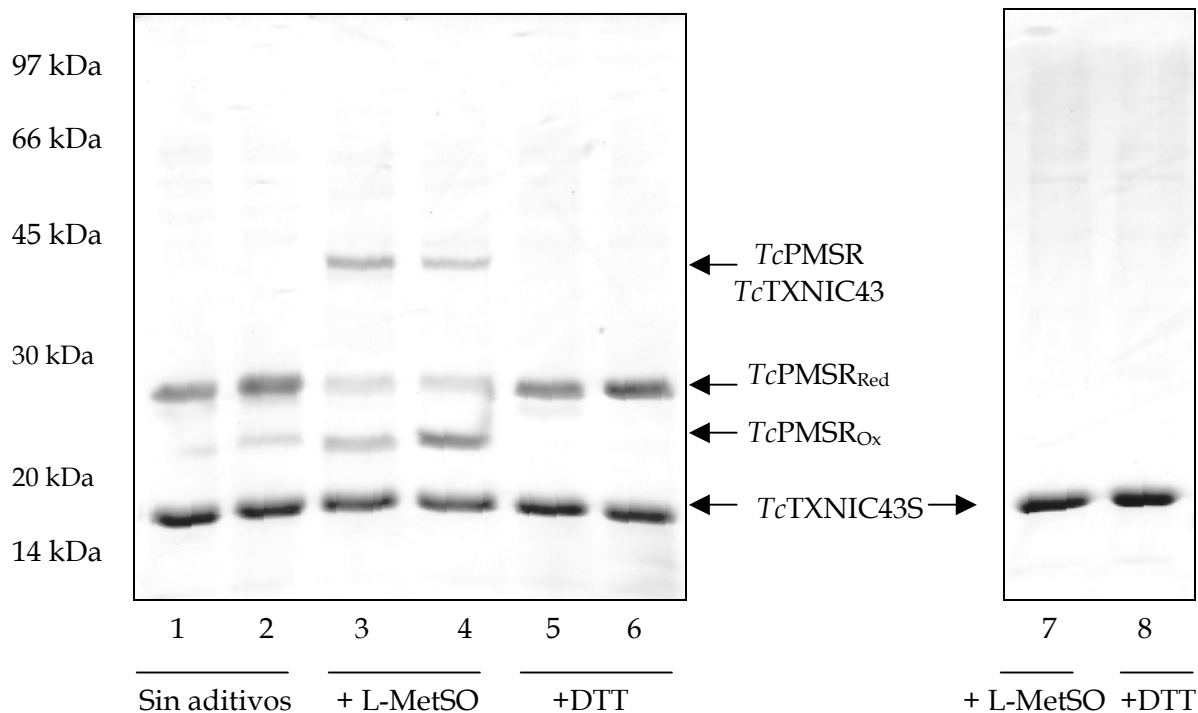


Fig. 4.3.19: Determinación de masas moleculares nativas de *TcPMSR*. El gráfico de Ferguson secundario fue generado al graficar la raíz cuadrada del coeficiente de retardo en función de la masa molecular de proteínas patrones (!). Los coeficientes de retardo calculados para *TcPMSR*10 y *TcPMSR*180 fueron de 0,0442 (O) y 0,0495 (.), respectivamente. Los valores de  $K_D$  determinados se correlacionaron con una masa molecular estimada de 24 kDa para *TcPMSR*10 y de 30 kDa para *TcPMSR*180.

#### 4.3.6. Estequiometría de la interacción *TcPMSR-TcTXNI*.

Con el fin de evaluar la estequiometría de la reacción entre *TcPMSR*<sub>Ox</sub> y *TcTXNI*<sub>Red</sub>, se generó la mutante *TcTXNIC43S*, a la cual se le mutó la cisteína resolutive (Cys<sup>43</sup>) por un residuo de serina. Esta mutación hace a esta proteína perder la capacidad de romper el puente disulfuro mixto que se genera durante el ciclo catalítico, estabilizándose los complejos proteicos formados entre ella y sus sustratos disulfuros. Como se muestra en la Fig. 4.3.20, en la condición donde se preincubaron a las *TcPMSR* en presencia de L-MetSO con *TcTXNIC43S* se obtuvo un complejo covalente de aproximadamente 40 kDa para ambas isoenzimas. Las masas moleculares calculadas a partir de las secuencias de aminoácidos, *TcTXNI* 17 kDa y *TcPMSR* 23 kDa, indicarían que el complejo covalente obtenido se compone de una relación 1:1 para las proteínas en cuestión, no observándose

la presencia de complejos de mayor tamaño. Los controles del ensayo indicaron la necesidad de la oxidación previa de la *TcPMSR* para la interacción con *TcTXNIC43S*; así como la incubación con DTT impidió la formación del complejo covalente, como se muestra en la Fig. 4.3.20. En adición, la movilidad electroforética de *TcTXNIC43S* no fue afectada por la presencia de DTT o de L-MetSO (Fig. 4.3.20), verificando así el resultado obtenido.



**Fig. 4.3.20:** Estequiometría de la interacción entre *TcPMSR* y *TcTXNIC43S*. Se preincubaron *TcPMSR*10 5  $\mu$ M (calle 1, 3 y 5) o *TcPMSR*180 5  $\mu$ M (calle 2, 4 y 6) con *TcTXNIC43S* 10  $\mu$ M en diferentes condiciones. Como control se preincubó *TcTXNIC43S* en presencia de L-MetSO o DTT (calle 7 y 8, respectivamente).

#### 4.3.7. Determinación de la expresión de *TcPMSR* en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* CL-Brener.

Para evaluar la presencia de las proteínas en las diferentes estadios del ciclo de vida del parásito se efectuó un experimento de *western blot* donde se utilizó un anticuerpo policlonal anti-*TcPMSR*10 recombinante producido en conejo, contra extractos totales de *T. cruzi* epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes. Como se puede observar en la

Fig. 4.3.21, las señales positivas sólo fueron detectadas en extractos de epimastigotes y amastigotes, no detectándose señal en tripomastigotes. Estos resultados indican que al menos una de las *TcPMSR* se encuentra presente en los estadios replicativos del parásito, esto debido a que el anticuerpo empleado reconoce ambas proteínas recombinantes con igual intensidad (resultados no mostrados), dado el alto porcentaje de identidad que poseen ambas isoformas.

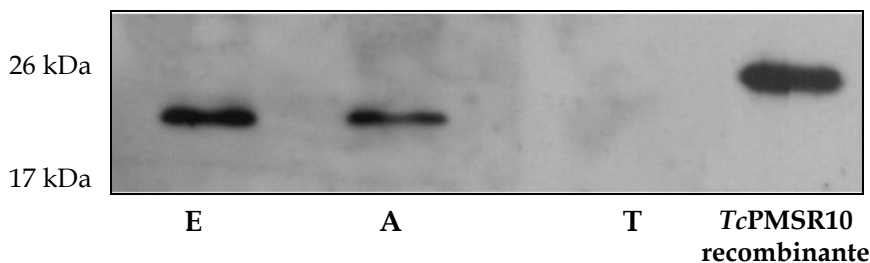


Fig. 4.3.21: Ensayo de *western blot* para la identificación de *TcPMSR* en diferentes estadios de *T. cruzi* CL-Brener. Aproximadamente 40  $\mu$ g de extractos proteicos de las formas epimastigote (E), amastigote (A) y tripomastigote (T) y 50 ng de *TcPMSR10* recombinante fueron separadas por SDS-PAGE al 15% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las bandas fueron reveladas utilizando un anticuerpo primario anti-*TcPMSR10* policlonal en dilución 1/500 y posteriormente empleando el reactivo de detección ECL *Western blotting Substrate* (PerkinElmer).

#### 4.3.8. Inmunolocalización celular de *TcPMSR* en *T. cruzi*.

Con el objeto de efectuar una mejor caracterización *in vivo* de estas proteínas, se realizaron ensayos de inmunolocalización de las *TcPMSR* en células de epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener, utilizando anticuerpos policlonales anti-*TcPMSR10*. Las imágenes obtenidas, tanto de la microscopía de epifluorescencia (Fig. 4.3.22) como de la microscopía confocal (Fig. 4.3.23), revelaron señales de reconocimiento distribuidas en toda la célula del parásito, lo que indicaría, una ubicación citoplasmática de, al menos, una de las isoformas de la proteína. La localización celular de las *TcPMSR* resulta ser la esperada, estando de acuerdo con lo informado previamente por otros autores sobre la ubicación celular de este tipo de proteínas en otros organismos (Moskovitz y col., 2001; Vouquier y col., 2003).

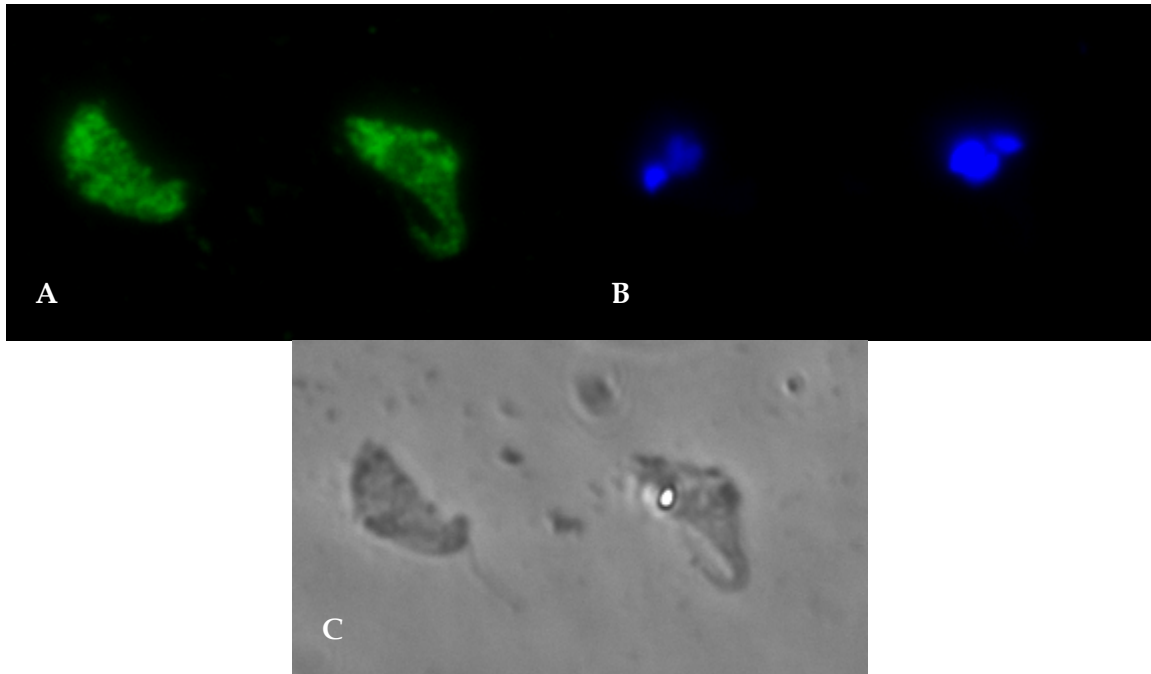


Fig. 4.3.22: Microscopía de epifluorescencia de células de epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-TcPMSR10 (A) tinción fluorescente utilizando anticuerpos primarios y secundario conjugado a FITC; (B) tinción nuclear fluorescente utilizando DAPI y (C) microscopía directa.

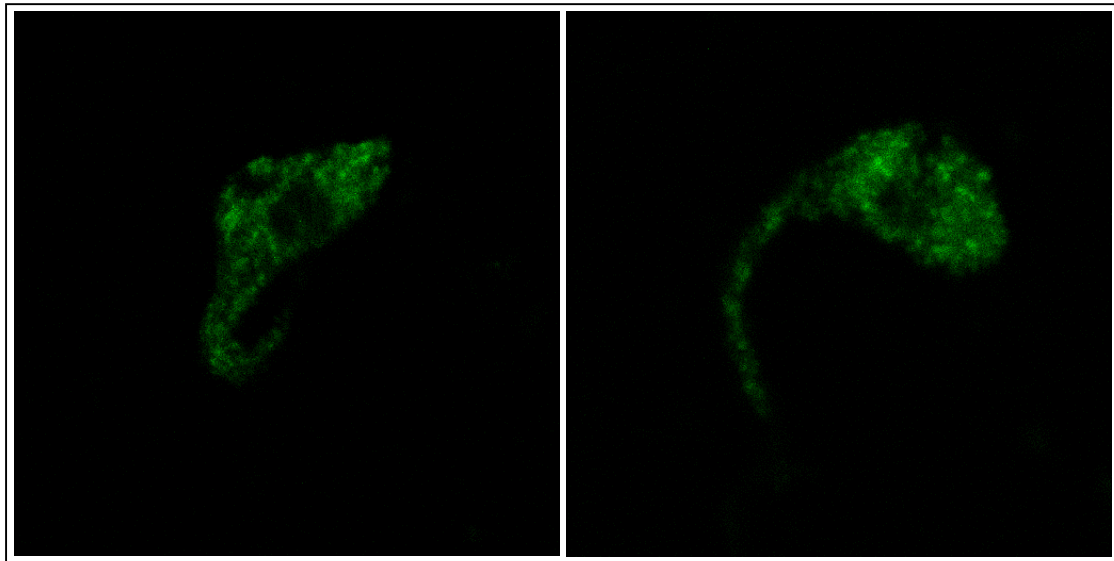


Fig. 4.3.23: Microscopía confocal de barrido por láser (CLSM) de células de epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener utilizando anticuerpo policlonal anti-TcPMSR10. Las imágenes de la localización celular de TcPMSR muestran una marca intensa a nivel citoplasmático (3,8  $\mu\text{m}$  de profundidad). Los controles negativos se realizaron utilizando el conjugado solo, sin visualizarse tinción (no mostrado).

#### 4.3.9. Sobreexpresión de *TcPMSR10* en células de epimastigotes de *T. cruzi*.

Con el fin de estudiar el posible rol de las *TcPMSR* en el parásito se realizó la sobreexpresión la proteína recombinante en células de epimastigotes. Se transformaron epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener con la construcción recombinante [pTEX/*TcPMSR10*], como se describió en el punto 3.9.2. Como controles de transformación se realizaron transfecciones de las células con el vector vacío (pTEX) y con la construcción [pTEX/GFP]. Mediante pasajes sucesivos durante 60 días en presencia del antibiótico G418 se logró la selección completa de las líneas celulares, evidenciándose por la obtención de una población completa de parásitos fluorescentes, en la línea celular transformada con la construcción [pTEX/GFP]. Los parásitos transformados no exhibieron diferencias significativas en morfología (no mostrado) ni en velocidad de crecimiento respecto a las células no transformadas (ver Fig. 4.3.24 y Tabla 4.3.5). Por otra parte, mediante ensayos de *western blot* se verificó que la línea celular transformada con la construcción [pTEX/*TcPMSR10*] presentaba un alto nivel de expresión de la proteína, entre 15 y 20 veces, respecto a la línea transformada con el vector vacío (pTEX), como se muestra en la Fig. 4.3.25.

