

Tesis de Doctorado en Química
Facultad de Química - PEDECIBA Química

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA CISTATIONINA β -SINTASA:
PROPIEDADES REDOX DEL HEMO Y REACTIVIDAD DE SU PRODUCTO, EL
SULFURO DE HIDRÓGENO**

Juan Sebastián Carballal Zeballos

Orientador: Dra. Beatriz Alvarez

Co-Orientador: Dr. Rafael Radi

Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad de la República
Montevideo, 2011

Esta tesis está dedicada a mi familia:
Ana y Carlos, Federico y Noelia, Matías e Inés y Cata
por su aguante y apoyo incondicional

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. Metabolismo de aminoácidos azufrados.....	9
2.1.1. Metionina.....	10
2.1.2. Homocisteína.....	10
2.1.3. Cisteína.....	14
2.2. Cistationina β -sintasa.....	16
2.2.1. Organización estructural: cofactores y variante trunca dimérica.....	16
2.2.2. Mecanismo de reacción.....	20
2.2.3. Hemo de la CBS.....	22
2.3. Sulfuro de hidrógeno.....	27
2.3.1. Propiedades fisicoquímicas.....	27
2.3.2. Síntesis y catabolismo del sulfuro de hidrógeno.....	27
2.3.3. Roles fisiológicos.....	30
2.4. Especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno.....	31
2.4.1. Radical anión superóxido.....	31
2.4.2. Peróxido de hidrógeno.....	32
2.4.3. Radical hidroxilo.....	32
2.4.4. Ácido hipocloroso y cloraminas.....	33
2.4.5. Óxido nítrico.....	33
2.4.6. Peroxinitrito.....	34
2.4.7. Radical carbonato.....	36
2.4.8. Dióxido de nitrógeno.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo general.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
3.2.1. Expresión, purificación y caracterización de preparados de CBS recombinante humana.....	37
3.2.2. Determinación del potencial de reducción y de la reactividad frente al oxígeno del hemo de la CBS.....	37
3.2.3. Estudio de la reducción del hemo de la CBS por sistemas biológicos.....	37
3.2.4. Caracterización de la reactividad del sulfuro de hidrógeno frente a oxidantes de relevancia biológica.....	37
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4.1. Estudios bioquímicos con la cistationina β -sintasa.....	39

4.2.	Preparación y cuantificación de especies reactivas.....	44
4.3.	Estudio de la reactividad del sulfuro de hidrógeno.....	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1.	Expresión, purificación y caracterización de preparados de CBS recombinante humana.....	51
5.1.1.	Expresión y purificación de la CBS	51
5.1.2.	Caracterización bioquímica de la CBS purificada.....	52
5.2.	Potencial redox del hemo de la CBS y estudio de su reactividad con oxígeno .	58
5.2.1.	Determinación del potencial redox.....	58
5.2.2.	Reactividad del oxígeno con el hemo reducido de la CBS	64
5.2.3.	Determinación de la constante de velocidad de reacción entre Fe(II)CO-CBS y oxígeno.....	72
5.2.4.	Discusión.....	76
5.3.	Estudio de la reducción del hemo de la CBS por sistemas biológicos	77
5.3.1.	Exposición de CBS a fracciones subcelulares	77
5.3.2.	Exposición de CBS a flavoproteínas	81
5.3.3.	Discusión.....	91
5.4.	Reactividad del sulfuro de hidrógeno con peroxinitrito y otros oxidantes de interés biológico	93
5.4.1.	Reactividad del sulfuro de hidrógeno con peroxinitrito	93
5.4.2.	Reactividad del sulfuro de hidrógeno con dióxido de nitrógeno.....	100
5.4.3.	Reactividad del sulfuro de hidrógeno con peróxido de hidrógeno	102
5.4.4.	Reactividad del sulfuro de hidrógeno con hipoclorito	102
5.4.5.	Reactividad del sulfuro de hidrógeno con taurina cloramina	104
5.4.6.	Discusión.....	105
6.	CONCLUSIONES.....	111
7.	AGRADECIMIENTOS.....	113
8.	REFERENCIAS	115

1. RESUMEN

Este trabajo se centra en una de las enzimas del metabolismo de aminoácidos azufrados, la cistationina β -sintasa (CBS). La CBS cataliza la reacción de condensación de homocisteína y serina para formar cistationina en la primera reacción de la vía de la transulfuración, que conduce a la formación de cisteína a partir de metionina. Además puede catalizar la producción de sulfuro de hidrógeno, molécula de creciente interés por su capacidad de modular procesos fisiológicos en mamíferos, actuando como neuromodulador y vasodilatador. La elevación en la concentración plasmática de homocisteína, que puede deberse a deficiencias en la CBS, constituye por causas aun desconocidas, un factor independiente de riesgo de enfermedades cardiovasculares.

La CBS posee un cofactor piridoxal fosfato esencial para la catálisis y un inusual grupo hemo, hexacoordinado con cisteína e histidina, de función desconocida. En el curso del trabajo de doctorado, nos enfocamos en las propiedades redox del hemo de la CBS recombinante humana. El potencial de reducción fue determinado por titulación potenciométrica como -291 ± 5 mV (pH 7.2). Mediante espectrofotometría de flujo detenido, se estudió la cinética de reacción entre el oxígeno y la CBS previamente reducida, determinando una constante de velocidad de $(1.11 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C. La ausencia de cinética de saturación o de especies intermediarias detectables sugirió un mecanismo de esfera externa. Esta reacción dio lugar a la formación de radical anión superóxido. Así, de existir la CBS reducida *in vivo*, podría constituir una nueva fuente de generación de superóxido en el compartimento citosólico, proponiendo un mecanismo novedoso de formación de especies reactivas a partir de las vías del metabolismo de la homocisteína. También se caracterizó la cinética de reoxidación del producto de reacción de la CBS con monóxido de carbono, el Fe(II)CO, especie para la que se propuso un rol sensor.

El conocimiento de la reducción biológica del hemo en la CBS constituye un punto central a la hora de asignar un rol para este cofactor en la proteína, puesto que en estado férrico el hemo es muy estable y no pierde la coordinación con cisteína ni uno de sus ligandos exógenos. El valor del potencial de reducción determinado, aunque es bajo, no lo es tanto como para impedir su posible reducción *in vivo*. Posibles candidatos para efectuar esta reducción en sistemas biológicos, podrían ser flavoproteínas localizadas, al igual que la CBS, en el compartimento citosólico. Por tanto, en este trabajo se exploró la posible reducción de la enzima por fracciones subcelulares citosólicas, así como con flavino reductasas purificadas, obteniendo evidencia de esta reducción en presencia de la enzima metionina sintasa reductasa.

Por último se abordó el estudio de la bioquímica del sulfuro de hidrógeno, caracterizando su reactividad con diversos oxidantes de interés biológico. La constante de velocidad para la reacción directa, por dos electrones, con el peroxinitrito fue determinada como $(4.8 \pm 1.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C. A su vez, a bajas concentraciones de sulfuro de hidrógeno se evidenció un incremento en el consumo de oxígeno, consistente con un mecanismo de oxidación por un electrón que inició una cadena de reacciones radicalares. Estas reacciones fueron además estudiadas en forma complementaria mediante simulaciones asistidas por computadora. Las reacciones de oxidación por peróxido de hidrógeno, hipoclorito y taurina cloramina, presentaron constantes de velocidad de (0.73 ± 0.03) , $(8 \pm 3) \times 10^7$ y $(303 \pm 27) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (pH 7.4, 37 °C). A su vez, se comparó la reactividad del sulfuro de hidrógeno frente a estos oxidantes respecto a la de tioles de bajo peso molecular como cisteína y glutatión. Aunque del análisis de estos resultados se desprende que de acuerdo a las bajas concentraciones del sulfuro en diferentes tejidos, su capacidad antioxidante no daría cuenta de los efectos citoprotectores reportados, creemos que estos estudios contribuyen a comprender la química de esta molécula y dan consistencia a mecanismos de acción fisiológica y farmacológica considerando sus posibles aplicaciones terapéuticas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Metabolismo de aminoácidos azufrados

La metionina y la cisteína son aminoácidos azufrados que se encuentran metabólicamente relacionados. La metionina da lugar a la formación de intermediarios que son utilizados como fuente de azufre en la vía de la transulfuración para la síntesis de la cisteína (Figura 1).

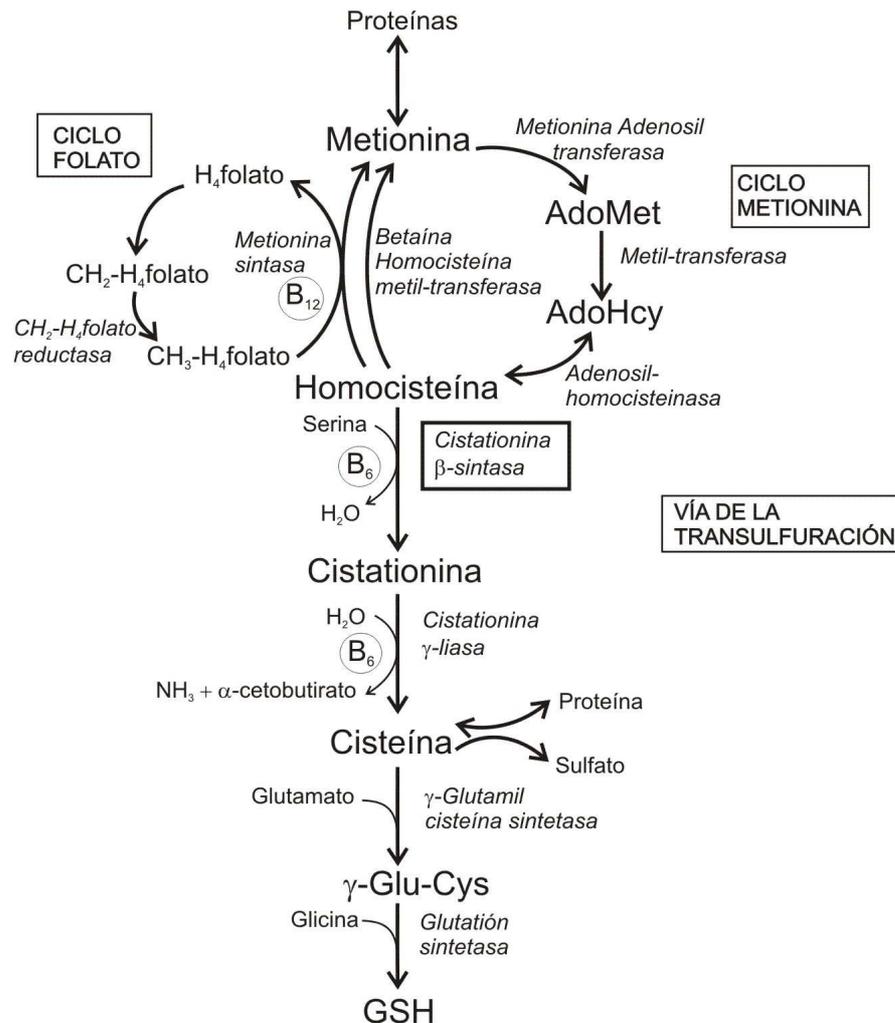


Figura 1. Esquema del metabolismo de aminoácidos azufrados.
Adaptado de (9).

En mamíferos, desde el punto de vista nutricional, la cisteína es un aminoácido semiesencial, que pierde el carácter de esencial si hay suficiente metionina. La metionina, en cambio, es esencial aunque haya suficiente cisteína, dado que la vía de la transulfuración es irreversible. La metionina constituye el punto de partida para la síntesis de S-adenosilmetionina (AdoMet o SAM), un agente de metilación de gran relevancia biológica. La S-adenosilhomocisteína (AdoHcy o SAH) generada por la transferencia del grupo metilo del AdoMet, se hidroliza generando adenosina y homocisteína. La homocisteína puede metilarse para formar nuevamente metionina o alternativamente se puede combinar con serina para dar cistationina que finalmente forma cisteína.

La cisteína, que proviene directamente de la dieta o a través de la vía de la transulfuración, es utilizada en la síntesis de proteínas y como precursora de un grupo de moléculas importantes como glutatión, pantoteína, coenzima A, ácido lipoico, taurina y distintas formas de azufre inorgánico como sulfato o sulfuro. A nivel hepático, se estima que cerca del 50 % de la cisteína para la síntesis del glutatión proviene de la homocisteína por la vía de la transulfuración (9). La concentración intracelular de glutatión es elevada (de 2 a 10 mM dependiendo del tipo celular) y permite mantener un reservorio de cisteína en forma activa, no tóxica y es la manera en la que se exporta la cisteína a los tejidos extrahepáticos. Además protege a las células del daño oxidativo causado por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. En este caso se genera glutatión oxidado (GSSG) que puede ser reducido a expensas de la glutatión reductasa en presencia de NADPH, por lo cual el glutatión tiene un rol importante en el mantenimiento del estado redox a nivel celular.

A continuación se describen brevemente las vías metabólicas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos azufrados: metionina, homocisteína y cisteína (tema revisado extensamente en (10-12)).

2.1.1. Metionina

El metabolismo de la metionina se inicia con la formación de S-adenosilmetionina (AdoMet o SAM) en una reacción dependiente de ATP catalizada por la metionina adenosil transferasa (Figura 2). El AdoMet presenta un grupo metilo altamente reactivo en el ion sulfonio, que puede ser transferido en reacciones catalizadas por metilasas a diferentes sustratos aceptores que poseen oxígenos o nitrógenos nucleofílicos, entre ellos la glicina para formar sarcosina, guanidinoacetato para dar creatina, fosfatidiletanolamina para formar fosfatidilcolina, así como a proteínas y bases de ADN y ARN.

Como producto en las reacciones de transmetilación se genera S-adenosilhomocisteína (AdoHcy o SAH), el cual se hidroliza en forma reversible con ayuda de la adenosilhomocisteína hidrolasa para dar adenosina y homocisteína. El equilibrio en esta reacción está desplazado hacia la formación de S-adenosilhomocisteína, por lo cual el flujo a través del ciclo de la metionina depende de que la concentración de homocisteína se mantenga baja, lo cual sucede en condiciones normales facilitado por la rápida metabolización de la homocisteína. Sin embargo, en situaciones patológicas en las que hay un incremento en la homocisteína, se genera una acumulación de S-adenosilhomocisteína, lo cual repercute en las reacciones de metilación dado que el AdoHcy es un potente inhibidor de las enzimas que utilizan AdoMet (13).

Finalmente, el AdoMet tiene como destino alternativo aunque minoritario su participación en la síntesis de poliaminas. En este caso, el AdoMet decarboxilado puede transferir el grupo propilamino a la putrescina para formar espermidina y espermina.

2.1.2. Homocisteína

La homocisteína, formada a partir de S-adenosilhomocisteína, constituye el punto crucial en el que se interrelacionan tres vías metabólicas: el ciclo de la metionina, la vía de la transulfuración y el ciclo del folato (Figura 2). De acuerdo a las necesidades metabólicas, la homocisteína tiene diferentes destinos: puede conducir a la formación de AdoHcy por la reacción reversa a la hidrólisis, puede ser remetilada a metionina, puede entrar en la vía de la transulfuración para dar cisteína o incluso, si los niveles celulares son altos, se

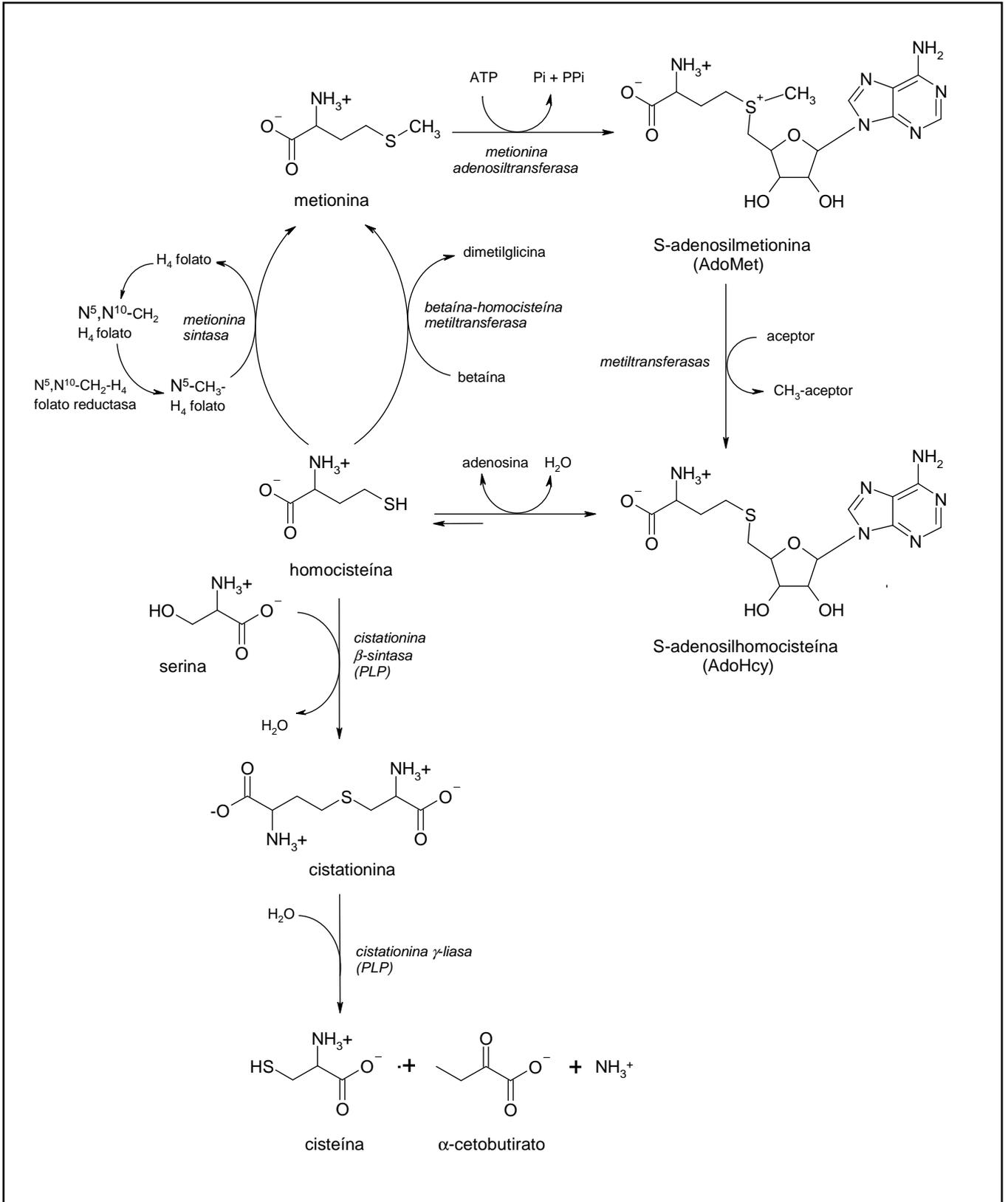


Figura 2. Esquema de las vías de la transmetilación y de la transulfuración. La remetilación utiliza nuevos grupos metilo sintetizados a partir del ciclo del folato o a partir del sistema colina/betaína. En la vía de la transulfuración, la homocisteína se convierte en cisteína a expensas de dos enzimas dependientes de PLP: la CBS y CGL. Esquema adaptado de (10).

puede exportar al plasma. Un destino minoritario para la homocisteína es el de transaminación, aunque puede tornarse relevante en condiciones de acumulaciones patológicas de este aminoácido.

La remetilación de la homocisteína permite regenerar la metionina utilizando nuevos grupos metilo sintetizados en el ciclo del folato. Este proceso ocurre a expensas de la metionina sintasa que cataliza la transferencia del grupo metilo del N^6 -metiltetrahidrofolato. La metionina sintasa se encuentra ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos y utiliza como coenzima la metilcobalamina derivada de la vitamina B₁₂. Este sistema requiere de la enzima auxiliar metionina sintasa reductasa, una flavoproteína oxidorreductasa que cumple un rol como enzima reparadora de la metionina sintasa, dado que reduce a expensas de NADPH a su cofactor cob(II)alamina a cob(I)alamina y lo mantiene en su forma reactiva para cumplir con el ciclo catalítico (14). El N^6 -metiltetrahidrofolato se obtiene a partir de la reducción irreversible del N^6,N^{10} -metilentetrahidrofolato, en una reacción catalizada por la flavoproteína N^6,N^{10} -metilentetrahidrofolato reductasa, que utiliza NADH como dador de electrones. Alternativamente, la metilación a metionina puede ocurrir a expensas de la betaína-homocisteína metiltransferasa, enzima que utiliza grupos metilo preformados de la betaína derivada de la colina. Esta vía tiene menor relevancia, dado que la enzima parece estar presente sólo en hígado y riñón, aunque su incidencia puede verse incrementada cuando hay deficiencias nutricionales (alta colina, bajo folato) o en ciertas patologías (13).

En la vía de la transulfuración, se transfiere de forma irreversible el átomo de azufre de la homocisteína a la serina para formar cisteína. En esta vía participan dos enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato (PLP): la cistationina β -sintasa (CBS) y la cistationina γ -liasa (CGL). La CBS cataliza la reacción de condensación de homocisteína y serina para formar cistationina, la cual es luego hidrolizada en una reacción catalizada por la CGL, dando cisteína, α -cetobutirato y amonio.

Aunque todas las células son capaces de realizar reacciones de transmetilación y remetilación, no todas completan la vía de la transulfuración, por lo que en este caso exportan homocisteína o cistationina. El catabolismo de la homocisteína por la vía de la transulfuración está restringido a ciertos tipos de tejidos que contienen ambas enzimas, la CBS y CGL, presentes principalmente en el hígado y páncreas, así como en riñón y cerebro (15-17).

La remetilación y la transulfuración constituyen dos vías que compiten por la homocisteína, cuyo destino está finamente regulado a varios niveles. El AdoMet constituye el principal regulador actuando a modo de interruptor entre ambos destinos, dado que es un inhibidor alostérico de la $N_{5,10}$ -metilentetrahidrofolato reductasa, pero a su vez actúa como activador de la CBS. De esta forma, altas concentraciones intracelulares de AdoMet, usualmente como consecuencia de un elevado consumo de metionina en la dieta, promoverán la vía de la transulfuración, limitando la remetilación. En cambio, a bajas concentraciones de AdoMet la remetilación se verá aumentada para conservar la metionina.

Hiperhomocisteinemia

Un aumento en los niveles de homocisteína provoca su exportación al plasma y conduce a la hiperhomocisteinemia. Se estima que en condiciones normales, la homocisteína se encuentra en el plasma en un rango de concentración entre 5-15 μ M, pero en situaciones de hiperhomocisteinemia severa pueden alcanzar valores mayores a 100 μ M. Es importante tener en cuenta que estos datos refieren a la homocisteína total en plasma, donde circula con una muy pequeña fracción del total en forma reducida (1 a 4 %),

mientras que el resto forma disulfuros unidos a proteínas, como a la albúmina, o disulfuros mixtos con otros tioles de bajo peso molecular (18-21).

El incremento en el nivel de homocisteína constituye un factor independiente de riesgo de enfermedades a nivel vascular. Esta correlación fue originalmente observada en pacientes con aterosclerosis que además presentaban trastornos del metabolismo de la homocisteína (22). Incluso elevaciones moderadas de homocisteína han sido asociadas con oclusión de arterias periféricas, así como enfermedades coronaria y cerebrovascular (23, 24). Se estima que cada incremento en la concentración de homocisteína en 5 μM , está asociado con un aumento del 20 % en el riesgo de enfermedades coronarias, independientemente de los factores de riesgo tradicionales (25). La hiperhomocisteinemia también se vincula con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson y con múltiples desórdenes que incluyen defectos en el tubo neural, dislocación del cristalino y retardo mental (26-29).

La hiperhomocisteinemia severa puede ser heredada como un trastorno autosómico recesivo que resulta en deficiencias congénitas de las enzimas que participan en la metabolización de la homocisteína, como la cistationina β -sintasa, la metionina sintasa, o la $N_{5,10}$ -metilentetrahidrofolato reductasa. Los incrementos de homocisteína más moderados pueden surgir como consecuencia de deficiencias nutricionales, dado que las enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína son altamente dependientes de cofactores esenciales. En este sentido, las enzimas de la vía de la transulfuración, CBS y CGL utilizan como cofactor PLP (vitamina B_6), mientras que la metionina sintasa requiere de cobalamina (vitamina B_{12}) y N_5 -metiltetrahidrofolato, derivado del folato (vitamina B_9). A su vez las enzimas $N_{5,10}$ -metilentetrahidrofolato reductasa y metionina sintasa reductasa son flavoproteínas que requieren de flavina (vitamina B_2) y utilizan NAD(P)H (vitamina B_3) como dadores de electrones.

Aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual incrementos en los niveles de la homocisteína se correlacionan con el daño vascular, aunque seguramente sea causado por múltiples factores.