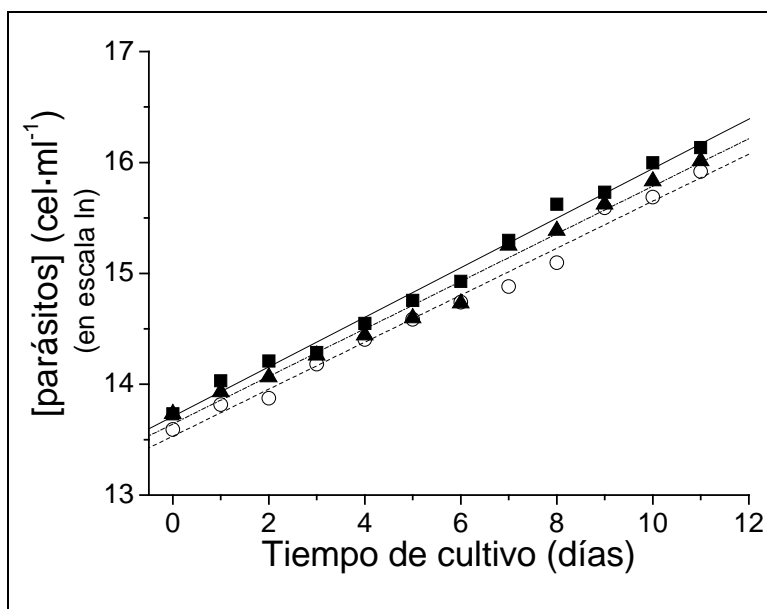
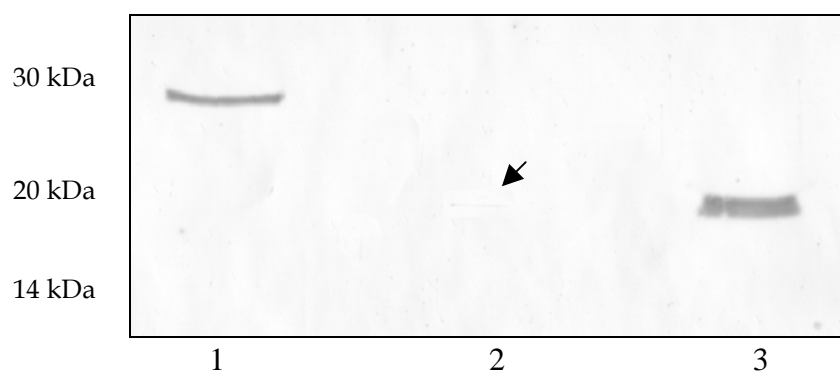


Fig. 4.3.24: Curvas de crecimiento de diferentes líneas celulares de *T. cruzi* CL-Brener: (!) no transformada; (-) transformada con [pTEX] y (7) transformada con construcción [pTEX/*TcPMSR10*]. Los parásitos se cultivaron en medio LIT suplementado con hemina  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  y suero fetal bovino al 10% a  $28^\circ\text{C}$ . Las líneas transformadas se cultivaron en presencia de G418  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Línea celular	$\mu$ (días <sup>-1</sup> )
No transformada	0,223 $\pm$ 0,007
Transformada con [pTEX]	0,212 $\pm$ 0,008
Transformada con [pTEX/ <i>TcPMSR10</i> ]	0,214 $\pm$ 0,008

**Tabla 4.3.5:** Velocidades de crecimiento específicas ( $\mu$ ) de las diferentes líneas celulares. Los parásitos fueron crecidos en medio LIT suplementado con hemina 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y suero fetal bovino al 10% a 28 °C. Los parásitos transformados fueron crecidos en presencia de G418 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .



**Fig. 4.3.25:** Ensayo de *western blot* de epimastigotes de *T. cruzi* CL-Brener transformados. Se sembraron aproximadamente, 1) 6  $\mu\text{g}$  de *TcPMSR10* recombinante, 2) extracto crudo proveniente de  $8 \cdot 10^5$  parásitos transformados con pTEX y 3) extracto crudo proveniente de  $8 \cdot 10^5$  parásitos transformados con la construcción recombinante [pTEX/*TcPMSR10*]. Las bandas fueron reveladas utilizando un anticuerpo primario anti-*TcPMSR10* policlonal en dilución 1/500 y posteriormente utilizando anti-*rabbit* conjugado con peroxidasa.

Para investigar si la sobreexpresión de *TcPMSR10* podría conferir resistencia al estrés oxidativo, se estudió el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el crecimiento de los epimastigotes que sobreexpresan *TcPMSR10* y los transformados con el vector vacío. Como se muestra en la Fig. 4.3.26, la línea celular que sobreexpresa la proteína presenta alrededor de 1,85 veces más tolerancia al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presentando un  $\text{IC}_{50}$  de  $141 \pm 6 \mu\text{M}$ , mientras que el cultivo control (transformado con el pTEX) exhibió un  $\text{IC}_{50}$  de  $76 \pm 3 \mu\text{M}$ . La diferencia observada en los valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos en el ensayo de sensibilidad entre las diferentes líneas celulares, fue estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ), evaluada mediante la prueba t-Student.

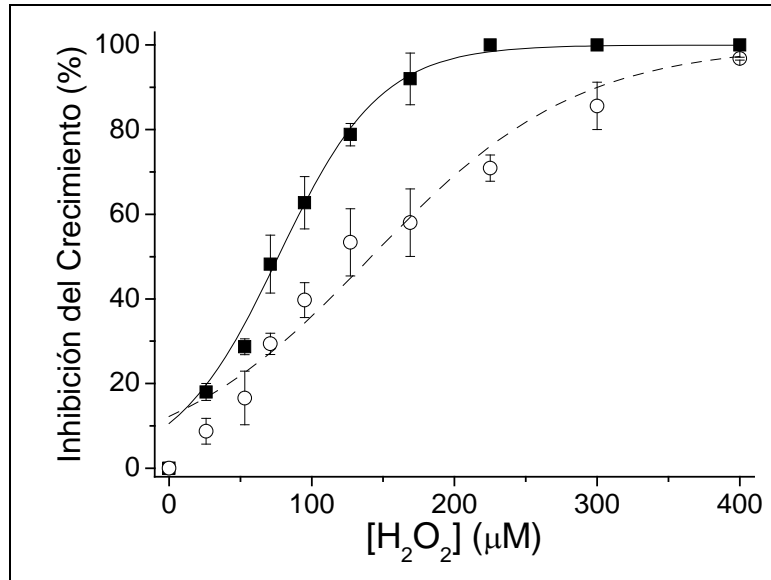


Fig. 4.3.26: Susceptibilidad de epimastigotes recombinantes al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parásitos transformados con pTEX (+) y transformados con la construcción [pTEX/TcPMSR10] (-) fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Luego de 48 h de incubación, la densidad celular fue determinada por recuento en cámara de Neubauer.



#### 4.3.10. Discusión.

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual constituye uno de los problemas principales de salud pública en Latinoamérica (Organización\_Mundial\_de\_la\_Salud). Hasta el momento, no existen vacunas eficientes y la quimioterapia convencional (nifurtimox y benznidazol) posee varios efectos secundarios (Organización\_Paramericana\_de\_la\_Salud). En adición, se han reportado casos de resistencia a estas drogas por los parásitos, por lo cual la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad es altamente prioritario (Pineyro y col., 2008). Diferentes rutas metabólicas son en la actualidad analizadas con el objeto de identificar blancos moleculares para el desarrollo de nuevos inhibidores.

En *T. cruzi*, como en el caso de otros tripanosomátidos, se han estudiado ampliamente sus sistemas antioxidantes, estableciéndose claramente el rol central del tripanotión en el metabolismo redox en estos organismos (Krauth-Siegel y col., 2008a). Está claro que la habilidad de estos patógenos a resistir el estrés oxidativo es esencial para la supervivencia durante la infección del huésped mamífero (Flohe y col., 1999; Pineyro y col., 2008). Si bien los estudios al presente permiten una comprensión general de los mecanismos responsables de esta resistencia, la caracterización de los distintos actores del metabolismo redox está lejos de ser completada. Es importante resaltar que hasta el momento, en tripanosomátidos, no hay información sobre mecanismos de reparación del daño oxidativo en proteínas y de la relevancia de éstos para la supervivencia de estos patógenos en sus diferentes estadios del ciclo de vida de estos patógenos.

Como se mencionó durante la introducción, la oxidación de proteínas puede traer aparejado cambios conformacionales y, en algunos casos, pérdida de función (Friguet, 2006). Uno de los aminoácidos más susceptibles a la oxidación es la metionina. La reducción de MetSO a Met es catalizada por la enzima metionina sulfóxido reductasa (Msr), la cual está presente en casi todos los organismos vivos (Banerjee, 2008). Estas enzimas protegen a los organismos del daño oxidativo (Moskovitz y col., 2001), son reguladores esenciales de la longevidad en animales (Moskovitz y col., 2001), proveen resistencia contra el estrés abiótico en plantas (Bechtold y col., 2004) y pueden actuar como factores de virulencia de algunos patógenos bacterianos, como *Neisseria gonorrhoeae* (Lowther y col., 2002), *Neisseria meningitidis* (Olry y col., 2002), *Staphylococcus aureus* (Moskovitz y col., 2002) y *Mycobacterium tuberculosis* (St John y col., 2001). Siendo de

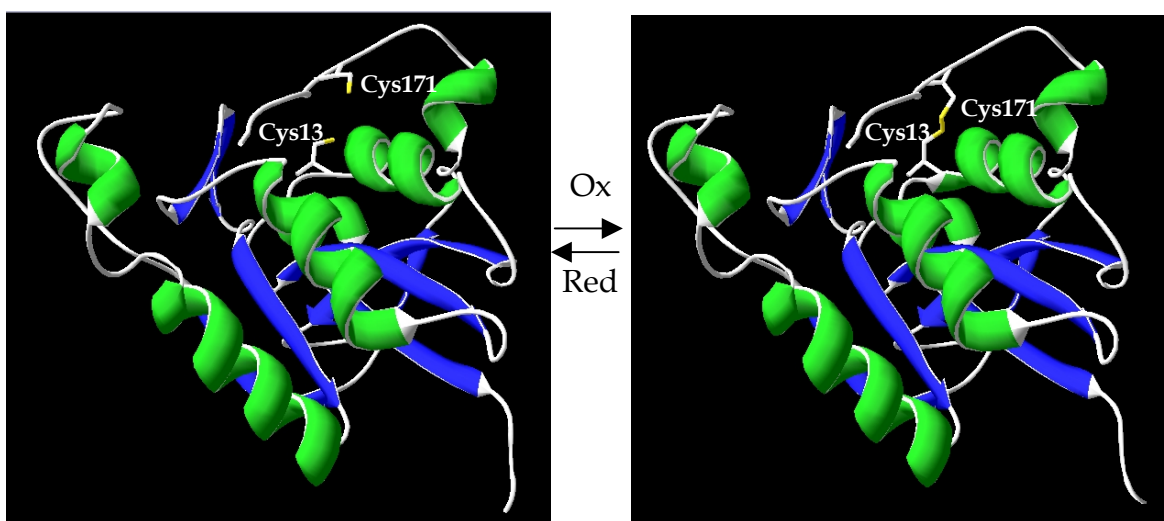
relevancia la función fisiológica de estas enzimas en diferentes organismos, no existen reportes, hasta el momento, de la existencia de esta proteína en protozoos y especialmente en *T. cruzi*.

A partir de la información actual disponible en el proyecto genoma de *T. cruzi*, se identificaron secuencias nucleotídicas de dos genes que codifican para dos isoformas de MsrA. La secuencias aminoacídicas de *TcPMSR10* y *TcPMSR180* traducidas a partir de la información génica, presentaron una alta identidad entre sí (96%) y con secuencias aminoacídicas de metionina-S-sulfóxido reductasa (MsrA) de otras fuentes, observándose la presencia del motivo catalítico característico, GCFWG, de este tipo de enzimas. Curiosamente, dentro del proyecto genoma de este patógeno no existen secuencias codificantes para metionina-R-sulfóxido reductasa (MsrB). Más aún, en ninguno de los proyectos genomas de otros kinetoplástidos patógenos como *T. brucei* o *Leishmania* sp presentan secuencias codificantes para MsrB. Esto conduce a plantear una pregunta, ¿cuál es el motivo de que estos organismos patógenos con sistemas antioxidantes ampliamente organizados y especializados carecen de una variante de MsrB?

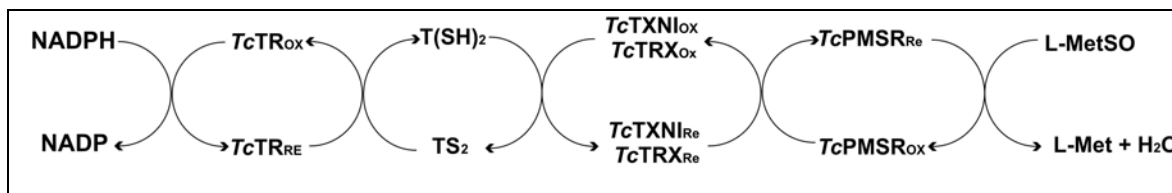
La ausencia de MsrB distinguiría a los tripanosomátidos del resto de los organismos, dado que MsrB actuaría en forma complementaria a la MsrA, ya que la MetSO es generada como mezcla racémica y es por ello que, en general, los organismos que presentan este tipo de enzimas poseen ambas variantes (Boschi-Muller y col., 2008). Una posible solución a esta encrucijada es que en estos organismos exista algún sistema enzimático con actividad epimerasa que convierta al isómero de Met-R-SO a Met-S-SO, el cual (este último) es sustrato de las *TcPMSR* (que son del tipo MsrA). Este tipo de actividad solamente ha sido evidenciada en extractos crudos de *E. coli* (Weissbach y col., 2002; Ezraty y col., 2004) y de ciertas células de mamíferos (Kim y col., 2004). Por lo tanto, en estos parásitos podría existir un sistema formado por MsrA más la enzima epimerasa. Desafortunadamente, no se conocen secuencias de genes codificantes para enzimas con actividad epimerasa en los proyectos genomas de estos organismos, por lo que la solución a esta cuestión quedará pendiente y es tema de futuras investigaciones.

Mediante SDS-PAGE no reductor se demostró que al variar el estado redox de *TcPMSR10* como *TcPMSR180* se inducía la formación/ruptura de un puente disulfuro intramolecular, puntualmente entre las dos únicas cisteínas (Cys<sup>13</sup> y Cys<sup>171</sup>) de ambas isoenzimas, como se muestra en los modelos tridimensionales generados a partir de

estructuras conocidas de proteínas homólogas (Fig. 4.3.27). La formación de este puente disulfuro en la proteínas fue observado cuando, las mismas interaccionaban con su sustrato fisiológico, L-MetSO. Esto permitió verificar la funcionalidad de las enzimas recombinantes, teniendo en cuenta que su oxidación dependería de una reacción específica del tipo enzima-sustrato. Alternativamente, se pudo corroborar que *TcTXNI* y *TcTRX* podían ser potenciales sustratos fisiológicos reductores de las *TcPMSR*, observándose la reversión del estado oxidado de estas enzimas cuando éstas eran incubadas con las proteínas tioles. Los resultados obtenidos indicaron que ambas *TcPMSR* poseían actividad biológica y establecen un escenario metabólico redox más amplio en *T. cruzi*, con la participación de diferentes sustratos fisiológicos (Fig. 4.3.28).



**Fig. 4.3.27:** Representación de cintas de modelos tridimensionales de *TcPMSR*. Los modelos fueron generados utilizando el programa Modeller v9.4. Como se puede observar ambas Cys se encuentran a una proximidad adecuada (valor promedio, 7,41 Å) para la formación de un puente disulfuro.



**Fig. 4.3.28:** Representación esquemática del flujo de equivalentes de reducción en la vía de reducción de MetSO en *T. cruzi*.