En los mecanismos moleculares que median el daño a nivel celular podría estar involucrada la hipometilación, dado que un incremento de homocisteína redundaría en la acumulación de AdoHcy, limitando la conversión de homocisteína a metionina con la consecuente alteración en la metilación de proteínas y en particular de ácidos nucleicos, afectando la expresión génica (30, 31). Otro de los mecanismos propuestos se relaciona con la modificación de proteínas por *S*-homocisteinilación, a partir de la formación de enlaces disulfuro entre la homocisteína y cisteínas proteicas mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro. A su vez, la homocisteína tiolactona, metabolito reactivo formado a partir de homocisteína y que ha sido relacionado con la progresión de la lesión aterosclerótica, es capaz de formar enlaces amida con el grupo amino de lisinas proteicas, conduciendo a su *N*-homocisteinilación. En este sentido, en pacientes con hiperhomocisteinemia, deficientes en las enzimas CBS y N^6,N^{10} -metilentetrahidrofolato reductasa, se ha determinado un marcado aumento en los niveles de *N*-homocisteinilación de proteínas plasmáticas (32-35). También se han atribuido los efectos nocivos a la actividad prooxidante de la homocisteína, dado que podría sufrir autooxidación y generar especies reactivas del oxígeno, capaces de promover la lipoperoxidación, así como disminuir la funcionalidad del óxido nítrico y afectar las defensas antioxidantes (36-39). Sin embargo, es importante puntualizar que muchos de los estudios reportados se han realizado exponiendo líneas celulares a concentraciones muy elevadas de homocisteína, aún para condiciones de hiperhomocisteinemia, del orden de micromolar alto o incluso milimolar, lo cual cuestiona su relevancia fisiológica.

2.1.3. Cisteína

En mamíferos, la cisteína se sintetiza a partir de la metionina y se obtiene como producto final de la vía de la transulfuración, lo cual se evidencia en su estructura, donde el átomo de azufre proviene de la metionina y el esqueleto carbonado es aportado por la serina. La cisteína se puede encontrar como cisteína reducida o como disulfuro con otra cisteína, formando cistina.

La cisteína sintetizada endógenamente o proveniente de la dieta se utiliza como precursora para la síntesis de proteínas y diversas moléculas esenciales, tales como glutatión, coenzima A, taurina y azufre inorgánico. El glutatión funciona como un reservorio de cisteína y constituye la forma en la cual se exporta la cisteína a los tejidos extrahepáticos. En cuanto a su catabolismo, la vía más importante en mamíferos implica la oxidación a cisteínasulfinato en un proceso catalizado por la cisteína dioxigenasa, enzima fuertemente regulada para asegurar un control de la cisteína libre a nivel intracelular. La cisteínasulfinato puede tener dos destinos: ser descarboxilada para formar hipotaurina que se oxida a taurina; o alternativamente ser transaminada con α -cetoglutarato para dar el intermediario β -sulfinilpiruvato que se descompone en forma espontánea para dar piruvato y sulfito. El sulfito a su vez puede ser oxidado por acción de la sulfito oxidasa para dar sulfato, que se excreta en la orina o es activado a 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) dador de sulfatos para numerosas moléculas (Figura 3).

Los mamíferos carecen de la capacidad de reducir el sulfato o sulfito inorgánico a tiosulfato o sulfuro y por tanto, dependen de vías de desulfuración de la cisteína para generar formas reducidas de azufre inorgánico. El sulfuro de hidrógeno se forma como producto de reacciones parcialmente inespecíficas, no oxidativas, de desulfuración de la cisteína (estas reacciones se detallan más adelante en la sección de sulfuro de hidrógeno). La cisteína puede dar origen también a sulfanos. Éstos comprenden una serie de compuestos con átomos de azufre divalentes unidos en forma covalente a otro azufre, que además pueden unirse a hidrógeno. Dentro de esta categoría se incluyen los persulfuros (RSS^-), polisulfuros (RS_nR , con $n > 3$), politionatos ($^-\text{O}_3\text{SS}_n\text{SO}_3^-$), el tiosulfonato (RSO_2S^-), tiosulfato (SSO_3^{2-}) y el azufre elemental (S_8). Estas formas de azufre reducido son utilizadas en mamíferos en diferentes rutas biosintéticas, que incluyen la construcción de centros ferrosulfurados, de molibdopterina o la síntesis de tionucleósidos. Los persulfuros pueden ser generados o utilizados por diferentes enzimas. Por ejemplo, la proteína SoxAX en bacterias, involucrada en la oxidación del tiosulfato, presenta en su sitio activo un hemo coordinado a una histidina y al persulfuro de la cisteína (tiocisteína, CysSS^-) (40). En mamíferos, se han identificado proteínas mitocondriales capaces de generar tiocisteína, para transferir formas reducidas de azufre en la construcción de centros ferrosulfurados (41). Además se han encontrado tres actividades enzimáticas acopladas a la cadena respiratoria mitocondrial que catalizan la oxidación del sulfuro para dar tiosulfato mediante oxidación y transferencia de azufres vía persulfuros (42). Otro ejemplo lo constituye la rodanasa, enzima que cataliza la transferencia del azufre reactivo del tiosulfato al cianuro, generando tiocianato, así como la mercaptopiruvato sulfurotransferasa que también puede transferir azufre al cianuro o al sulfato.

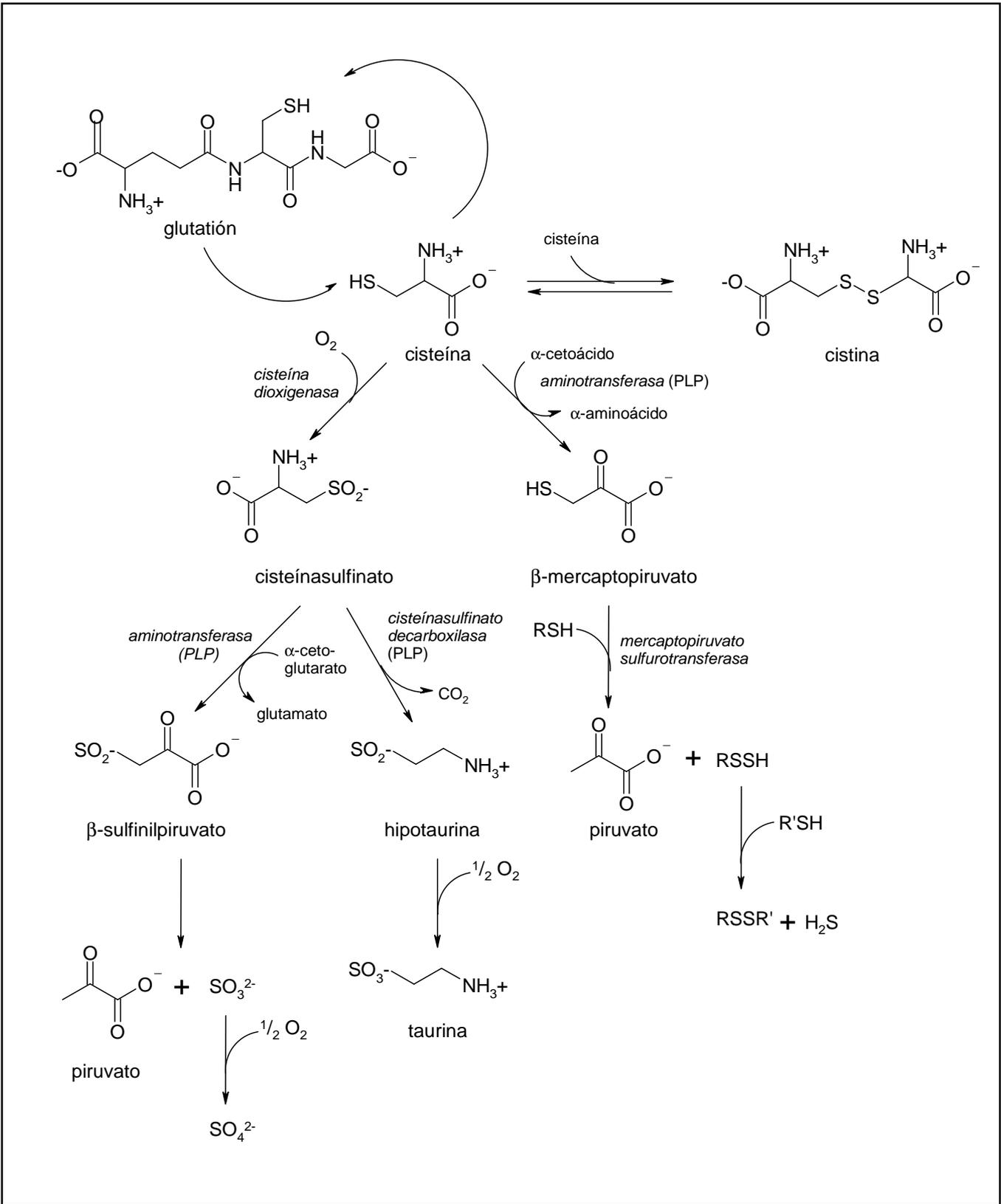
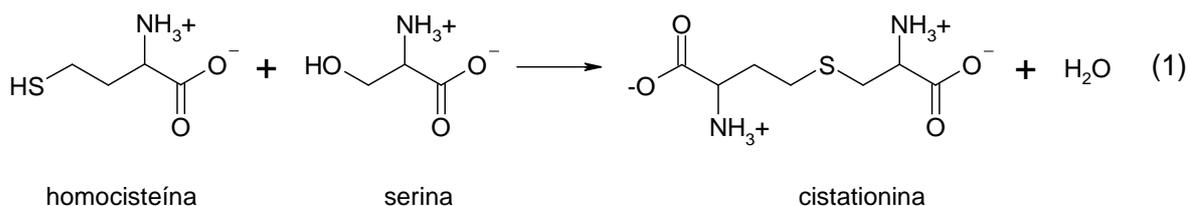


Figura 3. Esquema del metabolismo de la cisteína. Vías del catabolismo de la cisteína. Adaptado de (10).

2.2. Cistationina β -sintasa

La enzima cistationina β -sintasa (CBS; EC 4.2.1.22) juega un rol central en el metabolismo de aminoácidos azufrados de mamíferos. Participa en el primer paso de la vía de la transulfuración catalizando de manera PLP-dependiente la condensación de homocisteína y serina para formar cistationina (reacción 1), que luego conduce a la síntesis de cisteína. Puede además catalizar reacciones secundarias por ejemplo al utilizar como sustratos homocisteína y cisteína, dando lugar a la formación de cistationina y sulfuro de hidrógeno (H_2S) en lugar de agua.



La CBS constituye un importante mecanismo para mantener bajas las concentraciones intracelulares de homocisteína, cuyo incremento en plasma, como fue mencionado está relacionado con la manifestación de daño a nivel vascular y en el sistema nervioso central (43). Los errores innatos del metabolismo a nivel de la CBS son la causa más común de hiperhomocisteinemia hereditaria. De hecho se han identificado hasta el presente más de 150 mutaciones, listadas en <http://cbs.lf1.cuni.cz/index.php>.

2.2.1. Organización estructural: cofactores y variante trunca dimérica

El gen que codifica para el ARNm de la CBS humana se encuentra en el cromosoma 21, en la región 21q22.3 (44). El producto de la traducción del gen es una proteína de 551 aminoácidos con una masa molecular de 63 kDa que forma tetrámeros de subunidades idénticas u oligómeros mayores. La CBS humana se localiza en el compartimento citosólico de muchos tipos celulares y también ha sido detectada en el núcleo (45, 46). La enzima se expresa en diferentes tejidos, principalmente en el hígado, páncreas, riñón y en menor proporción en el cerebro. A nivel estructural, cada subunidad de la CBS une a ambos sustratos (homocisteína y serina) y presenta una organización modular que comprende una región de unión al grupo hemo en el extremo N-terminal, al que le sigue un dominio central en el cual el PLP se encuentra unido en el sitio activo y finalmente en el extremo C-terminal, un dominio regulatorio que une el AdoMet como activador alostérico (47, 48) (Figura 4).