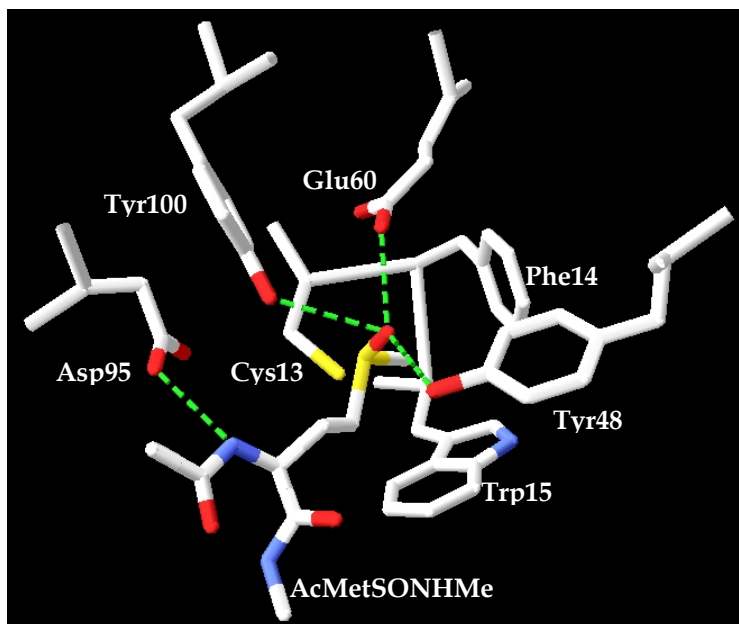
Los resultados de los estudios cinéticos en estado estacionario demostraron que ambas isoenzimas poseen un mecanismo de reacción de tipo doble sustitución, exhibiendo un paralelismo en las rectas de doble recíprocos. Este tipo de mecanismo cinético es común para este clase de enzimas que se basan en el intercambio tiol/disulfuro (Boschi-Muller y col., 2001; Boschi-Muller y col., 2005). Este resultado es coherente con el hecho que estas enzimas se presentan en dos estados redox independientes durante el ciclo catalítico, como se pudo apreciar en los ensayos de SDS-PAGE no reductores. Alternativamente, estos estudios revelaron que estas enzimas presentan perfiles cinéticos diferentes, siguiendo *TcPMSR10* una cinética de saturación, mientras *TcPMSR180* exhibió falta de saturación dentro de las condiciones de reacción evaluadas. Como se mencionó en resultados, ambos tipos de cinéticas han sido reportadas para Msr de otras fuentes (Boschi-Muller y col., 2001). Dentro de un sentido menos usual, una cinética de no saturación indicaría que la formación del complejo enzima/sustrato es la etapa lenta de la reacción enzimática (la etapa que gobierna cinéticamente la reacción) en lugar de la etapa de transformación y disociación del complejo enzima/producto, como es común en una cinética de saturación (Flohe y col., 2002). Esto posiblemente sería el caso de *TcPMSR180*, en la cual la interacción con sus sustratos *TcTXNI* o L-MetSO podría ser más lenta que la transferencia de equivalentes de reducción y disociación de los productos pertinentes.

Independientemente del perfil cinético, ambas enzimas presentaron mayor eficiencia catalítica para la etapa de oxidación de *TcTXNI* que para la etapa de reducción de L-MetSO, exhibiendo constantes cinéticas dentro del mismo orden de magnitud. Llamativamente, *TcPMSR10* presentó 100 veces más eficiencia catalítica que *TcPMSR180* para la etapa de reducción de L-MetSO. Las semejanzas y diferencias en las eficiencias catalíticas determinadas para estas enzimas explicarían, en principio, la diferencia de actividades enzimáticas observadas en los primeros ensayos cinéticos. Estos resultados indicarían que, globalmente, la etapa de reducción de L-MetSO es la lenta en el ciclo catalítico de estas enzimas. Este comportamiento es semejante al reportado por otros autores para MsrA de *E. coli* (Boschi-Muller y col., 2001), *Populus trichocarpa* (Rouhier y col., 2007) y *Caenorhabditis elegans* (Lee y col., 2005) y para MsrB de *Neisseria meningitidis* (Olry y col., 2002), determinado por estudios de cinética en estado estacionario.

Los resultados de las titulaciones redox indicaron que los potenciales de reducción de ambas enzimas son similares, pudiéndose concluir que la discrepancias cinéticas

exhibidas por *TcPMSR10* y *TcPMSR180* no serían causadas puntualmente por diferencias en la capacidad redox de los residuos de Cys (centros redox activos) presentes en las proteínas. Los valores determinados de  $E_{m7,5}$  para las *TcPMSR* (valor promedio de -177 mV), justifican termodinámicamente la capacidad de estas enzimas de emplear a TXN [ $E^\circ$  de -249 mV para TXN de *T. brucei* (Schmidt y col., 2003)] o TRX [ $E^\circ$  de -267 mV para TRX de *T. brucei* (Schmidt y col., 2003)] como sustratos reductores. Los valores de potenciales redox aquí determinados para las *TcPMSR* son coherentes con un flujo de equivalentes de reducción transportado por el sistema dependiente de tripanotión, originalmente proveniente del NADPH [ $E^\circ$  de -320 mV (Krause y col., 1991)] hacia el tripanotión [ $E^\circ$  de -242 mV (Schmidt y col., 2003)] y luego hacia las proteínas tioles. La diferencia de potenciales de reducción de estas proteínas son la fuerza impulsora que favorece la reducción de L-MetSO (libre o en proteínas).

Una propiedad importante de este tipo de enzimas es la falta de inhibición por producto, particularmente L-Met. Como se describió en resultados, tanto *TcPMSR10* como *TcPMSR180* fueron insensibles a la presencia de L-Met en el medio de reacción. Este comportamiento ya había sido reportado por otros autores, quienes habían evaluado la acción de AcMetHMe sobre la actividad Msr, sin detectar efecto inhibitorio alguno (Gand y col., 2007; Boschi-Muller y col., 2008). Estos autores estimaron valores de  $K_i$  de la MsrA de *N. meningitidis* para AcMetNHMe de 2 M. Esta falta de inhibición, sugiere que las *TcPMSR* poseen baja afinidad por L-Met, lo cual podría deberse a una posible repulsión electrostática entre el átomo de azufre de la Cys<sup>13</sup> (numeración de *TcPMSR*), el cual se encontraría como tiolato (-S-) y el átomo de azufre de la Met, el cual posee una carga parcial negativa. Otro posible efecto que influye sobre la interacción de Met con las *TcPMSR*, es la estabilización del sulfóxido es mediada por puentes de hidrógeno entre los residuos Glu<sup>60</sup>, Tyr<sup>48</sup> y Tyr<sup>100</sup> (numeración de *TcPMSR*) y el átomo de oxígeno del sulfóxido, como se puede apreciar a partir del modelo tridimensional generado (Fig. 4.3.29), este último ausente en la molécula de L-Met (Antoine y col., 2006; Gand y col., 2007; Boschi-Muller y col., 2008). Estas características explicarían, en parte, la baja afinidad de *TcPMSR* por L-Met y por ende la falta de inhibición por producto de estas enzimas.



**Fig. 4.3.29:** Representación esquemática del sitio activo de las *TcPMSR* en complejo con AcMetSONHMe. El modelo fue generado con el programa Modeller v9.4. En la imagen se presentan los residuos aminoacídicos que interaccionan con el sustrato a una distancia máxima de 4 Å. Se puede apreciar la orientación de la Cys<sup>13</sup> sobre el átomo de azufre del sulfóxido, encontrándose a una distancia de 2,92 Å, propicia para el ataque nucleofílico. En adición distintos tipos de interacción estabilizan la unión del sustrato al sitio activo: la interacción hidrofóbica del grupo ε-metilo del sustrato con el parche hidrofóbico formado por los residuos Phe<sup>14</sup> y Trp<sup>15</sup> y principalmente, la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos Tyr<sup>48</sup>, Glu<sup>60</sup> y Tyr<sup>100</sup>, con el átomo de oxígeno del sulfóxido.

Los ensayos de PAGE nativos revelaron diferencias entre las movilidades electroforéticas de *TcPMSR10* y *TcPMSR180*. Los datos obtenidos, revelaron que ambas isoformas poseen una estructura monomérica, entre 24 y 30 kDa, independiente del estado redox en el que se encontraban. Por otro lado, este mismo ensayo reveló que la diferencias en los perfiles electroforéticos eran originados por una desigualdad en la distribución de cargas superficiales. Los resultados del ensayo de PAGE nativo fueron coherentes con los valores de *pI* predichos *in silico* para las *TcPMSR*, indicando que al pH de corrida (pH 8,8) *TcPMSR10* poseería mayor carga negativa superficial que *TcPMSR180* y por ello una mayor movilidad electroforética que esta última. En apoyo a los resultados obtenidos, la generación de modelos tridimensionales de estas proteínas permitió detectar similitudes a nivel estructural de ambas. No obstante, mediante el cálculo de potencial electrostático sobre los modelos tridimensionales, utilizando la ecuación de Poisson-Boltzmann (Holst y col., 1994), se pudo observar una gran diferencia en los perfiles de cargas superficiales,

siendo  $TcPMSR180$  más electropositiva que  $TcPMSR10$  (Fig. 4.3.30). Esta primera presentó una mayor distribución de cargas positivas sobre su superficie, principalmente cerca del sitio activo de la proteína. Estos resultados teóricos, se correlacionan con los obtenidos experimentalmente en los ensayos de PAGE nativo. Por otro lado, si bien los perfiles de actividad enzimática en función del pH para ambas  $TcPMSR$  no presentaron diferencias significativas en los valores de pH óptimos,  $TcPMSR180$  presenta mayor actividad que  $TcPMSR10$  a pH más alcalinos. Esto podría indicar que ciertos residuos aminoacídicos cargados positivamente serían necesarios para la actividad enzimática y siendo  $TcPMSR180$  más básica podría ser que mantenga con mayor fuerza el grado de ionización.

En base a los modelos tridimensionales realizados para  $TcPMSR10$  y  $TcPMSR180$ , las diferencias encontradas en las propiedades electrostáticas de las  $TcPMSR$  podrían ser las responsables de las disimilitudes halladas en las propiedades cinéticas de estas proteínas. En forma aparente, la unión de L-MetSO a las proteínas no parece ser afectada, dado que los residuos críticos para la unión son conservados en ambas isoformas. Se podría plantear que estas diferencias en propiedades electrostáticas podrían afectar, cinéticamente, el ataque del sulfóxido por el tiol de la Cys<sup>13</sup> o la reducción del grupo sulfénico de este residuo, una vez reducido el sulfóxido, interfiriendo en el ataque de la Cys<sup>171</sup> (Cys resolutive) para la generación del puente disulfuro. Esta hipótesis se basa en dos observaciones realizadas: 1) existe una diferencia de 100 veces entre las constantes cinéticas de reacción para la etapa de reducción del sulfóxido entre  $TcPMSR10$  y  $TcPMSR180$  y 2) las constantes cinéticas de reacción entre las  $TcPMSR_{Ox}$  y la  $TcTXNI_{Red}$  se encuentran en el mismo orden de magnitud. Esto indicaría, *a priori*, que las propiedades electrostáticas superficiales en  $TcPMSR180$  hacen que la reacción de reducción del sulfóxido sea más lenta que para su isoforma. Por otro lado, la reacción entre  $TcPMSR_{Ox}$  y  $TcTXNI_{Red}$  no se vería afectada por las diferencias electrostáticas halladas en las  $TcPMSR$ . En apoyo a la hipótesis planteada, según la bibliografía existente (Souza y col., 1998; Boschi-Muller y col., 2000; Monteiro y col., 2007) y al igual que para otras proteínas tioles como TRX, el sustrato específico de  $TcTXNI_{Red}$  sería el puente disulfuro formado en las  $TcPMSR_{Ox}$  y no el grupo sulfénico de la Cys<sup>13</sup> (intermediario en la reacción de reducción de L-MetSO). Esto implicaría que la reacción entre  $TcTXNI_{Red}$  y las  $TcPMSR_{Ox}$  sólo sería factible si existe en forma previa el puente disulfuro en estas enzimas.

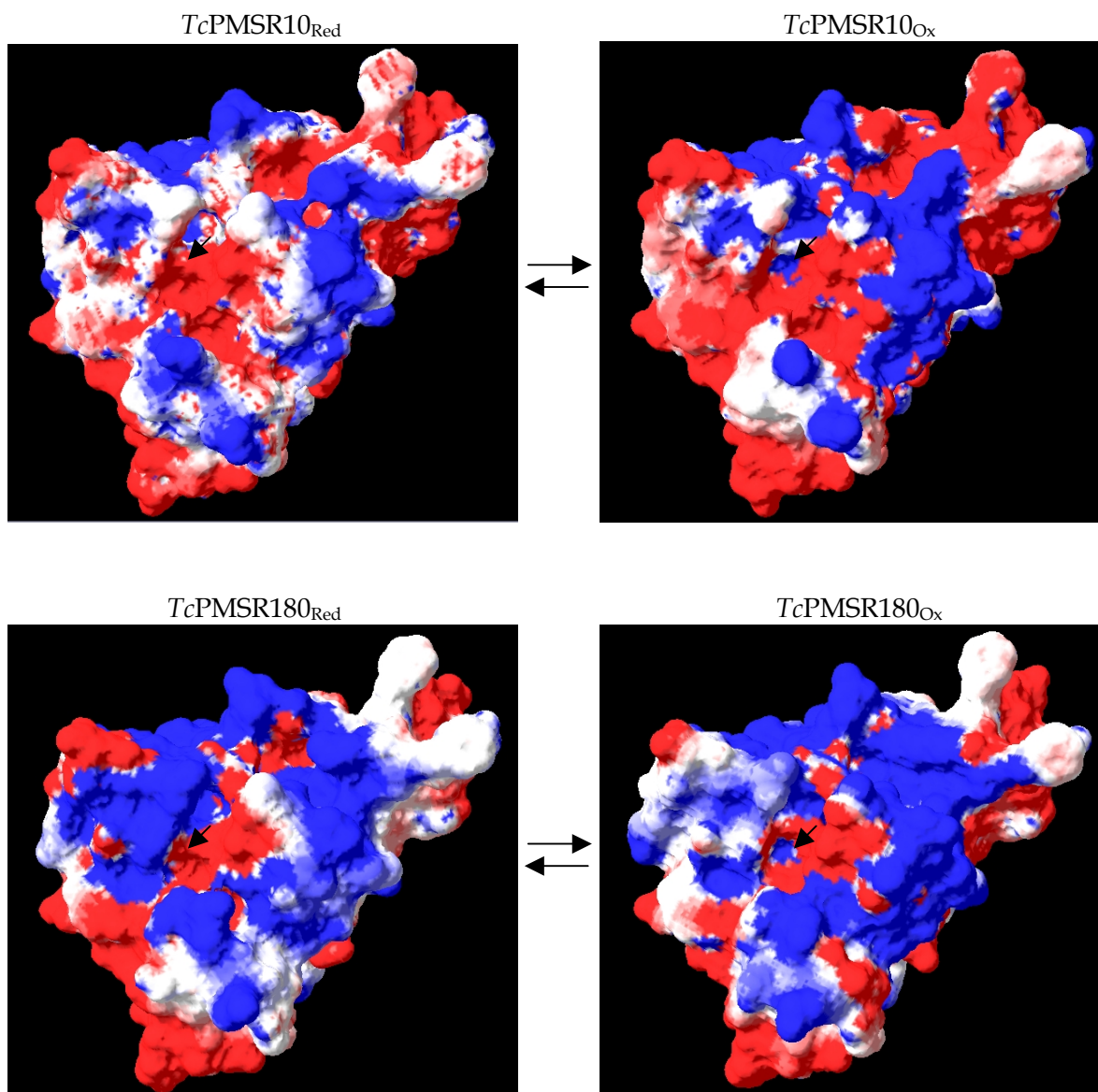


Fig. 4.3.30: Potencial electrostático de TcPMSR. El potencial electrostático ajustado sobre la superficie molecular fue calculado utilizando la ecuación de Poisson-Boltzmann mediante el programa Swiss-pdb viewer v4.0. Como condiciones para el cálculo se fijó la constante dieléctrica del medio, en 80, el valor de la constante dieléctrica de las proteínas en 4 y una fuerza iónica en 0,0 mol l<sup>-1</sup>. Las cargas positivas son representadas en azul y las negativas son representadas en rojo. Las flechas indican el sitio activo de las proteínas.