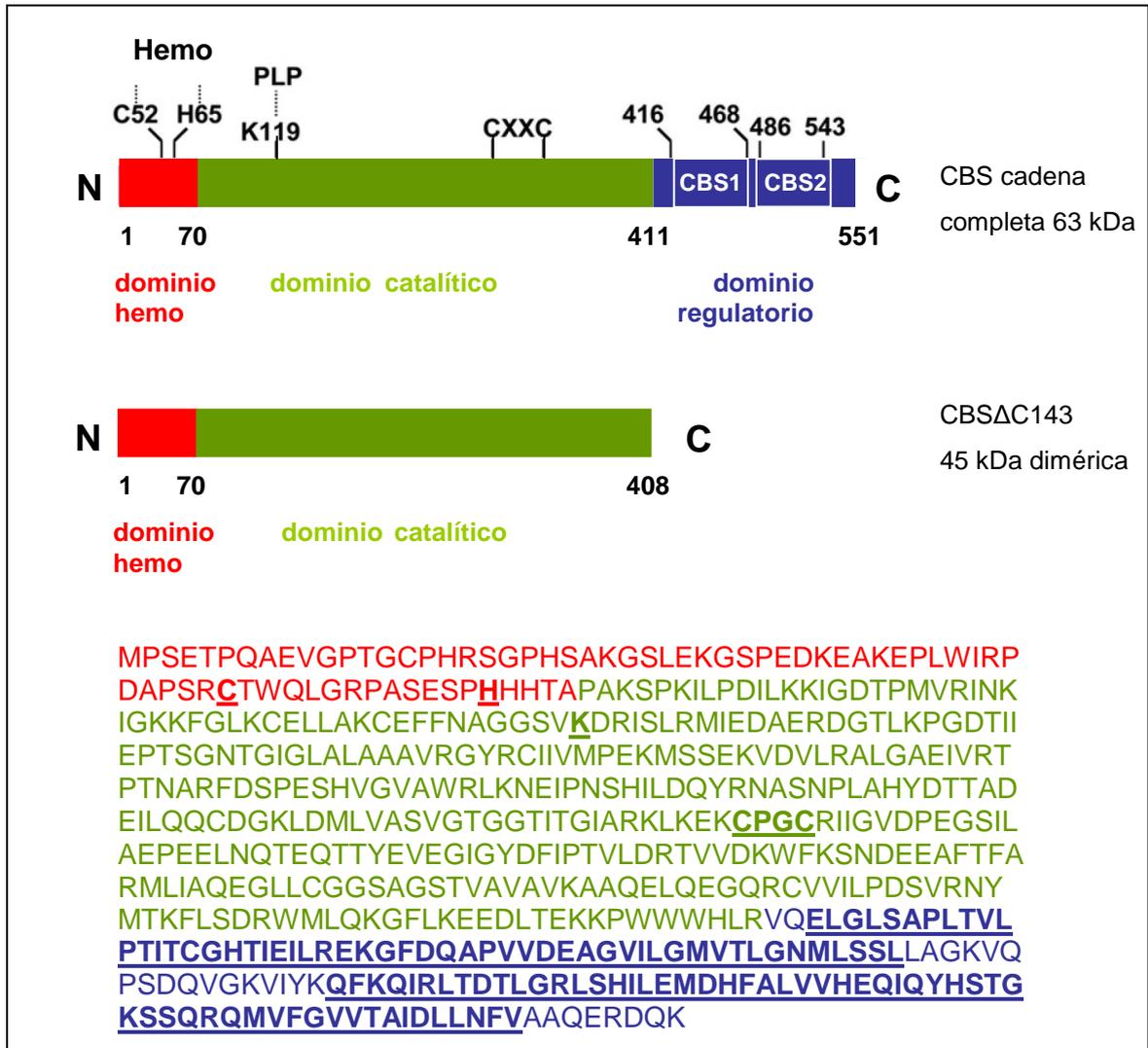


Figura 4. Organización estructural y secuencia aminoacídica de cada monómero de la CBS. En rojo se muestra el dominio N-terminal de unión al hemo. En la secuencia, se indican subrayados los aminoácidos Cys52 e His65 que coordinan el hemo. En verde se visualiza el dominio catalítico de unión al PLP, donde se destaca subrayada la Lys119 que forma la base de Schiff y el dominio oxidorreductasa Cys₂₇₂PGCy₂₇₅. En azul se muestra el dominio regulatorio C-terminal de unión al AdoMet. Los dominios CBS se destacan subrayados.

El dominio central es el responsable de la actividad catalítica de la CBS. En esta región el cofactor PLP se encuentra unido de forma covalente formando una base de Schiff con una lisina (K119) en el sitio activo y en forma análoga a su función en otras enzimas dependientes de PLP, participa en el mecanismo de catálisis de la reacción de β -sustitución del grupo hidroxilo de la serina con el tiol de la homocisteína. Por alineamiento de secuencias, se ha determinado que este dominio central está muy conservado y comparte un plegamiento estructural común con el observado para otros miembros de la familia β o plegamiento tipo II de las enzimas PLP-dependientes, tales como la O-acetilserina sulfurohidrolasa, la treonina deaminasa o la triptofano sintasa (49, 50).

En contraste, el dominio de unión al hemo localizado en el extremo N-terminal y compuesto por ~70 aminoácidos, no presenta homología de secuencia ni comparte un plegamiento estructural común con otras hemoproteínas, por lo que su antecedente

evolutivo permanece desconocido. Un dato interesante es que la CBS constituye la única enzima dependiente de PLP que además presenta un cofactor hemo. El hemo, del tipo protoporfirina IX, se encuentra hexacoordinado, con el plano del anillo perpendicular a la superficie proteica y presenta como ligandos axiales el tiolato de una cisteína (Cys52) y una histidina (His65) (50, 51). Se ha establecido que el hemo no es esencial para la actividad enzimática, dado que está ausente en ciertas especies como en levaduras o en *Trypanosoma cruzi*, que de todos modos conservan la actividad (52-54). Por tanto, la presencia del hemo en la CBS de mamíferos parece ser reciente en términos evolutivos, y a pesar que su adquisición resulta costosa en términos bioquímicos, hasta el momento no ha sido determinada su función en la enzima.

En el extremo C-terminal, se encuentra un dominio regulador que responde al activador alostérico AdoMet, cuya unión genera un incremento de 3 veces en la actividad enzimática (55). El dominio regulador incluye una repetición en tandem de dos secuencias hidrofóbicas denominadas "dominios CBS", los cuales presentan una conformación característica con estructura secundaria del tipo $-\beta-\alpha-\beta-\beta-\alpha-$ que une derivados de adenosina y se encuentra presente en diversas proteínas (56). En la CBS humana, estos dominios se extienden entre los residuos 416-468 y 486-543 y se cree que ejercen un efecto autoinhibitorio de la actividad enzimática, por lo que tanto la unión del AdoMet o la remoción parcial por proteólisis de este dominio redundan en un aumento en la actividad enzimática (48, 57). Se ha determinado que la unión del AdoMet puede también modular la estabilidad de la proteína, incrementando su vida media (58). Por tanto, la sensibilidad de la CBS en cuanto a su actividad y estabilidad frente al AdoMet enfatiza el rol regulador de este efector.

Entre el dominio catalítico y el regulador, la CBS presenta un sitio hipersensible que es susceptible al clivaje proteolítico. Por proteólisis limitada o estrategias de biología molecular en las que se eliminan los últimos 143 aminoácidos del extremo C-terminal, se obtiene una variante trunca dimérica formada por monómeros de 45 kDa, por lo cual cada monómero puede unir ambos cofactores: hemo y PLP, pero no responde al AdoMet. Esta hidrólisis parcial genera un incremento en la actividad enzimática (Tabla 1), así como un cambio a nivel estructural en las propiedades de oligomerización, dado que forma dímeros en lugar de tetrámeros y resulta menos propensa a la agregación que la proteína de cadena completa (47, 48). Esta variante dimérica de la enzima se ha encontrado en células hepáticas desafiadas con la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral (TNF α) (59).

Se ha conseguido cristalizar y resolver la estructura tridimensional de la CBS trunca dimérica (hCBS Δ 143, residuos 1-413) (50, 51, 60) (Figura 5), la cual revela un inusual dominio de unión al hemo en un loop del extremo N-terminal que contiene sus ligandos axiales (Cys52 e His65) al cual se une el hemo de forma no covalente. Además, el hemo se localiza en un bolsillo hidrofóbico de la estructura proteica y está particularmente expuesto y accesible al solvente. El PLP se encuentra a una distancia del hemo de $\sim 20\text{\AA}$, emplazado en una cavidad estrecha, por lo que el sitio activo es accesible al sustrato por un canal angosto. El PLP establece múltiples interacciones electrostáticas, en particular el grupo fosfato con aminoácidos presentes en un loop rico en residuos de glicina (G₂₅₆-T-G-G-T₂₆₀), en conjunto responsables de la arquitectura del sitio activo. La CBS presenta además un motivo oxidoreductasa de disulfuros, caracterizado por una secuencia C₂₇₂-P-G-C₂₇₅, donde las cisteínas pueden estar reducidas como tiol u oxidadas formando un disulfuro (50, 51) (Figura 6). Este dominio es de función desconocida en la enzima y se ha postulado que podría participar de reacciones redox a nivel celular. Es interesante el hecho que, de acuerdo al análisis de la secuencia, este motivo estaría presente en otras CBS de mamífero que contienen el grupo hemo, pero está ausente en especies más distantes que no lo contienen (50).

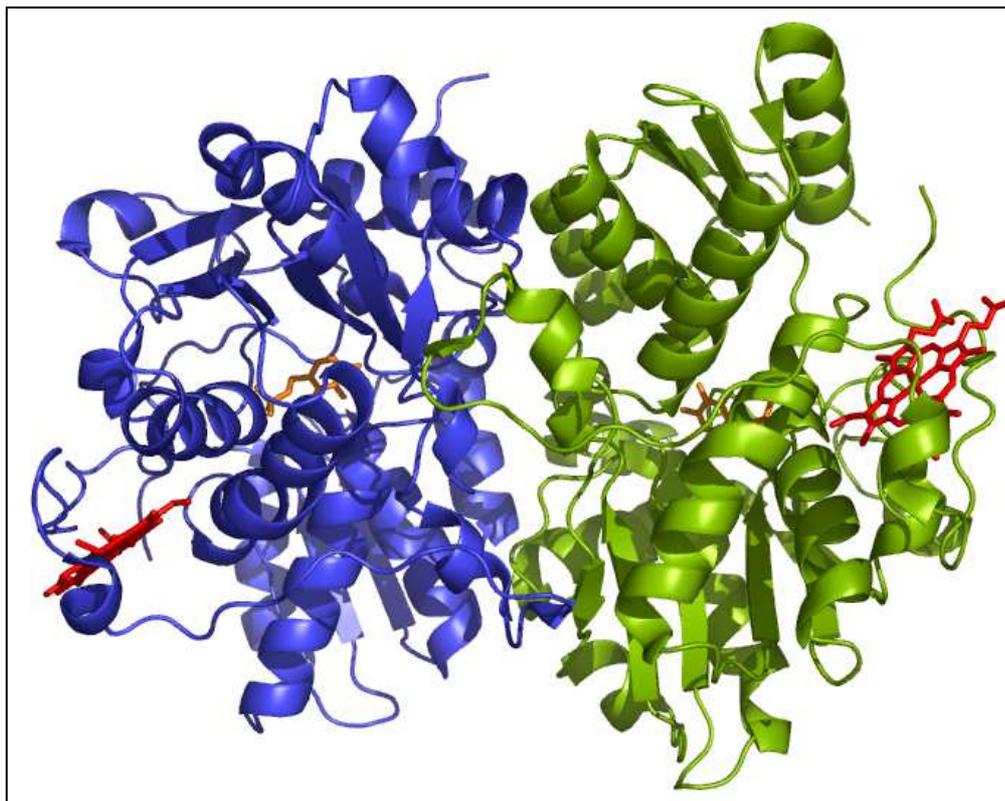


Figura 5. Estructura de la variante CBS trunca dimérica. Los monómeros se representan en verde y azul. El cofactor PLP se destaca en color anaranjado y el cofactor hemo en rojo. La información estructural se obtuvo de PubMed (código de acceso 1JBQ) (50) y se visualizó con el programa PyMOL Molecular Graphics Systems v0.99 (61).

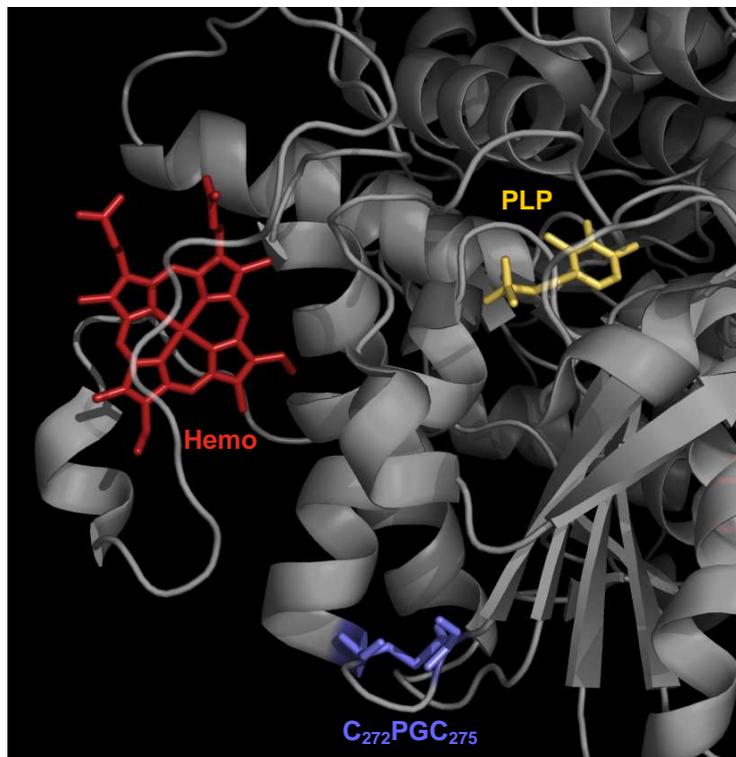


Figura 6. Acercamiento de la estructura del monómero de la variante CBS trunca dimérica. Se destaca la localización del cofactor hemo (rojo), PLP (amarillo) y el dominio oxidorreductasa (azul), distantes entre sí $\sim 20\text{Å}$.

2.2.2. Mecanismo de reacción

Se ha propuesto que la CBS utiliza un proceso de tipo ping-pong para la reacción de β -sustitución, en la cual el grupo tiol de la homocisteína es el nucleófilo que reemplaza al grupo hidroxilo del primer sustrato, serina a través de un mecanismo donde participa el PLP (62). En la CBS humana, el grupo hemo domina el espectro de absorción de la enzima y por tanto interfiere en la detección de los intermediarios unidos al PLP, dificultando el estudio de la cinética pre-estacionaria mediante absorbancia o fluorescencia. Por tanto, la cinética e intermediarios de la reacción han sido inicialmente caracterizados en la CBS de levaduras, que carece del dominio N-terminal de unión al hemo y presenta un dominio catalítico similar donde se encuentra el sitio activo, por lo que se asume para la CBS de mamíferos un mecanismo de reacción análogo (Figura 7) (63, 64).

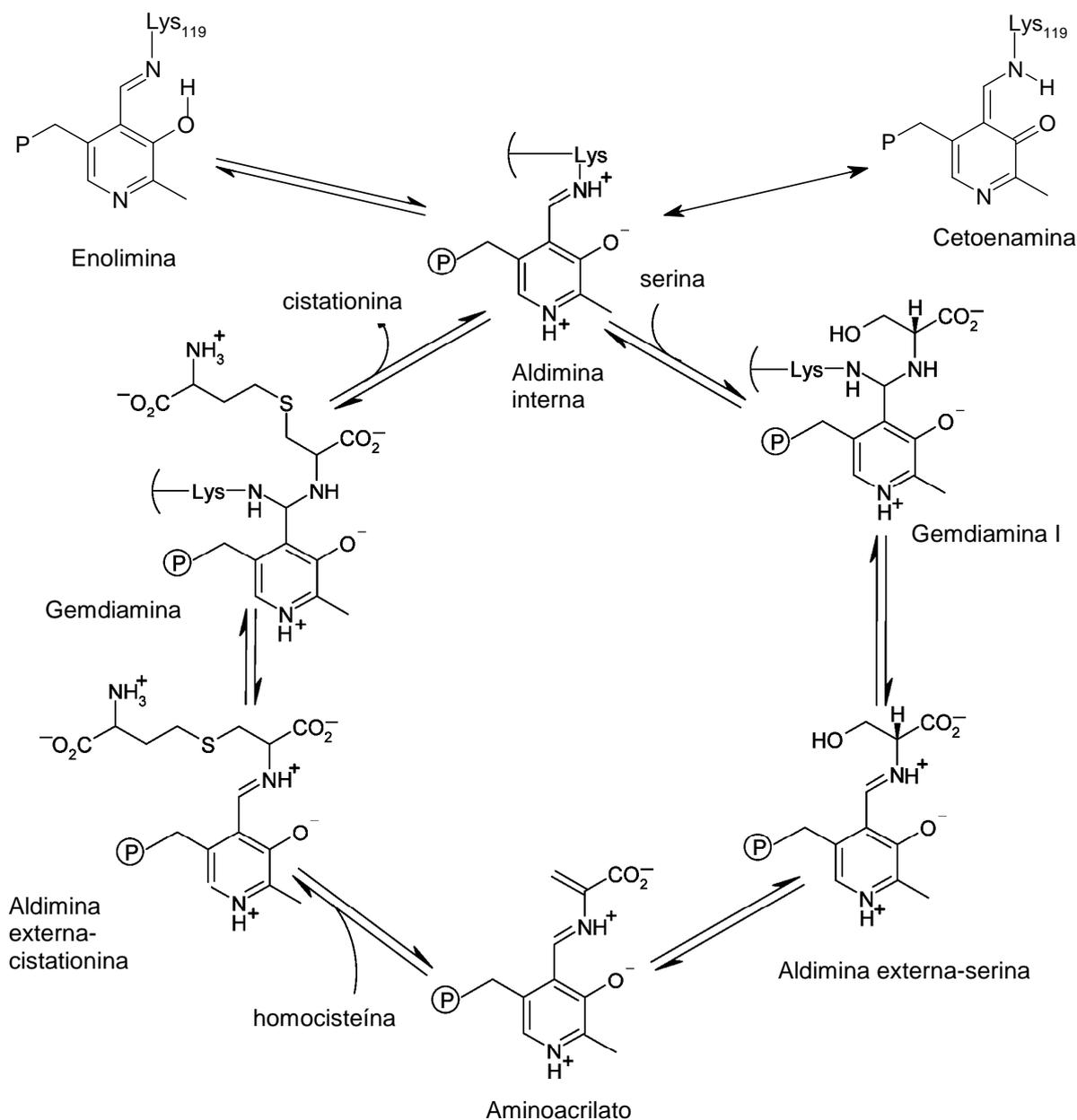


Figura 7. Esquema del ciclo catalítico. Se indican los intermediarios identificados en el mecanismo de la reacción catalizada por la CBS. La aldimina interna representa la enzima unida al PLP y la aldimina externa representa la enzima unida a la serina o a la cistationina. Figura modificada de (65).

En la CBS, el grupo carbonilo (C=O) del PLP se encuentra formando una aldimina interna con el grupo amino (NH₂) de un residuo de lisina (Lys119) situada en el sitio activo. La forma protonada de la aldimina interna (ketoenamina) convierte a la imina en más reactiva hacia el ataque nucleofílico, mientras que la conversión a su forma tautomérica enolimina disminuye su reactividad. Durante la catálisis, cuando el sustrato serina llega al sitio activo, su grupo amino sustituye al grupo amino de la lisina en la aldimina interna que está formando con el PLP, liberando una molécula de agua y formando una aldimina externa, la cual se transforma en un intermediario aminoacrilato. El ciclo catalítico culmina cuando el tiol de la homocisteína ataca el átomo de carbono β del aminoacrilato, liberando cistationina como producto de la reacción y regenerando la aldimina interna original entre el PLP y la enzima. Los parámetros cinéticos determinados en el estado estacionario tanto para la CBS de cadena completa como para la variante trunca dimérica son similares y curiosamente ambos exhiben un elevado valor de K_M para la homocisteína, en el rango milimolar (48), mientras que la concentración intracelular de este metabolito se encuentra en el rango micromolar bajo. Esto sugiere que la actividad de la CBS a nivel celular es muy sensible a un incremento en la concentración de homocisteína. La CBS puede catalizar reacciones secundarias de β-sustitución, en las que da lugar a la formación de sulfuro de hidrógeno, por ejemplo cuando utiliza como sustratos homocisteína y cisteína en lugar de serina. Sin embargo, de acuerdo a los parámetros cinéticos reportados, el valor de K_M para la cisteína es 3 a 4 veces mayor que para la serina (6.11 vs. 1.74 mM, respectivamente), y la relación k_{cat}/K_M para la cisteína es 8 veces menor que para la serina. A su vez la concentración intracelular de serina, cisteína y homocisteína es de 560, 100 y 10 μM, respectivamente, por lo que en condiciones fisiológicas, la CBS utiliza serina como sustrato preferente (66).

Tabla 1. Comparación de las propiedades cinéticas y estructurales de las variantes de CBS humana trunca y de cadena completa.

Parámetro	CBS cadena completa	CBS trunca
Peso molecular (kDa)/monómero	63	45
Estado oligomérico	tetrámero	dímero
Hemo/monómero	1	1
PLP/monómero	1	1
Respuesta a AdoMet	+	–
Actividad específica ^b (–AdoMet) (μmol h ⁻¹ mg ⁻¹)	159	750
Actividad específica (+AdoMet) (μmol h ⁻¹ mg ⁻¹)	295	750
k_{cat} (–AdoMet) ^c	2.8 s ⁻¹	10 s ⁻¹
k_{cat} (+AdoMet)	5.2 s ⁻¹	10 s ⁻¹
K_M (Hcy) (mM)	5 ± 0.9	18 ± 8
K_M (Ser) (mM)	1.7 ± 0.3	9.7 ± 4.3

Los valores de los parámetros cinéticos para ambas variantes de la CBS fueron tomados de (48). ^b La concentración de AdoMet utilizada en los ensayos de actividad específica fue de 380 μM. ^c k_{cat} fue calculada por mol de sitio activo, dado que en particular la variante de cadena completa puede existir como tetrámero u oligómeros superiores. Tabla modificada de (67).

2.2.3. Hemo de la CBS

El hemo en la CBS corresponde al tipo b, protoporfirina IX y tanto en estado férrico como ferroso, se encuentra hexacoordinado, de bajo espín (68). Diversas aproximaciones espectroscópicas como resonancia paramagnética electrónica (EPR), resonancia Raman, así como análisis de rayos X (EXAFS), han permitido asignar la naturaleza de los ligandos, sugiriendo que el hierro del hemo se encuentra coordinado por un átomo de nitrógeno neutro y un ligando tiolato (69, 70). La estructura cristalográfica de la variante trunca dimérica confirmó esta coordinación y reveló la identidad de los ligandos axiales, que corresponden a N_{ε2} de la His65 en la posición distal y Cys52 en la proximal (50, 51) (Figura 8). Por tanto, la CBS pertenece al grupo de las llamadas hemotiolato proteínas como las cloroperoxidasas, óxido nítrico sintasas y las enzimas con citocromo P450. De hecho, la coordinación Cys/His es excepcional y se encuentra en la naturaleza en muy pocas proteínas. Algunos ejemplos son: la SoxAX que participa de la oxidación fotosintética de tiosulfato y sulfuro en bacterias, el factor de receptor nuclear E75 de *Drosophila* (71), un citocromo unido al centro de reacción fotosintética de *R. sulfidophilum* (7) o el factor de regulación eucariota de iniciación (HRI) (72).

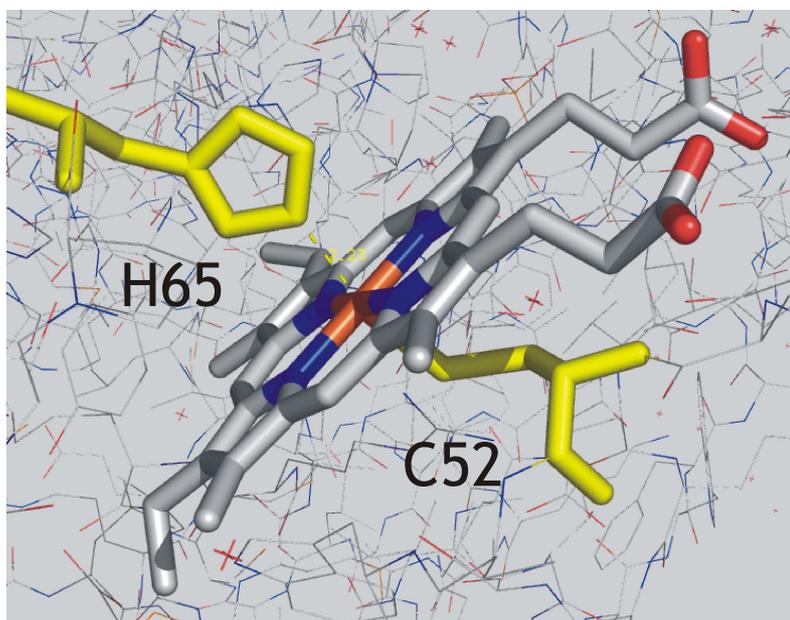


Figura 8. Hemo de la CBS. Se muestra que el hierro del hemo de la CBS está coordinado en la sexta posición a una histidina (H65) y en la quinta posición a una cisteína (Cys52). La información estructural se obtuvo de PubMed (código de acceso 1JBQ) (50) y se visualizó con el programa PyMOL Molecular Graphics Systems v0.99 (61).

De acuerdo a estudios espectrales, la CBS oxidada exhibe un máximo de absorbancia a 428 nm correspondiente a la banda de Soret y otra banda $\alpha\beta$ centrada a ~550 nm, típica del hemo hexacoordinado bajo espín. Luego de la reducción química, el máximo presenta un corrimiento hacia el rojo, con un nuevo máximo de absorción a 449 nm que indica la retención del ligando tiolato (68). Inicialmente se pensó que el hemo era similar al de las enzimas con citocromo P450, de hecho, cuando la CBS fue originariamente aislada de hígado de rata y su función aún era desconocida, fue denominada H450 por el corrimiento en la absorbancia al reducirse. Sin embargo, a diferencia de las enzimas con P450, el pico a 449 nm en la CBS se observa en ausencia de CO (73-75).