La expresión génica de al menos uno de los genes alelos codificantes para TcPMSR en *T. cruzi*, fue confirmada por ensayos de *western blot*, obteniéndose señales positivas en los estadios replicativos de este parásito (epimastigote y amastigotes). A fin de realizar una mejor comprensión de la ocurrencia de estas proteínas *in vivo*, se efectuó su inmunolocalización celular utilizando anticuerpos policlonales anti-TcPMSR10. Estos



ensayos presentaron una marcada señal a nivel citoplasmático en las células de epimastigotes de *T. cruzi*, como fue expuesto por microscopía confocal. Esta localización refuerza la presencia de estas enzimas en el parásito y la posible funcionalidad de éstas en la reparación del daño oxidativo en proteínas *in vivo*. Fisiológicamente, algunos sustratos blancos potenciales podrían ser ciertas proteínas de igual localización citoplasmática, como las ribosomales, calmodulina, las formadoras de canales iónicos de potasio, fosfoglucomutasa, ribonucleasa y proteasas, como ya se ha informado para otros organismos que presentan el sistema Msr (Grimaud y col., 2001; Weissbach y col., 2002; Ezraty y col., 2005).

La sobreexpresión de *TcPMSR10* en células de epimastigotes de *T. cruzi* reveló una mejor tolerancia al estrés oxidativo generado por  $H_2O_2$  exógeno, aproximadamente 1,85 veces respecto al control. Los hallazgos aquí expuestos son similares a los reportados por otros autores al sobreexpresar GPxI (Wilkinson y col., 2002a), APx (Wilkinson y col., 2002b) y TR (Kelly y col., 1993) frente al efecto del mismo agente oxidante. Contrariamente, existe otro informe que presenta una mayor sensibilidad por parte de *T. cruzi* a agentes tripanocidas tales como, benznidazol y violeta de genciano, al sobreexpresar superóxido dismutasa en células de epimastigotes del parásito (Temperton y col., 1998). En un trabajo reciente, se ha mostrado que parásitos recombinantes que sobreexpresaban peroxirredoxinas citoplasmáticas y mitocondriales (cTXNPx y mTXNPx, respectivamente), eran altamente resistentes a  $H_2O_2$  y  $ONOO^-$  exógenos (Piacenza y col., 2008). En paralelo, otro grupo de investigadores describió que la sobreexpresión de las mismas peroxirredoxinas, estimulaba la infección y diferenciación de tripomastigotes en cultivos de células de Vero (Pineyro y col., 2008). En adición, reportaron una mayor resistencia a la eliminación de los parásitos cuando se los sometía a desafíos con macrófagos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo como los antecedentes existentes, se podría concluir que las *TcPMSR* podrían ser relevantes para la supervivencia del parásito frente a estrés oxidativo. El argumento planteado, es que estas enzimas no participarían en una vía de eliminación del agente oxidante en forma directa, como en los casos arriba mencionados, sino que participan en la reparación de proteínas importantes para una correcta funcionalidad celular. Resultados similares a los aquí presentados han sido obtenidos al sobreexpresar en forma homóloga MsrA en células de *E. coli* (St John y

col., 2001), o MsrB en *A. thaliana* (Bechtold y col., 2004; Kwon y col., 2007) o en cultivos de células de mamíferos (Moskovitz y col., 1998; Cabreiro y col., 2008); ya que en todos los casos las células transformadas presentaron una mayor resistencia al estrés abiótico (donde se incluye al oxidativo).

Finalmente, este trabajo describe por primera vez, en *T. cruzi*, un sistema funcional encargado de la reparación del daño oxidativo de proteínas. Lo realizado, no sólo aumenta el conocimiento de las reacciones que participan en la homeostasis celular del equilibrio redox, la supervivencia y virulencia del parásito. El sistema Msr podría aparecer como una herramienta importante no sólo para la reducción de sulfóxidos de metionina, sino también como un sistema de regulación de la actividad de diversas vías metabólicas, en donde participan enzimas con metioninas susceptibles a la oxidación. Este posible funcionamiento versátil de las *TcPMSR* aquí planteado es de un interés relevante para la bioquímica y fisiología de este parásito, además de abrir nuevas líneas de trabajo a nivel proteómico en *T. cruzi*.

## 5. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo de tesis se pudo enunciar las siguientes conclusiones:

- La enzima *Eh*TRXR expresada en forma recombinante presentó una estructura homodimérica covalente (por puentes disulfuros), donde cada subunidad posee una molécula de FAD como grupo prostético.
- Respecto a las propiedades cinéticas de *Eh*TRXR se pudo concluir que:
  - Exhibió actividad disulfuro reductasa, siendo capaz de emplear DTNB y TRX como sustratos. No obstante, no presentó capacidad de reducir disulfuros de bajo peso molecular, tales como GSSG, lipoamida, TS<sub>2</sub> y cistina.
  - La reducción de sustratos disulfuros siguió un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong” híbrido.
  - La actividad disulfuro reductasa depende marcadamente de la funcionalidad de tioles reactivos en la proteína.
  - La enzima presentó capacidad de emplear NADPH o NADH como sustratos reductores, siendo la especificidad de la enzima por este último dos órdenes menores respecto a NADPH. Mediante ensayos de inhibición por productos se puede concluir que el sitio de unión a NADH sería el mismo al de unión a NADPH.
  - Se pudo observar que la enzima presentó una actividad oxidasa significativa, catalizando la oxidación de NAD(P)H por O<sub>2</sub> generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
  - Se observó también que la actividad oxidasa es independiente de la vía de reducción de sustratos disulfuros.
  - La enzima exhibió capacidad de reducir en forma directa S-nitrosotioles como GSNO y CySNO. En adición, esta capacidad se vio estimulada por la presencia de TRX en el medio de reacción.
  - Es de remarcar que la enzima presentó actividad quinona reductasa y actividad diaforasa (utilizando azul de metileno como sustrato). En adición, componentes químicos del aceite esencial de tomillo fueron sustratos oxidantes para la enzima. Todos estos compuestos presentaron interesantes propiedades inhibitorias de la

---

actividad disulfuro reductasa, mediante la competencia de los equivalentes de reducción portados por la enzima reducida.

- El potencial de reducción estimado para *Eh*TRXR (-292 mV) es coherente con la cascada de óxido-reducción en la cual participa [NAD(P)H → TRXR → TRX].
- Las tres TRX de *E. histolytica* expresadas en forma recombinante (*Eh*TRX6, *Eh*TRX8 y *Eh*TRX41) presentaron capacidad de reducción de proteínas disulfuros (como insulina), DTNB, disulfuros de bajo peso molecular no reducibles por *Eh*TRXR (GSSG, TS<sub>2</sub> y cistina) y *S*-nitrosotioles.
- Los potenciales de reducción estimados para las *Eh*TRX (-280 mV promedio) demuestran la capacidad de estas proteínas como agentes reductores eficientes.
- El sistema TRX de *E. histolytica* (*Eh*TRXR/*Eh*TRX) fue capaz de funcionar de forma acoplada a *Eh*2CysPrx para la reducción de hidroperóxidos.
- La enzima *Eh*2CysPrx presentó un mecanismo de reacción de tipo ping-pong con una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten tanto para los sustratos reductores (TRX) como para el hidroperóxido.
- La peroxirredoxina amébrica presentó una escasa actividad GPx, lo que reveló una preferencia por TRX como sustratos reductores.
- La enzima *Eh*2CysPrx exhibió una estructura molecular decamérica covalente (por puentes disulfuros) de 300 kDa.
- El potencial de reducción estimado para *Eh*2CysPrx es más positivo que el de otras Prx descritas, pero es coherente con el uso de *Eh*TRX o *Ec*TRX como sustratos reductores y para la reducción de peróxidos.
- Los ensayos de *western blot* revelaron la presencia del sistema TRX en trofozoitos de *E. histolytica*. En adición, los resultados de los ensayos de inmunolocalización indicaron una ubicación a nivel ectoplasmático del sistema, sobre la periferia de la membrana citoplasmática.
- *E. histolytica* posee un sistema TRX funcional capaz de complementarse con otros componentes antioxidantes previamente descritos.
- La enzima *Eh*TRXR es un interesante blanco molecular para el diseño de fármacos contra la amebiasis, dada sus propiedades cinéticas y estructurales y la posición que ocupa a nivel de la cascada de óxido-reducción en la que participa.

- Se detectó la presencia de GR, dihidrolipoamida deshidrogenasa, TRXR, TRX y PMSR en extractos crudos de *P. tricornutum* cultivado en condiciones fotoautotrofas, mediante ensayos de actividad enzimáticas y *western blot*.
- La enzima GR purificada a partir de *P. tricornutum* presentó una alta especificidad por NADPH como sustrato reductor y GSSG como sustrato disulfuro. En adición, la enzima no presentó actividad oxidasa en las condiciones ensayadas.
- Se observó que la reducción de GSSG es dependiente de tioles reactivos en la proteína.
- La reducción de GSSG dependiente de NADPH siguió un mecanismo de reacción del tipo “ping-pong” híbrido.
- La GR purificada presentó capacidad de reducir GSNO con eficiencias catalíticas moderadas, no presentando inactivación por éste durante el ciclo catalítico.
- Se determinó que la GR purificada es un homodímero de 118 kDa que posee flavina como grupo prostético.
- *P. tricornutum* presenta un amplio repertorio metabólico a nivel del metabolismo redox, principalmente de vías dependientes de TRX y glutatión.
  
- Las isoformas de *TcPMSR* (*TcPMSR10* y *TcPMSR180*) expresadas de forma recombinante presentaron actividad metionina sulfóxido reductasa.
- Ambas isoformas aceptaron DTT, *TcTRX* y *TcTXNI* como sustratos reductores y a L-MetSO como sustrato oxidante.
- Las dos isoformas de *TcPMSR* exhibieron un mecanismo de reacción del tipo “ping-pong” para los sustratos: *TcTXNI* y L-MetSO.
- Las isoformas de *TcPMSR* presentaron diferencias cinéticas, exhibiendo *TcPMSR10* una cinética de saturación, mientras que *TcPMSR180* presentó una cinética de no saturación. En adición, se observó que *TcPMSR10* fue más activa que *TcPMSR180* en las condiciones ensayadas.
- Ninguna de las isoformas de *TcPMSR* presentó inhibición por el producto de reacción L-Met, presentando valores de  $K_i$  mayores a 40 mM.

- Los ensayos de electroforesis nativos demostraron que las isoformas de *TcPMSR* exhiben diferencias en sus distribuciones de cargas superficiales y no en sus masas moleculares.
- Se determinó que las isoformas de *TcPMSR* son enzimas monoméricas de 25-30 kDa.
- Los potenciales de reducción estimados para las isoformas de *TcPMSR* fueron similares (-178 mV) y son coherentes con los potenciales de reducción de los sustratos reductores fisiológicos (*TcTRX* y *TcTXNI*).
- Las diferencias halladas en las propiedades cinéticas de las isoformas de *TcPMSR* podrían deberse a las diferencias de cargas superficiales.
- Se detectó la presencia de al menos una de las isoformas en los estadios replicativos de *T. cruzi*: epimastigotes y amastigotes. En adición, se determinó que al menos una de las isoformas posee ubicación citoplasmática en epimastigotes de *T. cruzi*.
- *T. cruzi* posee dos isoformas funcionales de metionina sulfóxido reductasa del tipo A, lo cual demuestra la existencia de sistemas de reparación del daño oxidativo en proteínas en el parásito. Este sistema formado por las *TcPMSR* estaría ligado al metabolismo del tripanotión, dado que emplea a *TcTRX* y *TcTXNI* como sustratos reductores.

## 6. RESUMEN.

Todas las formas de vida han desarrollado sistemas enzimáticos eficientes para resistir el daño oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno (ERO). El estado redox celular es un mediador crucial de diferentes procesos metabólicos, actuando en la señalización y regulación de diversos procesos metabólicos y celulares. Diferentes procesos biológicos tienen al sistema TRX desempeñando un rol significativo (respuesta al estrés oxidativo, regulación de actividades enzimáticas, reparación del daño oxidativo en proteínas, síntesis de ADN, transcripción génica, crecimiento celular y apoptosis).

La homeostasis del equilibrio redox intracelular es dependiente en muchos organismos de tioles de bajo peso molecular que, como por ejemplo el glutatión, poseen una amplia distribución en todos los reinos biológicos. Éste provee equivalentes de reducción (provenientes del NADPH) a la célula en condiciones de estrés oxidativo, siendo oxidado a glutatión disulfuro (GSSG), que es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR) a expensas del NADPH.

Dentro de los mecanismos de reparación del daño oxidativo en proteínas se encuentran aquellos dependientes de las metionina sulfóxido reductasas (PMSR), enzimas encargadas de revertir la oxidación de metioninas en proteínas. Estas enzimas reciben el poder reductor del NADPH, a través del sistema TRX (entre otros).

En esta tesis se presenta la caracterización funcional de distintos componentes del metabolismo redox de organismos unicelulares como: *Entamoeba histolytica* (un parásito anaerobio), *Phaeodactylum tricornutum* (una diatomea) y *Trypanosoma cruzi* (un parásito aerobio).

En *E. histolytica* se estudió el sistema TRX, formado por una TRXR de bajo peso molecular (*EhTRXR*) y cuatro isoformas de TRX (*EhTRX6*, *EhTRX8*, *EhTRX41*, *EhTRX111*). Estos sistemas enzimáticos exhibieron capacidad para operar junto con la *Eh2CysPrx* en la reducción dependiente de NADPH, de hidroperóxidos, así como en la reducción de disulfuros de bajo peso molecular [tales como cistina, tripanotión disulfuro (TS<sub>2</sub>) y GSSG] y de S-nitrosotioles (tales como GSNO y CysNO). La enzima *EhTRXR* presentó la facultad de emplear NADH como sustrato reductor con afinidades comparables al NADPH. Esta gran versatilidad del sistema TRX de *E. histolytica* se debe, en parte, a sus potenciales de

reducción: de -292 mV para *EhTRXR* y de -283 mV (promedio) para las *EhTRX*, lo que favorece la reducción de una amplia variedad de sustratos. Los componentes de este sistema localizaron a nivel celular sobre la periferia de la membrana plasmática en células del parásito. Los resultados obtenidos son un aporte al conocimiento de las reacciones que, en *E. histolytica*, regulan el flujo de equivalentes de reducción entre distintos metabolitos, metabolismo crítico para la supervivencia y virulencia del protozoo. Este parásito, asociado a la pobreza, la ignorancia, malnutrición y/o malas condiciones sanitarias, es el agente etiológico de uno de los principales problemas de salud pública mundial. El incremento del número de casos de cepas resistentes a drogas convencionales para el tratamiento de la amebiasis, motivan nuevos estudios integrales para la caracterización de vías metabólicas (como el metabolismo redox) que faciliten el diseño racional de nuevos agentes terapéuticos. Los resultados obtenidos *in vitro* demostraron que *EhTRXR* es un potencial blanco molecular para el diseño racional de nuevas drogas antiparasitarias. Esta idea se basa en el funcionamiento versátil que presenta el sistema TRX, el cual puede jugar un rol relevante en la defensa del parásito contra las especies reactivas del oxígeno durante la fase extraintestinal de la infección amebiana. Se observó que, tanto el azul de metileno (MB) como el aceite esencial de tomillo presentaron una alta capacidad de inhibir la actividad disulfuro reductasa de *EhTRXR*, estimulando la oxidación-catalizada de NADPH. Los resultados aquí presentados muestran la potencialidad de estos compuestos como modelos para la generación de nuevos agentes antiparasitarios, sentando las bases para la formación de nuevas líneas de investigación en el tema.