Reactividad del hemo con moléculas exógenas

El hemo de la CBS en el estado férrico es muy estable, dado que es relativamente inerte en el intercambio de sus ligandos con moléculas exógenas, no mostrando afinidad por los ligandos férricos más comunes para hemoproteínas reportados como azida, cianuro o fluoruro (76). Se le ha encontrado reactividad solamente frente al cloruro de mercurio, que se liga al tiolato, y frente al peroxinitrito, que a concentraciones relativamente altas inactivan la enzima (77, 78). Sin embargo, en el estado ferroso, el hemo es más reactivo, quizás debido a la debilidad de los enlaces His-Fe-Cys a causa de una disminución en la carga neta al reducirse de Fe^{+3} a Fe^{+2} . En el estado reducido, se puede unir al óxido nítrico (NO) o a ligandos centrados en el carbono, por ejemplo monóxido de carbono (CO), cianuro e isonitrilos.

Monóxido de carbono y óxido nítrico

En el estado reducido, el hemo puede unir ambas moléculas gaseosas CO y NO , aunque con diferencias en su afinidad (Figura 9) (76, 79). La unión de CO genera un desplazamiento del ligando endógeno Cys52 y forma un complejo hexacoordinado, de bajo espín, caracterizado por un máximo de Soret corrido hacia el azul desde 449 nm a \sim 420 nm, con un punto isosbético en 434 nm. Mediante titulación del hemo reducido con CO, se han determinado las constantes de disociación, K_d con valores de 1.5 y 68 μM para la CBS de cadena completa (76), similares a los reportados para la CBS trunca dimérica (3.9 y 50 μM , respectivamente) (80), revelando sitios de unión no equivalentes y sugiriendo anticooperatividad dado que la unión del CO a una subunidad reduciría la afinidad de unión a la segunda subunidad. Esta unión resulta en una inhibición de la actividad enzimática, con una K_i de 5.6 μM (76). El CO se encuentra en un rango de concentraciones fisiológicas de 3-30 μM (81, 82), bajo el control de la hemooxigenasa, enzima responsable de su formación durante el catabolismo de grupos hemo en diferentes tejidos. Por tanto, dado que la afinidad del CO por el hemo se encuentra en este rango de concentración fisiológica, resulta relevante el hecho que, de existir el hemo de la CBS en estado reducido *in vivo*, podría tener un rol regulatorio a modo de sensor del CO endógeno.

La unión del óxido nítrico al hemo reducido de la CBS, conduce al desplazamiento de ambos ligandos endógenos, generando una especie pentacoordinada (Figura 9). Como resultado de la unión del NO , el hemo se convierte del estado diamagnético, bajo espín, al paramagnético, lo cual se evidencia en el espectro de EPR con la aparición del característico patrón de tres líneas de división hiperfina. En estos estudios se determinó que el valor de la separación hiperfina (16.6 gauss) se encuentra en el rango reportado para otras especies pentacoordinadas, confirmando el desplazamiento de los ligandos endógenos (79). A diferencia del CO, el óxido nítrico presenta una menor afinidad de unión al hemo, con una constante de disociación K_d de 281 μM , lo cual implica una menor relevancia fisiológica. La unión del óxido nítrico está también acompañada de una inhibición de la actividad ($K_i \sim$ 320 μM) (79).

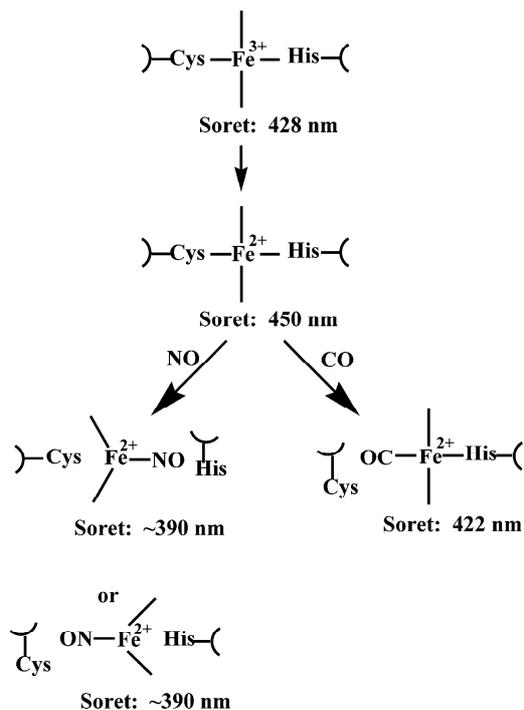


Figura 9. Esquema de la unión de ligandos al Fe del hemo de la CBS. Cambios en los estados de coordinación y los máximos de Soret luego de la unión de CO y *NO. Figura modificada de (83).

Isonitrilos y cianuro

El hemo reducido de la CBS puede también unir isonitrilos (RNC) con diferentes sustituyentes alifáticos (ter-butylNC, bencilNC, ciclohexilNC), presumiblemente vía el desplazamiento del ligando tiolato, dando lugar a la formación de complejos caracterizados por un máximo de Soret de 433 nm (84). La velocidad de formación del complejo hemo ferroso-isonitrilo es relativamente lenta en comparación con otras hemoproteínas como la hemoglobina y depende de la naturaleza del grupo sustituyente. En este sentido, se ha determinado que los derivados aromáticos de los isonitrilos aumentan la velocidad de unión al hemo reducido. Una vez formado, el complejo con el isonitrilo puede ser reoxidado al ser expuesto al aire o en tratamiento con ferricianuro de potasio, recuperando la forma férrica. El cianuro (CN⁻) también puede unirse al hemo reducido de la CBS, exhibiendo un corrimiento en el máximo de Soret de 449 nm a 435 nm. La unión del cianuro presenta valores de constantes de disociación K_d de 3.3 y 54 mM, respectivamente y genera una inhibición en la actividad enzimática con una $K_i \sim 2.3$ mM (76).

Sulfuro de hidrógeno

Como fue mencionado, la CBS puede catalizar en una reacción secundaria la formación de sulfuro de hidrógeno, molécula gaseosa de creciente interés con numerosos roles fisiológicos, como acciones vasorelajadoras y neuromodulatorias. Dado que el sulfuro puede interactuar con diferentes hemoproteínas (algunos ejemplos biológicos de esta interacción incluyen la formación de sulfcatalasa, sulfhemoglobina y sulfmioglobina (85)), una hipótesis atractiva postulaba que el hemo fuera capaz de sensar el sulfuro y de alguna forma afectar el desempeño catalítico de la CBS, constituyendo un mecanismo de autorregulación. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio por Ernesto Cuevasanta en el marco de su tesina de grado, indicaron que la exposición de la CBS hasta concentraciones del orden milimolar de sulfuro, no llevó a cambios en el espectro UV-Vis de la enzima en el estado oxidado ni en el reducido. Tampoco se verificó un

efecto significativo en la actividad enzimática, lo que descarta un posible rol regulador del sulfuro en la CBS (86).

Rol del hemo en la regulación de la CBS

La función que cumple el hemo en la CBS aún permanece desconocida. Está establecido que no participa del proceso catalítico, función que depende del PLP. De hecho, la CBS de levaduras carece de hemo pero igual presenta actividad enzimática (52, 87). Sin embargo, a pesar de estar alejado del sitio activo (~ 20Å) y de no intervenir directamente en el ciclo catalítico, se ha determinado que modificaciones en el entorno del hemo pueden repercutir en la actividad. Por ejemplo, en estudios realizados con una variante de CBS a la que se eliminó el extremo N-terminal de unión del hemo (hCBS Δ N69) se observó una disminución en la actividad enzimática (88). A su vez, en pacientes con hiperhomocisteinemia hereditaria se han identificado varias mutaciones en el entorno del hemo (89, 90). Para estudiar este efecto se construyeron mutantes a nivel de los ligandos axiales del hemo (C52S, C52A y H65R). Todos los mutantes presentaron un menor contenido de hemo con respecto a la enzima nativa aunque el nivel de saturación en PLP fue similar y sin embargo la actividad enzimática en todos los casos fue menor, lo cual confirma que los cambios estructurales del hemo son capaces de modular a distancia la actividad enzimática a nivel del PLP (91).

Como fue mencionado, el hemo en el estado férrico es muy estable y sólo ha mostrado ser reactivo frente al cloruro de mercurio que lleva a la pérdida del ligando tiolato, o por el peroxinitrito. Estudios realizados en nuestro laboratorio por Laura Celano en el marco de su tesis de maestría, determinaron la inactivación de la CBS por el peroxinitrito y sus radicales derivados por un mecanismo que además de la nitración de algunos residuos de Trp y Tyr, implica una alteración a nivel del hemo, estudiado por espectrofotometría UV-Vis y EPR, donde se vió la pérdida del ligando tiolato, con una conversión de bajo a alto espín y “bleaching”, aunque las altas concentraciones de peroxinitrito necesarias para introducir las modificaciones ponen en duda la relevancia *in vivo* (77). En el estado reducido, el hemo puede unir diferentes ligandos exógenos como CO o el ^1NO , que generan una inhibición en la actividad enzimática, proporcionando una evidencia adicional sobre la comunicación entre el hemo y el sitio activo.

Para explicar el hecho que cambios a nivel del hemo inactiven la enzima, se ha sugerido un posible mecanismo de regulación alostérica que implica una comunicación entre el hemo y el PLP, vía una alfa hélice que los conecta (80). En un extremo de la hélice reside la Arg266 que establece un puente de hidrógeno con el ligando cisteinato, mientras que el otro extremo contiene dos residuos de treonina, Thr257 y Thr260 conectadas al grupo fosfato del PLP vía enlaces de hidrógeno (Figura 10). Por tanto, la perturbación o pérdida del ligando tiolato puede ser transmitido al PLP y repercutir directamente inactivando la enzima. Reforzando esta teoría, recientemente se sugirió que la pérdida de actividad por la unión del CO al hemo reducido, surge como consecuencia de la perturbación en la conexión Cys52/Arg266, generando el desplazamiento del PLP y un cambio en su forma tautomérica de la forma cetoenamina a enolimina que, como consecuencia finalmente inhibe el ciclo catalítico (65). Un dato interesante es que se han encontrado mutaciones en los residuos Arg266 y Thr257 en pacientes con hiperhomocisteinemia hereditaria (92).

Inicialmente se había propuesto que el hemo podría tener un rol de sensor redox, dado que la actividad de la enzima disminuía en un 50 % en presencia de reductores (68). La hipótesis del posible rol del hemo como sensor redox de la CBS, es particularmente atractiva puesto que se podrían interpretar los cambios sufridos en la actividad de la enzima de forma que, en un medio oxidante, se favorecería la activación de la CBS, aumentando el flujo de homocisteína a través de la vía de la transulfuración en detrimento de la transmetilación, resultando en un incremento en la síntesis de glutatión como forma de protección a nivel celular. En este sentido se vió que la exposición de una línea celular

de hepatoma a peróxido de hidrógeno, favoreció la formación de cistationina y glutatión (9). Sin embargo, recientemente fue demostrado que la actividad de la enzima reducida es de hecho similar a la de la forma oxidada y que la disminución reportada de la actividad se asocia con una lenta conversión de la especie reducida (449 nm) a una especie inactiva que absorbe a 424 nm (93). La formación de esta especie 424 en la que se produce un cambio de ligando por otro neutro, está además favorecida cuando la CBS reducida se incuba en condiciones no fisiológicas de pH alcalino y elevadas temperaturas (~ pH 9.0, 40 °C) (94). Recientemente se determinó que el estado reducido de la CBS estaría estabilizado por la interacción Cys52/Arg266, y en ausencia de esta interacción, por ejemplo en la mutación Arg266Met, hay una conversión del hemo reducido a la forma 424, con pérdida de la actividad (95).