En extractos crudos de *Phaeodactylum tricorutum*, se detectaron actividades enzimáticas como la de GR, dihidrolipoamida deshidrogenasa y TRXR (con DTNB). A partir de estos resultados, se purificó a homogeneidad una enzima con actividad glutatión reductasa a partir de extractos celulares del alga y se la caracterizó funcionalmente. La enzima demostró especificidad por NADPH como sustrato reductor y GSSG como sustrato disulfuro. Es de remarcar que la GR purificada presentó la capacidad de reducir GSNO sin presentar inactivación por este compuesto, a diferencia de otras GR de otras fuentes. Los resultados obtenidos apoyan la existencia de sistemas redox dependientes de TRX y GSH en esta diatomea. Estos resultados aportan más información a la incipiente genómica y proteómica de *P. tricorutum*.



*Trypanosoma cruzi* es, de los tres organismos estudiados, el que presenta mayor cantidad de trabajos de caracterización del metabolismo de detoxificación de hidroperóxidos. En esta tesis se evaluaron rutas metabólicas relacionadas con la habilidad del microorganismo para afrontar condiciones ambientales oxidantes. Específicamente aquellas relacionadas con la reparación de proteínas oxidadas. El interés se centró en dos genes alelos: *tcpmsr10* y *tcpmsr180*, que codifican para sendas metionina sulfóxido reductasas del tipo A. Ambas enzimas recombinantes fueron activas en la reducción de metionina sulfóxido, utilizando proteínas tioles de *T. cruzi* (TXNI y TRX) como co-sustratos reductores. Por electroforesis en geles de poliacrilamida (en condiciones desnaturizantes y no reductoras) se observó que ambas enzimas presentan diferencias en sus movilidades electroforéticas dependiendo del estado redox en que se encuentran. Además, para un estado redox determinado, se visualizaron distintos perfiles electroforéticos en condiciones nativas para cada enzima. Esta diferencia fue atribuida a desigualdades en las cargas superficiales de ambas proteínas, como se evidenció a partir de estudios *in silico*. Mediante modelado molecular se mostró también que los residuos que arreglan el sitio de unión al sulfóxido se distribuyen en forma idéntica en ambas isoformas, pero con diferencias en el entorno superficial adyacente al mismo. Estas enzimas exhibieron una cinética del tipo doble sustitución, coherente con un mecanismo de reacción de intercambio tiol-disulfuro. Mediante titulación redox, utilizando el par GSSG/GSH, se determinaron los potenciales de reducción estándares para estas enzimas en -178 mV (valor promedio). Se realizaron ensayos de inmunodetección de estas enzimas (o de al menos una de ellas) en extractos crudos de epimastigotes y amastigotes, formas replicativas del parásito. Se utilizó en estos ensayos un suero policlonal específico anti-TcPMSR10 obtenido en conejo. Estos anticuerpos también fueron utilizados en ensayos de inmunolocalización, que evidenciaron la ocurrencia citoplasmática de estas proteínas (demostrado anteriormente para este tipo de enzimas en otros organismos). Estos resultados constituyen un aporte más a la caracterización de nuevos componentes del escenario redox en *T. cruzi*, siendo estas enzimas nuevos blancos moleculares que podrían ser de utilidad para el diseño y desarrollo de fármacos específicos que actúen alterando la viabilidad y supervivencia de este patógeno humano.

## 7. ABSTRACT.

All the living forms developed efficient enzymatic systems to resist damage generated by oxidizing reactive oxygen species (ROS). The redox cellular status is a crucial mediator for different metabolic processes acting in signaling and regulation of several metabolic and cellular processes. The TRX system plays an important role as an antioxidant mechanism. It can take part in: i) the regulation of enzymatic activities, ii) in repairing oxidized proteins, iii) in affording reducing equivalents for DNA synthesis; as well as cellular transcription, growth and apoptosis. Another pathway involved in the maintaining of the intracellular redox homeostasis is that depending on GSH. This low molecular weight thiol provides the cell with reductive power to cope with oxidative stress conditions; it being oxidized to glutathione disulfide (GSSG). The enzyme glutathione reductase (GR) utilizes NADPH to regenerate GSH from GSSG. Mechanisms to repair oxidized macromolecule damages are as relevant to cell survival as antioxidant systems. In such a way, within the mechanisms for protein reparation, methionine sulfoxide reductases (PMSR) are key enzymes involved in the reduction of oxidized proteins.

This thesis work deals on the functional characterization of several thiol depending redox systems from unicellular organisms (protists): *Entamoeba histolytica* (an anaerobic parasite), *Phaeodactylum tricornutum* (a diatom) and *Trypanosoma cruzi* (an aerobic parasite).

In *E. histolytica* we revealed the occurrence of the TRX system. The latter includes a low molecular weight TRXR (*Eh*TRXR) and four isoforms of TRX (*Eh*TRX6, *Eh*TRX8, *Eh*TRX41, and *Eh*TRX111). These enzymatic systems exhibited capacity to operate with *Eh*2CysPrx in the reduction of hydroperoxides, as well as low molecular weight disulfides [such as cystine, trypanothione disulfide (TS<sub>2</sub>) and GSSG] and S-nitrosothiols (such as GSNO and CySNO). In addition, *Eh*TRXR exhibited the likelihood to use NADH as reductive substrate, with comparable affinity compared to NADPH. This odd versatility of the *E. histolytica* TRX system could be explained, in part, to reduction potentials: -292 mV for *Eh*TRXR and -283 mV (average) for *Eh*TRX, which support the reduction of a wide variety of substrates. The components of this system have been immunolocalized on the plasmatic membrane periphery of the parasite cells. These results contribute to the

knowledge of the reactions that, in *E. histolytica*, regulate the flow of reduction equivalents between different metabolites; which constitutes a critical metabolic mechanism for the survival and virulence of the parasite. This parasite, associated to the poverty, the ignorance, malnutrition and bad sanitary conditions, is the etiologic agent of one main health problem world-wide. The increasing occurrence of strains with resistance to conventional drugs for amoebiasis treatment requires of new integral studies on the characterization of metabolic routes (such as redox metabolism), looking for the rational design of new therapeutic agents. Results reported herein on *in vitro* studies highlight that *EhTRXR* is a potential molecular target for the rational design of such new antiparasitic drugs. This idea is based on the versatile operativity exhibited by the TRX system, which can play an important role in the parasite defence against ROS during the extraintestinal phase of the amoebic infection. Also, methylene blue and essential oils from thyme displayed a high capacity to inhibit disulfide reductase activity of *EhTRXR* (and concomitantly to stimulate its oxidase activity). Results presented herein support the potentiality of these compounds as models for the generation of new antiparasitic agents, contributing to the development of new investigation lines in the subject.

In crude extracts of *Phaeodactylum tricornutum*, enzymatic activities of GR, dihydrolipoamide dehydrogenase and TRXR (DTNB dependent) were detected. An enzyme with GR activity from the diatom cellular extracts was purified to homogeneity and functionally characterized. The enzyme exhibited specificity toward NADPH and GSSG as main substrates. Unlike to many GR from other sources, the purified *P. tricornutum* GR presented capacity to catalyze reduction of GSNO. Our results strongly support the existence of TRX and GSH dependent redox systems in this diatom. These results add information to the incipient genomic and proteomic of *P. tricornutum*.

*Trypanosoma cruzi* is, between the three under study, the organism best characterized respect to metabolism of hydroperoxides detoxification. In the present thesis work, several metabolic routes were evaluated in relation with the ability of this microorganism to cope with oxidative environmental conditions. Specifically, mechanisms involved in the reparation of oxidized protein were elucidated. We centered our interest on two allele genes: *tcpmsr10* and *tcpmsr180*, which codify for two isoforms of methionine sulfoxide reductase A. Both enzymes were active in the reduction of methionine sulfoxide, using thiol proteins of *T. cruzi* (TXNI and TRX) as reducing co-substrates. By SDS-PAGE (under

nonreducing conditions) it was observed that the enzymes have differences in electrophoretic motility depending of the redox status. In addition, for a specified redox status different electrophoretic (under native conditions) profiles were visualized for each enzyme. The latter difference was attributed to variations in the superficial charge corresponding to each protein, as it was concluded from studies *in silico*. The molecular modeling also showed that contiguous residues at the sulfoxide binding site are distributed identically in both isoforms, but differences are clear in the adjacent surroundings. These enzymes exhibited double substitution kinetics, in agreement with a mechanism of thiol-disulfide interchange. The standard reduction potentials for these enzymes were determined in -178 mV (average), after redox titration utilizing the pair GSSG/GSH. The immunodetection of these enzymes (or at least of one of them) was performed in crude extracts of epimastigotes and amastigotes, replicative forms of the parasite. Immunolocalization assays showed the cytoplasmic occurrence of these proteins in epimastigote cells. These results constitute a contribution to the description of the metabolic redox scenario in *T. cruzi*. Additionally, the results elucidated new components of the antioxidant metabolism in this organism, after pointing out the occurrence of enzymatic systems involved in repairing oxidized macromolecules. These findings should be of worth concern in the design of specific drugs developed against this human pathogen.

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. (2005). "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." J Eukaryot Microbiol **52**(5): 399-451.

Akbar, M. A., Chatterjee, N. S., Sen, P., Debnath, A., Pal, A., Bera, T. y Das, P. (2004). "Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*." Mol Biochem Parasitol **133**(2): 187-96.

Akcha, F., Arzul, G., Rousseau, S. y Bardouil, M. (2008). "Comet assay in phytoplankton as biomarker of genotoxic effects of environmental pollution." Mar Environ Res.

Akif, M., Khare, G., Tyagi, A. K., Mande, S. C. y Sardesai, A. A. (2008). "Functional studies of multiple thioredoxins from *Mycobacterium tuberculosis*." J Bacteriol **190**: 7087-7095.

Akif, M., Suhre, K., Verma, C. y Mande, S. C. (2005). "Conformational flexibility of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin reductase: crystal structure and normal-mode analysis." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **61**(Pt 12): 1603-11.

Al-Sa'doni, H. y Ferro, A. (2000). "S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs." Clin Sci (Lond) **98**(5): 507-20.

Alberty, R. A. (2006). "Relations between biochemical thermodynamics and biochemical kinetics." Biophysical Chemistry **124**: 11-17.

Alkhalfioui, F., Renard, M. y Montrichard, F. (2007). "Unique properties of NADP-thioredoxin reductase C in legumes." J Exp Bot **58**(5): 969-78.

---

Allaoui, A., Francois, C., Zemzoumi, K., Guilvard, E. y Ouaisi, A. (1999). "Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele." Mol Microbiol **32**(6): 1273-86.

Anderson, I. J. y Loftus, B. J. (2005). "Entamoeba histolytica: observations on metabolism based on the genome sequence." Exp Parasitol **110**(3): 173-7.

Anderson, J. V., Hess, J. L. y Chevone, B. I. (1990). "Purification, Characterization, and Immunological Properties for Two Isoforms of Glutathione Reductase from Eastern White Pine Needles." Plant Physiol **94**(3): 1402-1409.

Andrews, N. W. y Colli, W. (1982). "Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells." J Protozool **29**(2): 264-9.

Anthony, J. P., Fyfe, L. y Smith, H. (2005). "Plant active components - a resource for antiparasitic agents?" Trends Parasitol **21**(10): 462-8.

Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S. y Branlant, G. (2006). "Characterization of the amino acids from *Neisseria meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reduction step." J Biol Chem **281**(51): 39062-70.

Apt, K. E., Kroth-Pancic, P. G. y Grossman, A. R. (1996). "Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*." Mol Gen Genet **252**(5): 572-9.

Ariyanayagam, M. R. y Fairlamb, A. H. (1999). "Entamoeba histolytica lacks trypanothione metabolism." Mol Biochem Parasitol **103**(1): 61-9.

Ariyanayagam, M. R., Oza, S. L., Guther, M. L. y Fairlamb, A. H. (2005). "Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome." Biochem J **391**(Pt 2): 425-32.

Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B. D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kroger, N., Lau,

---

W. W., Lane, T. W., Larimer, F. W., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P. y Rokhsar, D. S. (2004). "The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism." Science **306**(5693): 79-86.

Arner, E. S. y Holmgren, A. (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem **267**(20): 6102-9.

Arner, E. S., Nordberg, J. y Holmgren, A. (1996). "Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 268-74.

Arner, E. S., Zhong, L. y Holmgren, A. (1999). "Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase." Methods Enzymol **300**: 226-39.

Asnis, R. E. (1955). "A glutathione reductase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **213**(1): 77-85.

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schurmann, P. y Buchanan, B. B. (2003). "Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 370-5.

Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. La Plata, Buenos Aires (Argentina), Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. y Banerjee, U. C. (2002). "Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals." Crit Rev Biotechnol **22**(3): 245-79.

Banerjee, R. (2008). Redox Biochemistry, Wiley - Interscience.

Bansal, D., Malla, N. y Mahajan, R. C. (2006a). "Drug resistance in amoebiasis." Indian J Med Res **123**(2): 115-8.

- Bansal, D., Sehgal, R., Chawla, Y., Malla, N. y Mahajan, R. C.** (2006b). "Multidrug resistance in amoebiasis patients." Indian J Med Res **124**(2): 189-94.
- Becker, K., Gui, M. y Schirmer, R. H.** (1995). "Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione." Eur J Biochem **234**(2): 472-8.
- Bechtold, U., Murphy, D. J. y Mullineaux, P. M.** (2004). "Arabidopsis peptide methionine sulfoxide reductase2 prevents cellular oxidative damage in long nights." Plant Cell **16**(4): 908-19.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A. y Bhattacharya, S.** (2000). "The genome of Entamoeba histolytica." Int J Parasitol **30**(4): 401-10.
- Bhaya, D. y Grossman, A.** (1991). "Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum." Mol Gen Genet **229**(3): 400-4.
- Bindoli, A., Fukuto, J. M. y Forman, H. J.** (2008). "Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling." Antioxid Redox Signal **10**(9): 1549-64.
- Bironaite, D., Anusevicius, Z., Jacquot, J. P. y Cenas, N.** (1998). "Interaction of quinones with Arabidopsis thaliana thioredoxin reductase." Biochim Biophys Acta **1383**(1): 82-92.
- Biteau, B., Labarre, J. y Toledano, M. B.** (2003). "ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin." Nature **425**(6961): 980-4.
- Blumenstiel, K., Schoneck, R., Yardley, V., Croft, S. L. y Krauth-Siegel, R. L.** (1999). "Nitrofurans as common subversive substrates of Trypanosoma cruzi lipamide dehydrogenase and trypanothione reductase." Biochem Pharmacol **58**(11): 1791-9.
- Bond, C. S., Zhang, Y., Berriman, M., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H. y Hunter, W. N.** (1999). "Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors." Structure **7**(1): 81-9.



**Bonnet, B., Soullez, D., Davioud-Charvet, E., Landry, V., Horvath, D. y Sergheraert, C.** (1997). "New spermine and spermidine derivatives as potent inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase." Bioorg Med Chem **5**(7): 1249-56.

**Bonse, S., Santelli-Rouvier, C., Barbe, J. y Krauth-Siegel, R. L.** (1999). "Inhibition of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships." J Med Chem **42**(26): 5448-54.

**Boschi-Muller, S., Azza, S. y Branlant, G.** (2001). "E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide." Protein Sci **10**(11): 2272-9.

**Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A. y Branlant, G.** (2000). "A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli." J Biol Chem **275**(46): 35908-13.

**Boschi-Muller, S., Gand, A. y Branlant, G.** (2008). "The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities." Arch Biochem Biophys **474**(2): 266-73.

**Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. y Branlant, G.** (2005). "The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 231-8.

**Bowie, J. U., Luthy, R. y Eisenberg, D.** (1991). "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure." Science **253**(5016): 164-70.

**Bradbury, J.** (2004). "Nature's nanotechnologists: unveiling the secrets of diatoms." PLoS Biol **2**(10): e306.

**Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

**Bruchhaus, I., Brattig, N. W. y Tannich, E.** (1992). "Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from *Entamoeba histolytica*." Arch Med Res **23**(2): 27-9.

**Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N. y Tannich, E.** (2003). "The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation." Eukaryot Cell **2**(3): 501-9.

**Bruchhaus, I., Richter, S. y Tannich, E.** (1997). "Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*." Biochem J **326 ( Pt 3)**: 785-9.

**Bruchhaus, I., Richter, S. y Tannich, E.** (1998). "Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*." Biochem J **330 ( Pt 3)**: 1217-21.

**Bruchhaus, I. y Tannich, E.** (1994a). "Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation." Mol Biochem Parasitol **67**(2): 281-8.

**Bruchhaus, I. y Tannich, E.** (1994b). "Purification and molecular characterization of the NAD(+)-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*." Biochem J **303 ( Pt 3)**: 743-8.

**Buchholz, K., Comini, M. A., Wissenbach, D., Schirmer, R. H., Krauth-Siegel, R. L. y Gromer, S.** (2008a). "Cytotoxic interactions of methylene blue with trypanosomatid-specific disulfide reductases and their dithiol products." Mol Biochem Parasitol.

**Buchholz, K., Schirmer, R. H., Eubel, J. K., Akoachere, M. B., Dandekar, T., Becker, K. y Gromer, S.** (2008b). "Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*." Antimicrob Agents Chemother **52**(1): 183-91.

**Budde, H.** (2003). Antioxidant defense in *Trypanosoma brucei brucei*. Braunschweig, Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina.

**Butterworth, P. J.** (1972). "The use of Dixon plots to study enzyme inhibition." Biochim Biophys Acta **289**(2): 251-3.

**Cabreiro, F., Picot, C. R., Perichon, M., Friguet, B. y Petropoulos, I.** (2008). "Overexpression of methionine sulfoxide reductases A and B2 protects MOLT-4 cells against zinc-induced oxidative stress." Antioxid Redox Signal.

**Carlberg, I. y Mannervik, B.** (1985). "Glutathione reductase." Methods Enzymol **113**: 484-90.

**Carvalho, A. P. y Malcata, F. X.** (2005). "Optimization of omega-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes." Mar Biotechnol (NY) **7**(4): 381-8.

**Castro, H., Romao, S., Gadelha, F. R. y Tomas, A. M.** (2008). "Leishmania infantum: provision of reducing equivalents to the mitochondrial trypanothione/trypanothione peroxidase system." Exp Parasitol **120**(4): 421-3.

**Cavalier-Smith, T.** (2002). "The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 2): 297-354.

**Cavalier-Smith, T.** (Nov - 2006). "Protozoa: the most abundant predators on earth." Microbiology Today: 166-167.

**Cenas, N., Nivinskas, H., Anusevicius, Z., Sarlauskas, J., Lederer, F. y Arner, E. S.** (2004). "Interactions of quinones with thioredoxin reductase: a challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein." J Biol Chem **279**(4): 2583-92.

**Centers\_for\_Disease\_Control\_and\_Prevention** "<http://www.cdc.gov/>."

**Centers\_for\_Disease\_Control\_and\_Prevention** (<http://www.cdc.gov/>).

**Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A., Vargas, S., Hoeneisen, M. y Gonzalez, N.** (2003). "Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions." Biol Res **36**(3-4): 343-57.

---

**Cleland, W. W.** (1964). "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups." Biochemistry **3**: 480-2.

**Comini, M., Menge, U., Wissing, J. y Flohe, L.** (2005). "Trypanothione synthesis in crithidia revisited." J Biol Chem **280**(8): 6850-60.

**Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lunsdorf, H. y Flohe, L.** (2004). "Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target." Free Radic Biol Med **36**(10): 1289-302.

**Connell, J. P. y Mullet, J. E.** (1986). "Pea Chloroplast Glutathione Reductase: Purification and Characterization." Plant Physiol **82**(2): 351-356.

**Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A. y Carvalho, J. C.** (2006). "Ammonium and urea removal by Spirulina platensis." J Ind Microbiol Biotechnol **33**(1): 8-16.

**Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., Mottram, J. C. y Muller, S.** (2004). "The amitochondriate eukaryote Trichomonas vaginalis contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system." J Biol Chem **279**(7): 5249-56.

**Coudevylle, N., Antoine, M., Bouguet-Bonnet, S., Mutzenhardt, P., Boschi-Muller, S., Branlant, G. y Cung, M. T.** (2007). "Solution structure and backbone dynamics of the reduced form and an oxidized form of E. coli methionine sulfoxide reductase A (MsrA): structural insight of the MsrA catalytic cycle." J Mol Biol **366**(1): 193-206.

**Cowan, M. M.** (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev **12**(4): 564-82.

**Czechowicz, J. A., Wilhelm, A. K., Spalding, M. D., Larson, A. M., Engel, L. K. y Alberg, D. G.** (2007). "The synthesis and inhibitory activity of dethiotrypanothione and analogues against trypanothione reductase." J Org Chem **72**(10): 3689-93.

**Chagas\_Disease\_Alliance** <http://www.chagasdiseasealliance.blogspot.com/>.

**Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S. y Rhee, S. G.** (2004). "Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine." J Biol Chem **279**(49): 50994-1001.

**Chauhan, R. y Mande, S. C.** (2001). "Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity." Biochem J **354**(Pt 1): 209-15.

**Cheng, X. J. y Tachibana, H.** (2000). "Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from Entamoeba moshkovskii." Arch Med Res **31**(4 Suppl): S65-6.

**Cheng, X. J., Yoshihara, E., Takeuchi, T. y Tachibana, H.** (2004). "Molecular characterization of peroxiredoxin from Entamoeba moshkovskii and a comparison with Entamoeba histolytica." Mol Biochem Parasitol **138**(2): 195-203.

**Cheng, Z., Arscott, L. D., Ballou, D. P. y Williams, C. H., Jr.** (2007). "The relationship of the redox potentials of thioredoxin and thioredoxin reductase from Drosophila melanogaster to the enzymatic mechanism: reduced thioredoxin is the reductant of glutathione in Drosophila." Biochemistry **46**(26): 7875-85.

**Chitkul, B. y Bradley, M.** (2000). "Optimising inhibitors of trypanothione reductase using solid-phase chemistry." Bioorg Med Chem Lett **10**(20): 2367-9.

**Chivers, P. T. y Raines, R. T.** (1997). "General acid/base catalysis in the active site of Escherichia coli thioredoxin." Biochemistry **36**(50): 15810-6.

**Choi, M. H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B. E. y Reed, S. L.** (2005). "An unusual surface peroxiredoxin protects invasive Entamoeba histolytica from oxidant attack." Mol Biochem Parasitol **143**(1): 80-9.

**Chrambach, A. y Rodbard, D.** (1971). "Polyacrylamide gel electrophoresis." Science **172**(982): 440-51.

---

**Chung, Y. C. y Hurlbert, R. E.** (1975). "Purification and properties of the glutathione reductase of *Chromatium vinosum*." J Bacteriol **123**(1): 203-11.

**Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J. P. y Eklund, H.** (1996). "Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution." J Mol Biol **264**(5): 1044-57.

**Denisov, E. y Afanas'ev, I.** (2005). Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology, Taylor & Francis.

**Diamond, L. S., Harlow, D. R. y Cunnick, C. C.** (1978). "A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*." Trans R Soc Trop Med Hyg **72**(4): 431-2.

**Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U. y Heinz, E.** (2002). "Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornerutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis." Eur J Biochem **269**(16): 4105-13.

**Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P. G., Boland, W., Zahringer, U. y Heinz, E.** (2003). "New insight into *Phaeodactylum tricornerutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases." Plant Physiol **131**(4): 1648-60.

**Dormeyer, M., Reckenfelderbaumer, N., Ludemann, H. y Krauth-Siegel, R. L.** (2001). "Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase." J Biol Chem **276**(14): 10602-6.

**Dringen, R. y Gutterer, J. M.** (2002). "Glutathione reductase from bovine brain." Methods Enzymol **348**: 281-8.

**Eisenberg, D., Luthy, R. y Bowie, J. U.** (1997). "VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles." Methods Enzymol **277**: 396-404.

**El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Wortley, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E.,**

---

Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D. y Andersson, B. (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science 309(5733): 409-15.

el-Waer, A. F., Smith, K., McKie, J. H., Benson, T., Fairlamb, A. H. y Douglas, K. T. (1993). "The glutamyl binding site of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*: enzyme kinetic properties of gamma-glutamyl-modified substrate analogues." Biochim Biophys Acta 1203(1): 93-8.

Erat, M., Demir, H. y Sakiroglu, H. (2005). "Purification of glutathione reductase from chicken liver and investigation of kinetic properties." Appl Biochem Biotechnol 125(2): 127-38.

Espinosa, A., Clark, D. y Stanley, S. L., Jr. (2004). "Entamoeba histolytica alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) as a target for anti-amoebic agents." J Antimicrob Chemother 54(1): 56-9.

Ezraty, B., Aussel, L. y Barras, F. (2005). "Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes." Biochim Biophys Acta 1703(2): 221-9.

Ezraty, B., Grimaud, R., El Hassouni, M., Moinier, D. y Barras, F. (2004). "Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*." Embo J 23(8): 1868-77.

- 
- Fairlamb, A. H. y Cerami, A.** (1992). "Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida." Annu Rev Microbiol **46**: 695-729.
- Falciatore, A. y Bowler, C.** (2002). "REVEALING THE MOLECULAR SECRETS OF MARINE DIATOMS." Annual Reviews Plant Biology **53**: 109-30.
- Fang, J., Lu, J. y Holmgren, A.** (2005). "Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity." J Biol Chem **280**(26): 25284-90.
- Ferguson, K. A.** (1964). "Starch-Gel Electrophoresis--Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides." Metabolism **13**: SUPPL:985-1002.
- Flohé, L. y Harris, J. R.** (2007). Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions. London - U.K., Springer.
- Flohe, L., Hecht, H. J. y Steinert, P.** (1999). "Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 966-84.
- Flohe, L., Steinert, P., Hecht, H. J. y Hofmann, B.** (2002). "Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase." Methods Enzymol **347**: 244-58.
- Forman, H., Fukuto, J. y Torres, M.** (2004). Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles, Kluwer Academic Publisher.
- Friguet, B.** (2006). "Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress." FEBS Lett **580**(12): 2910-6.
- Gallogly, M. M. y Mieyal, J. J.** (2007). "Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress." Curr Opin Pharmacol **7**(4): 381-91.
- Gand, A., Antoine, M., Boschi-Muller, S. y Branlant, G.** (2007). "Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of methionine sulfoxide reductase A." J Biol Chem **282**(28): 20484-91.



- 
- Ghezzi, P.** (2005). "Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1378-81.
- Gleason, F. K.** (1992). "Mutation of conserved residues in Escherichia coli thioredoxin: effects on stability and function." Protein Sci **1**(5): 609-16.
- Gomez, M. L., Erijman, L., Arauzo, S., Torres, H. N. y Tellez-Inon, M. T.** (1989). "Protein kinase C in Trypanosoma cruzi epimastigote forms: partial purification and characterization." Mol Biochem Parasitol **36**(2): 101-8.
- Gommel, D. U., Nogoceke, E., Morr, M., Kiess, M., Kalisz, H. M. y Flohe, L.** (1997). "Catalytic characteristics of tryparedoxin." Eur J Biochem **248**(3): 913-8.
- Gordge, M. P., Hothersall, J. S. y Noronha-Dutra, A. A.** (1998). "Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione." Br J Pharmacol **124**(1): 141-8.
- Grachev, M. A., Annenkov, V. V. y Likhoshway, Y. V.** (2008). "Silicon nanotechnologies of pigmented heterokonts." Bioessays **30**(4): 328-37.
- Greig, N., Wyllie, S., Vickers, T. J. y Fairlamb, A. H.** (2006). "Trypanothione-dependent glyoxalase I in Trypanosoma cruzi." Biochem J **400**(2): 217-23.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J. y Barras, F.** (2001). "Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase." J Biol Chem **276**(52): 48915-20.
- Gromer, S., Merkle, H., Schirmer, R. H. y Becker, K.** (2002). "Human placenta thioredoxin reductase: preparation and inhibitor studies." Methods Enzymol **347**: 382-94.
- Gruber, A., Vugrinec, S., Hempel, F., Gould, S. B., Maier, U. G. y Kroth, P. G.** (2007). "Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif." Plant Mol Biol **64**(5): 519-30.
- Guerrero, S. A.** (2000). Trypanothione peroxidase system in trypanosomatids. Cloning, expression and functional characterization of its components. Braunschweig, Von der

---

Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina.

**Guerrero, S. A., Montemartini, M., Spallek, R., Hecht, H. J., Steinert, P., Flohe, L. y Singh, M.** (2000). "Cloning and expression of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*." Biofactors **11**(1-2): 67-9.

**Hall, G., Shah, M., McEwan, P. A., Laughton, C., Stevens, M., Westwell, A. y Emsley, J.** (2006). "Structure of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin C." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 12): 1453-7.

**Halliwell, B.** (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant Physiol **141**(2): 312-22.

**Hamilton, C. J., Saravanamuthu, A., Poupat, C., Fairlamb, A. H. y Eggleston, I. M.** (2006). "Time-dependent inhibitors of trypanothione reductase: analogues of the spermidine alkaloid lunarine and related natural products." Bioorg Med Chem **14**(7): 2266-78.

**Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. y Michels, P. A.** (2003). "Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida." Kinetoplastid Biol Dis **2**(1): 11.

**Hashemy, S. I. y Holmgren, A.** (2008). "Regulation of the Catalytic Activity and Structure of Human Thioredoxin 1 via Oxidation and S-Nitrosylation of Cysteine Residues." J. Biol. Chem. **283**: 21890-21898.

**Haugstetter, J., Blicher, T. y Ellgaard, L.** (2005). "Identification and characterization of a novel thioredoxin-related transmembrane protein of the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **280**(9): 8371-80.

**Henderson, G. B., Ulrich, P., Fairlamb, A. H., Rosenberg, I., Pereira, M., Sela, M. y Cerami, A.** (1988). ""Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5374-8.

**Henderson, G. B., Yamaguchi, M., Novoa, L., Fairlamb, A. H. y Cerami, A.** (1990). "Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*." Biochemistry **29**(16): 3924-9.

**Hirt, R. P., Muller, S., Embley, T. M. y Coombs, G. H.** (2002). "The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives." Trends Parasitol **18**(7): 302-8.

**Hisabori, T., Hara, S., Fujii, T., Yamazaki, D., Hosoya-Matsuda, N. y Motohashi, K.** (2005). "Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network." J Exp Bot **56**(416): 1463-8.

**Hofmann, B., Hecht, H. J. y Flohe, L.** (2002). "Peroxiredoxins." Biol Chem **383**(3-4): 347-64.

**Holdsworth, E. S. y Arshad, J. H.** (1977). "A manganese-copper-pigment-protein complex isolated from the photosystem II of *Phaeodactylum tricornutum*." Arch Biochem Biophys **183**(2): 361-73.

**Holmgren, A.** (1977). "Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction." J Biol Chem **252**(13): 4600-6.

**Holmgren, A.** (1979). "Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide." J Biol Chem **254**(19): 9627-32.

**Holmgren, A.** (1985). "Glutaredoxin from *Escherichia coli* and calf thymus." Methods Enzymol **113**: 525-40.

**Holmgren, A.** (1995). "Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide." Structure **3**(3): 239-43.

**Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M. E., Hudemann, C. y Lillig, C. H.** (2005). "Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1375-7.

**Holmgren, A., Ohlsson, I. y Grankvist, M. L.** (1978). "Thioredoxin from Escherichia coli. Radioimmunological and enzymatic determinations in wild type cells and mutants defective in phage T7 DNA replication." J Biol Chem **253**(2): 430-6.