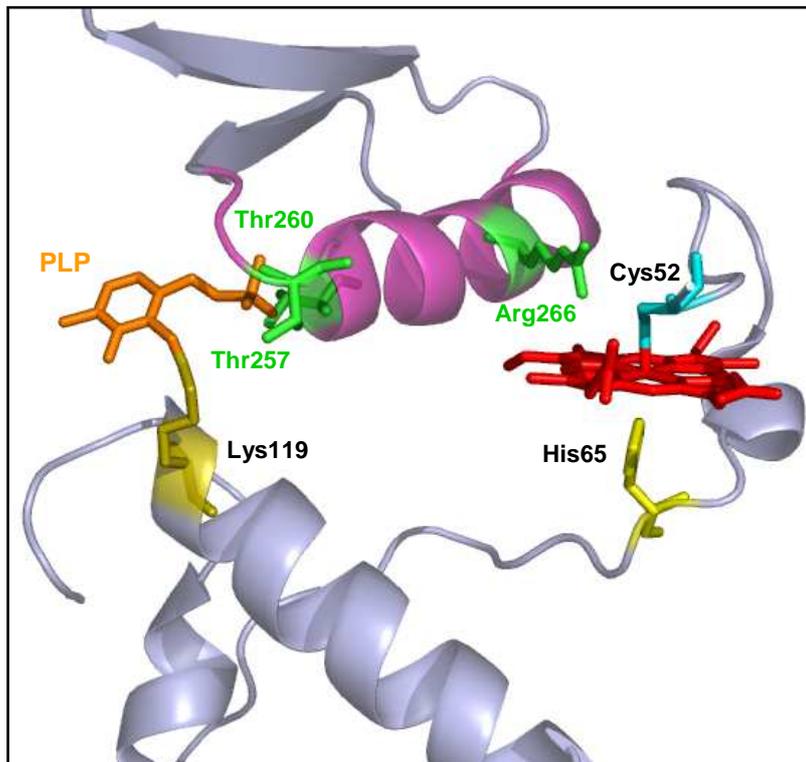


Figura 10. Mecanismo propuesto de regulación alostérica. Hemo de la CBS. El ligando del hemo, Cys52, establece un puente de hidrógeno con Arg266 que reside en un extremo de la α -hélice (violeta), mientras que en el otro extremo contiene Thr257 y Thr260 que interactúan con el grupo fosfato del cofactor PLP.

Por tanto, la función del hemo podría ser consistente con un rol regulador capaz de modular la actividad enzimática en forma alostérica, inducida por cambios en el entorno de coordinación del hemo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la propuesta del rol sensor implica que el hemo pueda ser reducido *in vivo*, ya que en el estado férrico es muy estable y resistente a las modificaciones. En este sentido, al comenzar esta tesis, se desconocían aspectos claves, tales como el valor del potencial de reducción, su estado redox *in vivo*, si se encuentra asociado a algún sistema reductor a nivel celular y en ese caso cuál es su identidad y cómo se establece la interacción con el hemo.

2.3. Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S)¹ es una molécula gaseosa generada endógenamente que se encuentra ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos. Junto con el óxido nítrico y el monóxido de carbono, el sulfuro integra el grupo de los denominados gasotransmisores dado que presenta un rol relevante en la señalización, modulando importantes funciones fisiológicas a nivel de los sistemas cardiovascular y nervioso.

2.3.1. Propiedades fisicoquímicas

El sulfuro de hidrógeno es un gas incoloro con un olor característico. Es el compuesto hidrogenado del azufre en el menor estado de oxidación estable. Presenta una estructura similar a la del agua, pero dado que el azufre tiene valores de electronegatividad menores que los del oxígeno (2.5 contra 3.5, de acuerdo a la escala Pauling), el sulfuro de hidrógeno es menos polar que el agua. El momento dipolar del H_2S es de 0.97 D, mientras que el del agua es de 1.85 D. Comparado con el agua, esta diferencia repercute en la incapacidad de formar puentes de hidrógeno, lo cual en situación normal le hace adoptar el estado de agregación gaseoso. El sulfuro de hidrógeno es un ácido débil con un $\text{p}K_{\text{a}1}$ de 7.0 y un $\text{p}K_{\text{a}2} \sim 17$ (96), por lo que en condiciones fisiológicas, a pH 7.4 predominará la especie monoaniónica (HS^-) en un 71.5 %, mientras el 28.5 % restante estará en la forma protonada (H_2S). A lo largo del texto emplearemos el término sulfuro de hidrógeno para referirnos genéricamente a la suma de ambas especies en solución acuosa a pH fisiológico, dado que en estas condiciones la concentración de la especie dianiónica (S^{2-}) se considera insignificante.

En cuanto a su detección, se han descrito numerosas técnicas que incluyen métodos espectrofotométricos, en los que el sulfuro puede ser monitoreado por la formación de sulfuro de plomo o azul de metileno a 390 o 670 nm, respectivamente; métodos fluorimétricos, utilizando acetato mercúrico de fluoresceína; métodos polarográficos con electrodos específicos para el sulfuro, así como por cromatografía líquida o gaseosa (66, 97, 98).

2.3.2. Síntesis y catabolismo del sulfuro de hidrógeno

En mamíferos, el sulfuro de hidrógeno se forma a partir de reacciones inespecíficas de desulfuración de la cisteína. Estas reacciones son catalizadas principalmente por dos enzimas PLP-dependientes de la vía de la transulfuración: la CBS y la CGL. Una tercer enzima que participa en la síntesis de sulfuro de hidrógeno, es la mercaptopiruvato sulfurotransferasa, que utiliza como sustrato mercaptopiruvato y transfiere o libera el sulfuro (99, 100). El sulfuro de hidrógeno también puede ser obtenido de forma no enzimática a partir de polisulfuros orgánicos encontrados en el ajo (101), así como de la flora bacteriana intestinal.

De los mecanismos mencionados, las principales vías de formación de sulfuro son aquellas que utilizan CBS y CGL. Sin embargo, como consecuencia de la relativa inespecificidad de estas enzimas por los sustratos, junto a su versatilidad en el mecanismo catalítico, el sulfuro de hidrógeno puede ser generado por una multiplicidad de reacciones (Figuras 11 y 12). La CBS cataliza la formación de sulfuro de hidrógeno cuando utiliza como sustratos homocisteína y cisteína, a diferencia de la reacción catalizada en la vía de la transulfuración en la que utiliza serina (reacciones a y b, Figura 11). Alternativamente, aunque en forma menos significativa, la CBS puede dar cuenta de la

¹ De acuerdo a IUPAC, los nombres recomendados para el sulfuro de hidrógeno protonado son sulfuro de dihidrógeno, sulfano y dihidrógeno(sulfuro).

formación de sulfuro, catalizando la condensación de dos cisteínas por un mecanismo de β -sustitución generando lantionina, o mediante la β -eliminación de la cisteína con la subsecuente rehidratación del aminoacrilato para formar serina (reacciones c y d, Figura 11) (102). La CGL puede formar sulfuro de hidrógeno por numerosos mecanismos que incluyen reacciones dependientes de cisteína en el átomo de carbono β (reacciones b y c, Figura 12) y reacciones dependientes de homocisteína en γ (reacciones d y e, Figura 12). Se ha propuesto una ruta alternativa catalizada por la CGL que involucra la escisión en β de la cistina, formando piruvato, amonio y el intermediario tiocisteína, que en presencia de otro tiol, se descompone en forma no enzimática dando sulfuro de hidrógeno, aunque dada la baja concentración intracelular de cistina, su contribución para la generación de sulfuro no sería relevante (100). Estudios de simulación de las reacciones catalizadas por la CGL, efectuados con concentraciones fisiológicas de cisteína y homocisteína, revelaron que la reacción de escisión en α,β de cisteína da cuenta del $\sim 70\%$ del sulfuro de hidrógeno generado (reacción b, Figura 12). Un dato interesante es que las vías que utilizan homocisteína en reacciones catalizadas por la CGL, incrementan progresivamente su incidencia en la generación de sulfuro a medida que aumenta el grado de hiperhomocisteinemia. En este sentido las simulaciones dan cuenta que en condiciones de incrementos severos en la concentración de homocisteína, las vías con mayor peso en la generación de sulfuro resultaron ser las reacciones de escisión en α,γ o de γ -sustitución de la homocisteína (reacciones d y e, Figura 12) (103).

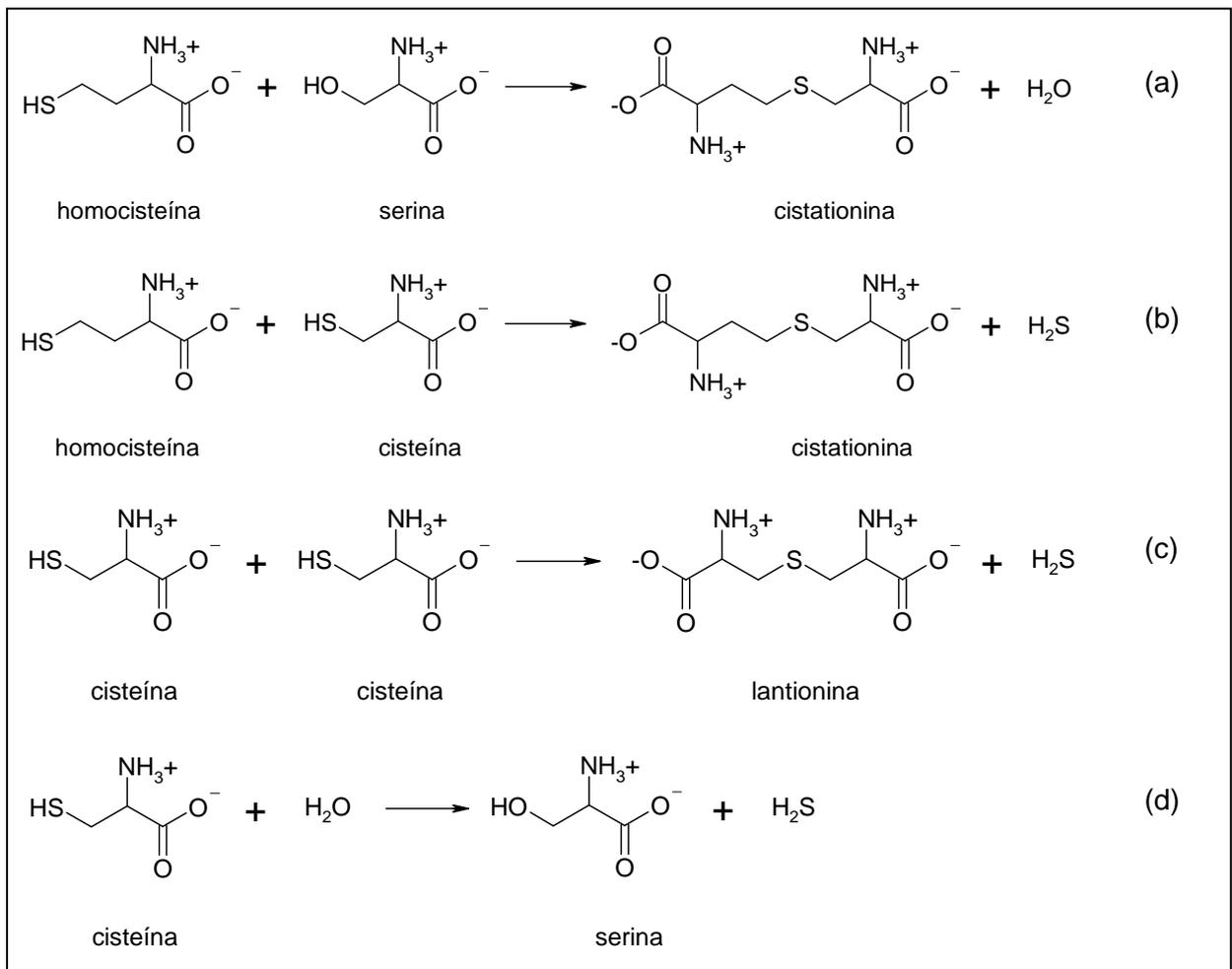


Figura 11. Reacciones catalizadas por la CBS que conducen a la formación de sulfuro de hidrógeno. Adaptado de (102).