**Holst, M., Kozack, R. E., Saied, F. y Subramaniam, S.** (1994). "Treatment of electrostatic effects in proteins: multigrid-based Newton iterative method for solution of the full nonlinear Poisson-Boltzmann equation." Proteins **18**(3): 231-45.

**Hughes, M. A., Lee, C. W., Holm, C. F., Ghosh, S., Mills, A., Lockhart, L. A., Reed, S. L. y Mann, B. J.** (2003). "Identification of Entamoeba histolytica thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein." Mol Biochem Parasitol **127**(2): 113-20.

**Hughes, M. A., Reed, S. L. y Mann, B. J.** (2000). "Role of the Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin in recruiting proteins to the host:parasite interface." Arch Med Res **31**(4 Suppl): S229-30.

**Hurd, T. R., Filipovska, A., Costa, N. J., Dahm, C. C. y Murphy, M. P.** (2005). "Disulphide formation on mitochondrial protein thiols." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1390-3.

**Icen, A. L.** (1971). "Kinetics of the reverse reaction catalyzed by glutathione reductase of yeast." FEBS Lett **16**(1): 29-32.

**Igoillo Esteve, M.** (2005). Clonado, expresión, caracterización y localización subcelular de las dos deshidrogenasas de la Vía de las Pentosas Fosfato en Trypanosoma cruzi (Glucosa 6 -fosfato deshidrogenasa y 6 -fosfogluconato deshidrogenasa). Instituto de investigaciones biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín.

**Irigoin, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohe, L. y Radi, R.** (2008). "Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification." Free Radic Biol Med.

**Jacquot, J. P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Marechal, P., Miginiac-Maslow, M. y Meyer, Y.** (1994). "Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli." J Mol Biol **235**(4): 1357-63.

---

**Jaeger, T. y Flohe, L.** (2006). "The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs." Biofactors **27**(1-4): 109-20.

**Jakobson, I., Askelof, P., Warholm, M. y Mannervik, B.** (1977). "A steady-state-kinetic random mechanism for glutathione S-transferase A from rat liver. A model involving kinetically significant enzyme-product complexes in the forward reaction." Eur J Biochem **77**(2): 253-62.

**Jocelyn, P. C.** (1967). "The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid." Eur J Biochem **2**(3): 327-31.

**Jockers-Scherubl, M. C., Schirmer, R. H. y Krauth-Siegel, R. L.** (1989). "Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds." Eur J Biochem **180**(2): 267-72.

**Jonsson, T. J., Johnson, L. C. y Lowther, W. T.** (2008). "Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace." Nature **451**(7174): 98-101.

**Jonsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C., Poole, L. B. y Lowther, W. T.** (2005). "Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin." Biochemistry **44**(24): 8634-42.

**Kang, S. W., Baines, I. C. y Rhee, S. G.** (1998). "Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine." J Biol Chem **273**(11): 6303-11.

**Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H. M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. y Becker, K.** (2001). "Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*." Science **291**(5504): 643-6.

**Kanzok, S. M., Schirmer, R. H., Turbachova, I., Iozef, R. y Becker, K.** (2000). "The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited." J Biol Chem **275**(51): 40180-6.

**Katti, S. K., LeMaster, D. M. y Eklund, H.** (1990). "Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution." J Mol Biol **212**(1): 167-84.

**Kauffmann, B., Aubry, A. y Favier, F.** (2005). "The three-dimensional structures of peptide methionine sulfoxide reductases: current knowledge and open questions." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 249-60.

**Kawakami, S. K., Gledhill, M. y Achterberg, E. P.** (2006). "Effects of metal combinations on the production of phytochelatins and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*." Biometals **19**(1): 51-60.

**Kelly, J. M., Taylor, M. C., Smith, K., Hunter, K. J. y Fairlamb, A. H.** (1993). "Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress." Eur J Biochem **218**(1): 29-37.

**Kelly, J. M., Ward, H. M., Miles, M. A. y Kendall, G.** (1992). "A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*." Nucleic Acids Res **20**(15): 3963-9.

**Kiley, P. J. y Storz, G.** (2004). "Exploiting thiol modifications." PLoS Biol **2**(11): e400.

**Kim, H. Y. y Gladyshev, V. N.** (2004). "Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases." Mol Biol Cell **15**(3): 1055-64.

**Kobiler, D. y Mirelman, D.** (1980). "Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites." Infect Immun **29**(1): 221-5.

**Konig, J., Baier, M., Horling, F., Kahmann, U., Harris, G., Schurmann, P. y Dietz, K. J.** (2002). "The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5738-43.

**Krause, G., Lundstrom, J., Barea, J. L., Pueyo de la Cuesta, C. y Holmgren, A.** (1991). "Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin." J Biol Chem **266**(15): 9494-500.

- Krauth-Siegel, R. L. y Comini, M. A.** (2008a). "Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism." Biochim Biophys Acta **1780**(11): 1236-48.
- Krauth-Siegel, R. L. y Comini, M. A.** (2008b). "Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism." Biochim Biophys Acta.
- Krauth-Siegel, R. L., Enders, B., Henderson, G. B., Fairlamb, A. H. y Schirmer, R. H.** (1987). "Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme." Eur J Biochem **164**(1): 123-8.
- Krauth-Siegel, R. L. y Inhoff, O.** (2003a). "Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule." Parasitol Res **90 Suppl 2**: S77-85.
- Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K. y Schmidt, H.** (2003b). "The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*." Biol Chem **384**(4): 539-49.
- Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H., Krauth-Siegel, R. L. y Clayton, C.** (2000). "Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress." Mol Microbiol **35**(3): 542-52.
- Krishna, C., Jain, R., Kashav, T., Wadhwa, D., Alam, N. y Gourinath, S.** (2007). "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cysteine synthase from *Entamoeba histolytica*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **63**(Pt 6): 512-5.
- Kroth, P.** (2007). "Molecular biology and the biotechnological potential of diatoms." Adv Exp Med Biol **616**: 23-33.
- Kroth, P. G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M. S., Stanley, M. S., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T., Maheswari, U., Armbrust, E. V. y Bowler, C.** (2008). "A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis." PLoS ONE **3**(1): e1426.

- Kumar, A., Shen, P. S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. y Samuelson, J.** (1992). "Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10188-92.
- Kwon, S. J., Kwon, S. I., Bae, M. S., Cho, E. J. y Park, O. K.** (2007). "Role of the methionine sulfoxide reductase MsrB3 in cold acclimation in *Arabidopsis*." Plant Cell Physiol **48**(12): 1713-23.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lantwin, C. B., Schlichting, I., Kabsch, W., Pai, E. F. y Krauth-Siegel, R. L.** (1994). "The structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state." Proteins **18**(2): 161-73.
- Lee, B. C., Lee, Y. K., Lee, H. J., Stadtman, E. R., Lee, K. H. y Chung, N.** (2005). "Cloning and characterization of antioxidant enzyme methionine sulfoxide-S-reductase from *Caenorhabditis elegans*." Arch Biochem Biophys **434**(2): 275-81.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Wilson, I. B., Altmann, F. y Duchene, M.** (2007). "Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase." PLoS Biol **5**(8): e211.
- Lennon, B. W., Williams, C. H., Jr. y Ludwig, M. L.** (1999). "Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor." Protein Sci **8**(11): 2366-79.
- Leon-Avila, G. y Tovar, J.** (2004). "Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome." Microbiology **150**(Pt 5): 1245-50.
- Lodi, A., Binaghi, L., Solisio, C., Converti, A. y Del Borghi, M.** (2003). "Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*." J Ind Microbiol Biotechnol **30**(11): 656-60.



---

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N. M., Petri, W. A., Jr., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M. y Hall, N. (2005). "The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*." Nature **433**(7028): 865-8.

Lopez, J. A., Carvalho, T. U., de Souza, W., Flohe, L., Guerrero, S. A., Montemartini, M., Kalisz, H. M., Nogoceke, E., Singh, M., Alves, M. J. y Colli, W. (2000). "Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*." Free Radic Biol Med **28**(5): 767-72.

Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. y Matthews, B. W. (2002). "The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB." Nat Struct Biol **9**(5): 348-52.

Ludemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follmann, H. y Krauth-Siegel, R. L. (1998). "*Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes." FEBS Lett **431**(3): 381-5.

Luthy, R., Bowie, J. U. y Eisenberg, D. (1992). "Assessment of protein models with three-dimensional profiles." Nature **356**(6364): 83-5.

Madamanchi, N. R., Anderson, J. V., Alscher, R. G., Cramer, C. L. y Hess, J. L. (1992). "Purification of Multiple Forms of Glutathione Reductase from Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings and Enzyme Levels in Ozone-Fumigated Pea Leaves." Plant Physiol **100**(1): 138-145.

**Maheswari, U., Montsant, A., Goll, J., Krishnasamy, S., Rajyashri, K. R., Patell, V. M. y Bowler, C.** (2005). "The Diatom EST Database." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D344-7.

**Manevich, Y., Feinstein, S. I. y Fisher, A. B.** (2004). "Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3780-5.

**Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J.** (1982). Molecular Cloning: A laboratory Manual. N. Y. - USA, Cold Spring Harhor.

**Mann, D. G.** (1989). The species concept in diatoms: Evidence for morphologically distinct, sympatric gamodemes in four epipelagic species. Plant Systematics and Evolution. Wien, S., SpringerLink. **164**.

**Marion, S., Tavares, P., Arhets, P. y Guillen, N.** (2004). "Signal transduction through the Gal-GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein." Mol Biochem Parasitol **135**(1): 31-8.

**Marsh, I. R. y Bradley, M.** (1997). "Substrate specificity of trypanothione reductase." Eur J Biochem **243**(3): 690-4.

**Martin, W. y Borst, P.** (2003). "Secondary loss of chloroplasts in trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 765-7.

**Massimine, K. M., McIntosh, M. T., Doan, L. T., Atreya, C. E., Gromer, S., Sirawaraporn, W., Elliott, D. A., Joiner, K. A., Schirmer, R. H. y Anderson, K. S.** (2006). "Eosin B as a novel antimalarial agent for drug-resistant *Plasmodium falciparum*." Antimicrob Agents Chemother **50**(9): 3132-41.

**Matsuo, Y., Akiyama, N., Nakamura, H., Yodoi, J., Noda, M. y Kizaka-Kondoh, S.** (2001). "Identification of a novel thioredoxin-related transmembrane protein." J Biol Chem **276**(13): 10032-8.

- 
- Mattern, C. F., Keister, D. B. y Natovitz, P. C.** (1980). "Entamoeba histolytica "toxin": fetuin neutralizable and lectin-like." Am J Trop Med Hyg **29**(1): 26-30.
- McCoy, J. J. y Mann, B. J.** (2005). "Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in Entamoeba histolytica." Exp Parasitol **110**(3): 220-5.
- McLaughlin, J. y Aley, S.** (1985). "The biochemistry and functional morphology of the Entamoeba." J Protozool **32**(2): 221-40.
- Mehlotra, R. K.** (2004). "Parasitic protozoa: thiol-based redox metabolism." Trends Parasitol **20**(2): 58-9.
- Michels, P. A., Bringaud, F., Herman, M. y Hannaert, V.** (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-77.
- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O. y Netto, L. E.** (2007). "Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 4886-91.
- Montemartini, M., Kalisz, H. M., Kiess, M., Nogoceke, E., Singh, M., Steinert, P. y Flohe, L.** (1998). "Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel trypanredoxin from Crithidia fasciculata." Biol Chem **379**(8-9): 1137-42.
- Montrichard, F., Le Guen, F., Laval-Martin, D. L. y Davioud-Charvet, E.** (1999). "Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: Euglena gracilis Z." FEBS Lett **442**(1): 29-33.
- Morelli, E., Mascherpa, M. C. y Scarano, G.** (2005). "Biosynthesis of phytochelatin and arsenic accumulation in the marine microalga Phaeodactylum tricorutum in response to arsenate exposure." Biometals **18**(6): 587-93.
- Morelli, E. y Pratesi, E.** (1997). "Production of phytochelatin in the marine diatom Phaeodactylum tricorutum in response to copper and cadmium exposure." Bull Environ Contam Toxicol **59**(4): 657-64.

---

**Morelli, E. y Scarano, G.** (2001). "Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*." Mar Environ Res **52**(4): 383-95.

**Morelli, E. y Scarano, G.** (2004). "Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*." Plant Science **167**: 289-296.

**Moroff, G. y Brandt, K. G.** (1975). "Yeast glutathione reductase. Studies of the kinetics and stability of the enzyme as a function of pH and salt concentration." Biochim Biophys Acta **410**(1): 21-31.

**Moskovitz, J.** (2005). "Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 213-9.

**Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S. y Stadtman, E. R.** (2001). "Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 12920-5.

**Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M. y Stadtman, E. R.** (1998). "Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14071-5.

**Moskovitz, J., Singh, V. K., Requena, J., Wilkinson, B. J., Jayaswal, R. K. y Stadtman, E. R.** (2002). "Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 62-5.

**Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M. T. y Hisabori, T.** (2001). "Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11224-9.

**Moutiez, M., Aumercier, M., Schoneck, R., Meziane-Cherif, D., Lucas, V., Aumercier, P., Ouaisi, A., Sergheraert, C. y Tartar, A.** (1995). "Purification and characterization of a

---

trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **310** ( Pt 2): 433-7.

**Muller, S., Liebau, E., Walter, R. D. y Krauth-Siegel, R. L.** (2003). "Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites." Trends Parasitol **19**(7): 320-8.

**Mustacich, D. y Powis, G.** (2000). "Thioredoxin reductase." Biochem J **346 Pt 1**: 1-8.

**Nathan, C. y Shiloh, M. U.** (2000). "Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8841-8.

**Nikitovic, D. y Holmgren, A.** (1996). "S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide." J Biol Chem **271**(32): 19180-5.

**Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H. M. y Flohe, L.** (1997). "A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*." Biol Chem **378**(8): 827-36.

**Nordberg, J. y Arner, E. S.** (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-312.

**Nozaki, T., Ali, V. y Tokoro, M.** (2005). "Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa." Adv Parasitol **60**: 1-99.

**Ocadiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-Lopez, J., Garcia-Perez, R. M., Sanchez, T., Castillo-Juarez, B. A., Garcia-Rivera, G. y Rodriguez, M. A.** (2005). "EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence." Cell Microbiol **7**(2): 221-32.

**Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A. y Branlant, G.** (2002). "Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*." J Biol Chem **277**(14): 12016-22.

---

Ondarza, R. N., Hernandez, E., Iturbe, A., Hurtado, G. y Tamayo, E. M. (1999a). "Detection by HPLC of a trypanothione synthetase activity in vitro from *Entamoeba histolytica*." Biotechnol Appl Biochem **30** ( Pt 1): 41-5.

Ondarza, R. N., Hurtado, G., Iturbe, A., Hernandez, E., Tamayo, E. y Woolery, M. (2005). "Identification of trypanothione from the human pathogen *Entamoeba histolytica* by mass spectrometry and chemical analysis." Biotechnol Appl Biochem **42**(Pt 2): 175-81.

Ondarza, R. N., Iturbe, A., Hurtado, G., Tamayo, E., Ondarza, M. y Hernandez, E. (1999b). "*Entamoeba histolytica*: a eukaryote with trypanothione metabolism instead of glutathione metabolism." Biotechnol Appl Biochem **30** ( Pt 1): 47-52.

Ondarza, R. N., Tamayo, E. M., Hurtado, G., Hernandez, E. y Iturbe, A. (1997). "Isolation and purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione from *Entamoeba histolytica*." Arch Med Res **28** Spec No: 73-5.

Organización\_Mundial\_de\_la\_Salud <http://www.who.int/es/>.

Organización\_Paramericana\_de\_la\_Salud [http://www.paho.org/default\\_spa.htm](http://www.paho.org/default_spa.htm).

Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. y Sanchez, T. (1983). "*Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor." J Exp Med **158**(5): 1511-21.

Osipova, S. V., Permyakov, A. V., Mitrofanova, T. N., Dudareva, L. V. y Trufanov, V. A. (2005). "Characteristics of thiol:protein disulfide oxidoreductase from wheat (*Triticum aestivum* L.) grain." Biochemistry (Mosc) **70**(8): 935-40.

Oza, S. L., Ariyanayagam, M. R., Aitcheson, N. y Fairlamb, A. H. (2003). "Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 25-33.

Oza, S. L., Tetaud, E., Ariyanayagam, M. R., Warnon, S. S. y Fairlamb, A. H. (2002). "A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **277**(39): 35853-61.

**Oza, S. L., Wyllie, S. y Fairlamb, A. H.** (2006). "Mapping the functional synthetase domain of trypanothione synthetase from *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **149**(1): 117-20.

**Pabst, M. J., Habig, W. H. y Jakoby, W. B.** (1974). "Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration." J Biol Chem **249**(22): 7140-7.

**Pai, E. F. y Schulz, G. E.** (1983). "The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates." J Biol Chem **258**(3): 1752-7.

**Parfrey, L. W., Barbero, E., Lasser, E., Dunthorn, M., Bhattacharya, D., Patterson, D. J. y Katz, L. A.** (2006). "Evaluating support for the current classification of eukaryotic diversity." PLoS Genet **2**(12): e220.

**Parsonage, D., Karplus, P. A. y Poole, L. B.** (2008). "Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8209-14.

**Parsons, M.** (2004). "Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose." Mol Microbiol **53**(3): 717-24.

**Parveen, S., Khan, M. O., Austin, S. E., Croft, S. L., Yardley, V., Rock, P. y Douglas, K. T.** (2005). "Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor, and of N-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide." J Med Chem **48**(25): 8087-97.

**Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L. y Dunand, C.** (2007). "PeroxiBase: the peroxidase database." Phytochemistry **68**(12): 1605-11.

**Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A. y Darley-Usmar, V. M.** (1999). "Biological aspects of reactive nitrogen species." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 385-400.

- Petropoulos, I. y Friguert, B.** (2006). "Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair." Free Radic Res **40**(12): 1269-76.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R. y Radi, R.** (2008). "Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite." Biochem J **410**(2): 359-68.
- Piattoni, C. V., Blancato, V. S., Miglietta, H., Iglesias, A. A. y Guerrero, S. A.** (2006). "On the occurrence of thioredoxin in *Trypanosoma cruzi*." Acta Trop **97**(2): 151-60.
- Picaud, T. y Desbois, A.** (2006). "Interaction of glutathione reductase with heavy metal: the binding of Hg(II) or Cd(II) to the reduced enzyme affects both the redox dithiol pair and the flavin." Biochemistry **45**(51): 15829-37.
- Pineyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T. y Robello, C.** (2008). "Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?" Gene **408**(1-2): 45-50.
- Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O. y Radi, R.** (1997). "Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups." Biochem J **322** ( Pt 1): 167-73.
- Rahlfs, S., Schirmer, R. H. y Becker, K.** (2002). "The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites." Cell Mol Life Sci **59**(6): 1024-41.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. y Rengasamy, R.** (2007). "Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production." Appl Microbiol Biotechnol **74**(3): 517-23.
- Rakauskiene, G. A., Cenas, N. K. y Kulys, J. J.** (1989). "A 'branched' mechanism of the reverse reaction of yeast glutathione reductase. An estimation of the enzyme standard potential values from the steady-state kinetics data." FEBS Lett **243**(1): 33-6.
- Ramos-Martinez, E., Olivos-Garcia, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Sanchez, E. C., Tello, E., El-Hafidi, M., Saralegui, A., Pineda, E., Delgado, J., Montfort, I. y Perez-Tamayo, R.** (2008). "*Entamoeba histolytica*: Oxygen resistance and virulence." Int J Parasitol.



---

**Reckenfelderbaumer, N. y Krauth-Siegel, R. L.** (2002). "Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of Trypanosoma brucei trypanothione." J Biol Chem **277**(20): 17548-55.

**Reiriz, S., Cid, A., Torres, E., Abalde, J. y Herrero, C.** (1994). "Different responses of the marine diatom Phaeodactylum tricornutum to copper toxicity." Microbiologia **10**(3): 263-72.

**Repetto, Y., Opazo, E., Maya, J. D., Agosin, M. y Morello, A.** (1996). "Glutathione and trypanothione in several strains of Trypanosoma cruzi: effect of drugs." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **115**(2): 281-5.

**Reynolds, C. M., Meyer, J. y Poole, L. B.** (2002). "An NADH-dependent bacterial thioredoxin reductase-like protein in conjunction with a glutaredoxin homologue form a unique peroxiredoxin (AhpC) reducing system in Clostridium pasteurianum." Biochemistry **41**(6): 1990-2001.

**Rhee, S. G., Chae, H. Z. y Kim, K.** (2005a). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." Free Radic Biol Med **38**(12): 1543-52.

**Rhee, S. G., Jeong, W., Chang, T. S. y Woo, H. A.** (2007). "Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance." Kidney Int Suppl(106): S3-8.

**Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S. y Woo, H. A.** (2005b). "Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 183-9.

**Rivarola, H. W. y Paglini-Oliva, P. A.** (2002). "Trypanosoma cruzi trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **2**(1): 43-52.

**Rodbard, D. y Chrambach, A.** (1970). "Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration." Proc Natl Acad Sci U S A **65**(4): 970-7.

---

**Rogers, M. y Keeling, P. J.** (2004). "Lateral transfer and re-compartmentalization of Calvin cycle enzymes of plants and algae." J Mol Evol **58**(4): 367-75.

**Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J. M., Jordy, M. N., De Fay, E., Hirasawa, M., Duplessis, S., Lemaire, S. D., Frey, P., Martin, F., Manieri, W., Knaff, D. B. y Jacquot, J. P.** (2004). "Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense." Plant Physiol **134**(3): 1027-38.

**Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J. P. y Boschi-Muller, S.** (2007). "Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases." J Biol Chem **282**(5): 3367-78.

**Round, F. E. y Crawford, R. M.** (1990). The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. UK, Cambridge University Press.

**Sambrook, J. y Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual (3-Volume Set). USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. y Schneider, G.** (2001). "Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9533-8.

**Scala, S., Carels, N., Falciatore, A., Chiusano, M. L. y Bowler, C.** (2002). "Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*." Plant Physiol **129**(3): 993-1002.

**Scott, E. M., Duncan, I. W. y Ekstrand, V.** (1963). "Purification and Properties of Glutathione Reductase of Human Erythrocytes." J Biol Chem **238**: 3928-33.

**Schmidt, H. y Krauth-Siegel, R. L.** (2003). "Functional and physicochemical characterization of the thioredoxin system in *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **278**(47): 46329-36.

---

**Sen, A., Chatterjee, N. S., Akbar, M. A., Nandi, N. y Das, P.** (2007). "The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress." Eukaryot Cell **6**(4): 664-73.

**Serrano, A.** (1992). "Purification, characterization and function of dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain P.C.C. 7119." Biochem J **288** (Pt 3): 823-30.

**Serrano, A., Rivas, J. y Losada, M.** (1984). "Purification and properties of glutathione reductase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7119." J Bacteriol **158**(1): 317-24.

**Serrato, A. J., Perez-Ruiz, J. M. y Cejudo, F. J.** (2002). "Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat." Biochem J **367**(Pt 2): 491-7.

**Shigeoka, S., Onishi, T., Nakano, Y. y Kitaoka, S.** (1987). "Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* z." Biochem J **242**(2): 511-5.

**Shimon, L. J., Gohberg, E., Peretz, M., Burstein, Y. y Frolow, F.** (2006). "Structure of alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 5): 541-7.

**Siman-Tov, R. y Ankri, S.** (2003). "Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*." Parasitol Res **89**(2): 146-9.

**Smirnoff, N.** (2005). Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Blackwell Publishing.

**Souza, J. M. y Radi, R.** (1998). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite." Arch Biochem Biophys **360**(2): 187-94.

**Souza, W.** (2008). "Electron microscopy of trypanosomes: a historical view." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(4): 313-25.

---

**Spinella, S., Levavasseur, E., Petek, F. y Rigother, M. C.** (1999). "Purification and biochemical characterization of a novel cysteine protease of *Entamoeba histolytica*." Eur J Biochem **266**(1): 170-80.

**Spinella, S., Petek, F., Gayral, P. y Rigother, M. C.** (1997). "A novel cysteine protease in *Entamoeba histolytica*." Arch Med Res **28 Spec No**: 180-1.

**St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H. y Nathan, C.** (2001). "Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9901-6.

**Starke, D. W., Chock, P. B. y Mieyal, J. J.** (2003). "Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction." J Biol Chem **278**(17): 14607-13.

**Steenkamp, D. J.** (2002). "Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids." Antioxid Redox Signal **4**(1): 105-21.

**Steinert, P., Plank-Schumacher, K., Montemartini, M., Hecht, H. J. y Flohe, L.** (2000). "Permutation of the active site motif of trypanredoxin 2." Biol Chem **381**(3): 211-9.

**Sullivan, F. X. y Walsh, C. T.** (1991). "Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **44**(1): 145-7.

**Tamayo, E. M., Iturbe, A., Hernandez, E., Hurtado, G., de Lourdes Gutierrez, X. M., Rosales, J. L., Woolery, M. y Ondarza, R. N.** (2005). "Trypanothione reductase from the human parasite *Entamoeba histolytica*: a new drug target." Biotechnol Appl Biochem **41**(Pt 2): 105-15.

**Tannich, E., Bruchhaus, I., Walter, R. D. y Horstmann, R. D.** (1991). "Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase." Mol Biochem Parasitol **49**(1): 61-71.

---

**Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S. y Hart, P. J.** (2003). "Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine." J Bacteriol **185**(14): 4119-26.

**Tazreiter, M., Leitsch, D., Hatzenbichler, E., Mair-Scorpio, G. E., Steinborn, R., Schreiber, M. y Duchene, M.** (2008). "Entamoeba histolytica: response of the parasite to metronidazole challenge on the levels of mRNA and protein expression." Exp Parasitol **120**(4): 403-10.

**TDR-Home\_Page** <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>.

**Teixeira, S. M.** (1998). "Control of gene expression in Trypanosomatidae." Braz J Med Biol Res **31**(12): 1503-16.

**Teixeira, S. M. y daRocha, W. D.** (2003). "Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae." Genet Mol Res **2**(1): 148-58.

**Tekwani, B. L. y Mehlotra, R. K.** (1999). "Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*." Microbes Infect **1**(5): 385-94.

**Temperton, N. J., Wilkinson, S. R., Meyer, D. J. y Kelly, J. M.** (1998). "Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole." Mol Biochem Parasitol **96**(1-2): 167-76.

**Tetaud, E., Lecuix, I., Sheldrake, T., Baltz, T. y Fairlamb, A. H.** (2002). "A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **120**(2): 195-204.

**Thomson, L., Denicola, A. y Radi, R.** (2003). "The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity." Arch Biochem Biophys **412**(1): 55-64.

**Tovar, J., Cunningham, M. L., Smith, A. C., Croft, S. L. y Fairlamb, A. H.** (1998). "Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of

---

a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5311-6.

**Tsai, Y. C., Yang, T. Y., Cheng, S. W., Li, S. N. y Wang, Y. J.** (1991). "High-yield extraction and purification of glutathione reductase from baker's yeast." Prep Biochem **21**(2-3): 175-85.

**Upcroft, P. y Upcroft, J. A.** (2001). "Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa." Clin Microbiol Rev **14**(1): 150-64.

**Urig, S., Lieske, J., Fritz-Wolf, K., Irmeler, A. y Becker, K.** (2006). "Truncated mutants of human thioredoxin reductase 1 do not exhibit glutathione reductase activity." FEBS Lett **580**(15): 3595-600.

**Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieschlag, E. y Ross, G. T.** (1971). "A method for producing specific antisera with small doses of immunogen." J Clin Endocrinol Metab **33**(6): 988-91.

**Vanoni, M. A., Wong, K. K., Ballou, D. P. y Blanchard, J. S.** (1990). "Glutathione reductase: comparison of steady-state and rapid reaction primary kinetic isotope effects exhibited by the yeast, spinach, and Escherichia coli enzymes." Biochemistry **29**(24): 5790-6.

**Vougier, S., Mary, J. y Friguet, B.** (2003). "Subcellular localization of methionine sulphoxide reductase A (MsrA): evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells." Biochem J **373**(Pt 2): 531-7.

**Vrieling, E. G., Sun, Q., Beelen, T. P., Hazelaar, S., Gieskes, W. W., van Santen, R. A. y Sommerdijk, N. A.** (2005). "Controlled silica synthesis inspired by diatom silicon biomineralization." J Nanosci Nanotechnol **5**(1): 68-78.

**Wassmann, C. y Bruchhaus, I.** (2000). "Superoxide dismutase reduces susceptibility to metronidazole of the pathogenic protozoan Entamoeba histolytica under microaerophilic but not under anaerobic conditions." Arch Biochem Biophys **376**(1): 236-8.

**Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E. y Bruchhaus, I.** (1999). "Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase." J Biol Chem **274**(37): 26051-6.

**Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G. y Montfort, W. R.** (1996). "Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer." Structure **4**(6): 735-51.

**Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Lowther, W. T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C. y Brot, N.** (2002). "Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function." Arch Biochem Biophys **397**(2): 172-8.

**Wendel, A.** (1981). "Glutathione peroxidase." Methods Enzymol **77**: 325-33.

**Weston, C. J., White, S. A. y Jackson, J. B.** (2001). "The unusual transhydrogenase of *Entamoeba histolytica*." FEBS Lett **488**(1-2): 51-4.

**Wilkinson, S. R., Meyer, D. J., Taylor, M. C., Bromley, E. V., Miles, M. A. y Kelly, J. M.** (2002a). "The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin." J Biol Chem **277**(19): 17062-71.

**Wilkinson, S. R., Obado, S. O., Mauricio, I. L. y Kelly, J. M.** (2002b). "*Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13453-8.

**Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Touitha, S., Mauricio, I. L., Meyer, D. J. y Kelly, J. M.** (2002c). "TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum." Biochem J **364**(Pt 3): 787-94.

**Williams, C. H., Arscott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K. y Schirmer, R. H.** (2000). "Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved." *Eur J Biochem* **267**(20): 6110-7.

**Winyard, P. G., Moody, C. J. y Jacob, C.** (2005). "Oxidative activation of antioxidant defence." *Trends Biochem Sci* **30**(8): 453-61.

**Wolf, M., Seibel, P. N., Dandekar, T. y Lynn, D. H.** (2006). "A java applet for exploring the new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." *J Eukaryot Microbiol* **53**(5): 315.

**Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T. S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S. y Rhee, S. G.** (2005). "Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins." *J Biol Chem* **280**(5): 3125-8.

**Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R. y Karplus, P. A.** (2002). "Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins." *Biochemistry* **41**(17): 5493-504.

**Wood, Z. A., Poole, L. B. y Karplus, P. A.** (2003a). "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling." *Science* **300**(5619): 650-3.

**Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. y Poole, L. B.** (2003b). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." *Trends Biochem Sci* **28**(1): 32-40.

**Yongmanitchai, W. y Ward, O. P.** (1991). "Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions." *Appl Environ Microbiol* **57**(2): 419-25.

**Zaslavskaja, L. A., Lippmeier, J. C., Kroth, P. G., Grossman, A. R. y Apt, K. E.** (2000). "Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes." *Journal of Phycology* **36**: 379-386.



**Zhang, Y., Bond, C. S., Bailey, S., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H. y Hunter, W. N.** (1996). "The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution." Protein Sci **5**(1): 52-61.

**Zhong, L. y Holmgren, A.** (2000). "Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations." J Biol Chem **275**(24): 18121-8.