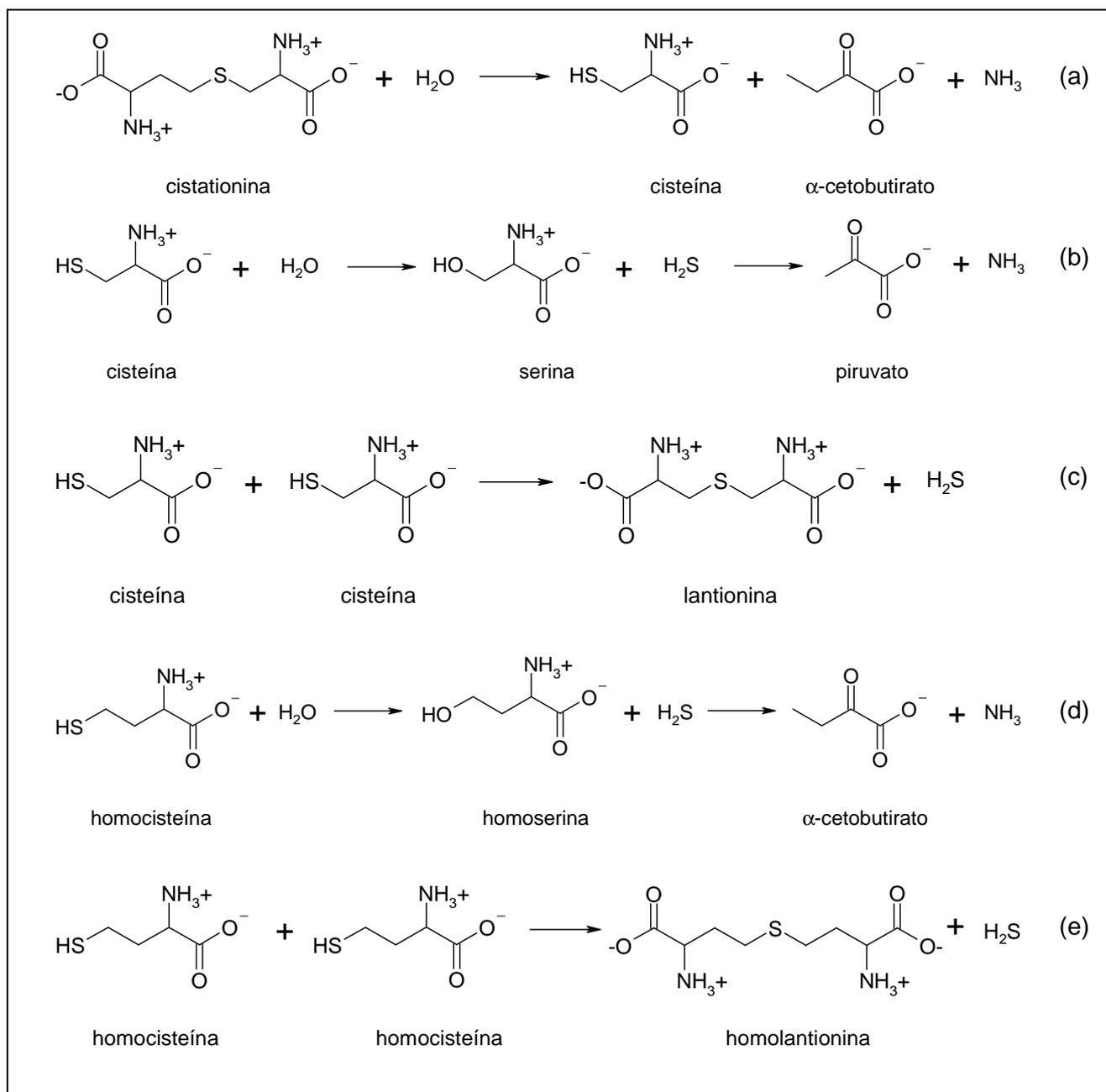


Figura 12. Reacciones catalizadas por la CGL que conducen a la formación de sulfuro de hidrógeno. Adaptado de (103).

El sulfuro de hidrógeno puede además ser generado por la mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST), enzima que utiliza como sustrato el mercaptopiruvato, formado como producto de la reacción de la transaminación de cisteína con α -cetoglutarato, catalizada por la cisteína aminotransferasa (100, 104). La MST pertenece a la familia de sulfurotransferasas, dado que cataliza la transferencia del azufre sulfano a partir de un persulfuro o tiosulfato (en la subfamilia rodanesa) o del mercaptopiruvato (en subfamilia MST) a un aceptor (105). Por tanto, la reacción de transferencia del azufre forma persulfuro y no sulfuro de hidrógeno. La liberación del sulfuro del mercaptopiruvato catalizado por la MST, se da como resultado de una reacción no catalizada enzimáticamente con un grupo tiol como aceptor, aunque se desconoce su identidad. En

experimentos *in vitro* se ha determinado la liberación del sulfuro en presencia de ditiotreititol (99).

En cuanto al catabolismo del sulfuro de hidrógeno, ensayos realizados con sulfuro marcado radiactivamente [³⁵S] demostraron su rápida metabolización por diferentes tejidos (106). En estudios recientes se ha visto que a pesar que la concentración del sulfuro libre en plasma es muy baja, el sulfuro que se administra de forma exógena en sangre desaparece rápidamente, lo cual sugiere la presencia de reacciones que lo consumen (107). La vía principal detectada en diferentes tejidos, es la oxidación del sulfuro a tiosulfato y sulfato, que se excreta en la orina. En este sentido, se ha determinado que el epitelio intestinal expresa un sistema especializado de enzimas que metaboliza el sulfuro a tiosulfato y sulfato para prevenir su entrada a la circulación de cantidades excesivas (108). El mecanismo de oxidación es aún objeto de estudio pero se ha propuesto que el primer paso estaría catalizado por la sulfuro quinona oxidorreductasa, una flavoproteína localizada en la membrana mitocondrial, capaz de oxidar el sulfuro a persulfuro unido a la proteína. Luego la enzima sulfito oxidasa transforma el persulfuro en sulfito, que puede ser oxidado a sulfato por la sulfito oxidasa o alternativamente la rodanasa lo puede convertir en tiosulfato (42).

A nivel extracelular, otro destino del sulfuro que puede dar cuenta de su metabolización es la reacción con disulfuros proteicos o de bajo peso molecular, generando persulfuros. Por otra parte, el sulfuro también puede reaccionar con hemoproteínas y unirse de forma covalente al hemo formando por ejemplo sulfmioglobina y sulfhemoglobina (85), no obstante el sulfuro sólo reacciona con la forma oxidada, con intermediarios de tipo ferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) y no con la forma oxi, que en el caso de la hemoglobina es la mayoritaria en la circulación, por lo que seguramente tenga una incidencia menor respecto a las otras vías del consumo de sulfuro (109, 110).

2.3.3. Roles fisiológicos

La percepción acerca del sulfuro de hidrógeno, clásicamente catalogado como gas tóxico y contaminante ambiental, se ha ido modificando hasta ser actualmente considerado un relevante gasotransmisor e incluso propuesto para ser administrado exógenamente como agente terapéutico (111). A nivel del sistema nervioso central, donde el sulfuro es generado principalmente por la CBS y la mercaptopiruvato sulfurotransferasa, presenta efectos neuromoduladores, potenciando la respuesta mediada por el receptor de N-metil-D-aspartato (112). En el sistema cardiovascular la producción del sulfuro está catalizada principalmente por la CGL, donde cumple un rol de vasorrelajación del músculo liso por un mecanismo independiente de GMPc, que implica la apertura de canales de potasio sensibles a ATP (canales K^+_{ATP}) (113). En este sentido, el rol del sulfuro en el sistema periférico ha sido demostrado recientemente en un modelo de ratón genéticamente modificado deficiente en CGL, con niveles de sulfuro muy reducidos en plasma y otros tejidos, que exhibió una marcada hipertensión y una disminución en la vasorrelajación dependiente del endotelio (114).

En la literatura se le asignan al sulfuro un amplio rango de respuestas biológicas, desde citotóxicas a efectos citoprotectores. A elevadas concentraciones, el mecanismo por el cual el sulfuro ejerce efectos tóxicos parece ser debido a la inhibición de la respiración celular, dado que actúa como un inhibidor potente y reversible de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial (115). En este sentido, un aspecto llamativo es que el sulfuro indujo un estado de pseudohibernación en ratones con el consecuente enlentecimiento general del metabolismo y disminución de la temperatura corporal (116). En cambio, a concentraciones bajas, en el orden de micromolar, la evidencia reciente indica que el sulfuro de hidrógeno además de actuar como neuromodulador y mediador de la homeostasis cardiovascular, puede también ejercer acciones citoprotectoras (117, 118). Por ejemplo, en un modelo *in vivo* de infarto al miocardio agudo en ratones inducido

por isquemia-reperfusión, el sulfuro limitó el daño disminuyendo la inflamación y preservando la función mitocondrial (119). Entre los efectos benéficos se ha sugerido que el sulfuro podría tener un rol antioxidante, protegiendo los sistemas neuronal y cardiovascular del daño oxidativo (117, 120-122). Sin embargo, aunque algunos estudios han propuesto para el sulfuro un rol como atrapador de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en sistemas biológicos (123-125), restan aún por ser caracterizadas las constantes cinéticas y mecanismos de reacción.

2.4. Especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno

2.4.1. Radical anión superóxido

El superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es un radical libre derivado de la reducción monovalente del oxígeno molecular (126). En los sistemas biológicos, el superóxido se puede formar por la acción de diferentes flavoenzimas como la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, las enzimas citocromo P450 e incluso la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) desacoplada. Algunas moléculas pequeñas como la adrenalina, noradrenalina, $FADH_2$ o $FMNH_2$ pueden autooxidarse en presencia de oxígeno dando lugar a la formación de superóxido. Sin embargo, durante el metabolismo celular normal, la mayor fuente de producción de superóxido *in vivo* la constituye la cadena respiratoria mitocondrial, principalmente en dos sitios: a nivel de la NADH: ubiquinona oxido reductasa (complejo I de la cadena respiratoria) y a partir de quinonas parcialmente reducidas, como el radical ubisemiquinona del complejo III de la cadena respiratoria.

El superóxido tiene un $pK_a \sim 4.8$ por lo que a pH fisiológico la abundancia de la especie protonada (HO_2^{\cdot}) es mínima y se encuentra principalmente en forma aniónica. Tiene una vida media corta dado que puede reaccionar con algunas biomoléculas y además dismuta a peróxido de hidrógeno y oxígeno (reacción 2). Esta reacción ocurre espontáneamente ($k = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4) (127) o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), que aumenta la velocidad de dismutación en varios órdenes de magnitud ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4) (128) y juega un rol central en la protección frente al superóxido.



En los sistemas biológicos el superóxido puede actuar como agente reductor u oxidante, con potenciales de reducción de $E^\circ(O_2/O_2^{\cdot-}) = -0.160 \text{ V}$ (1 M O_2 estado estándar) (129) y ($E^\circ(O_2^{\cdot-}, 2H^+/H_2O_2) = +0.940 \text{ V}$) (130), respectivamente. Es capaz de reducir complejos férricos y cúpricos generalmente presentes como cofactores de proteínas (131). Por otro lado puede oxidar moléculas como polifenoles, tocoferoles, catecolaminas, tioles, ascorbato y centros hierro-azufre, llevando a la inactivación de enzimas que poseen estos grupos prostéticos como la aconitasa o la succinato deshidrogenasa (132). A pesar de la naturaleza radicalar del superóxido y de ser una especie lo suficientemente reactiva como para producir daños a nivel celular, la fuerza como oxidante se ve disminuida dado que su carácter aniónico limita la capacidad de difundir libremente a través de las membranas biológicas y necesita de un canal aniónico para atravesarlas, por lo que sus acciones se restringen al sitio de generación (133). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las reacciones de oxidación a causa de un aumento en la formación de superóxido pueden ser mediadas por especies formadas a partir del superóxido y que presentan un mayor potencial oxidativo, como el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo o como veremos más adelante el peroxinitrito, oxidante fuerte generado por la reacción con el óxido nítrico.

2.4.2. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se forma como producto de la reducción monovalente del superóxido o mediante la reducción divalente del oxígeno. La principal fuente de peróxido de hidrógeno la constituye la dismutación del superóxido catalizada enzimáticamente, aunque también puede ser generado mediante la reducción por dos electrones del oxígeno en reacciones catalizadas por oxidasas tales como la xantino oxidasa, glucosa oxidasa, aminoácido oxidasas, urato oxidasa, entre otras (134, 135).

Dado que el peróxido de hidrógeno ($pK_a \sim 10.8$) no tiene carga a pH neutro, atraviesa fácilmente las membranas biológicas. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre y es generalmente poco reactivo dado que es un agente reductor débil ($E^\circ(O_2^{\cdot-}, 2H^+/H_2O_2) = +0.940 \text{ V}$) (130) y un agente oxidante débil ($E^\circ(H_2O_2, H^+/H_2O, HO^\cdot) = +0.320 \text{ V}$) (136). Sin embargo es capaz de oxidar directamente un gran número de moléculas, inactivando ciertas enzimas que cuentan por ejemplo con grupos tiol o residuos de metionina presentes en el sitio activo. Además, la toxicidad del peróxido de hidrógeno proviene de su capacidad para reaccionar con metales de transición reducidos, como Fe(II) o Cu(I), conduciendo en la reacción de Fenton, a la formación del radical hidroxilo (HO^\cdot), la especie parcialmente reducida del oxígeno de mayor reactividad (137) (reacción 3).



Las principales enzimas encargadas de la metabolización del peróxido de hidrógeno son la catalasa, presente en los peroxisomas de casi todos los tipos celulares, que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (reacción 4); y las peroxidasas localizadas en el compartimento citosólico y en la matriz mitocondrial, como las peroxirredoxinas, que utilizan tiorredoxina (Trx) a expensas de tiorredoxina reductasa y NADPH (138, 139), o la glutatión peroxidasa, que detoxifica el peróxido de hidrógeno acoplando su reducción a agua con la oxidación del glutatión (GSH) (reacción 5) (140).



2.4.3. Radical hidroxilo

El radical hidroxilo se genera en sistemas biológicos a partir de la reducción por un electrón del peróxido de hidrógeno, en un proceso que requiere la participación de metales de transición que intervienen en la reacción de Fenton (reacción 3) (137). En condiciones fisiológicas los niveles de hierro libres son extremadamente bajos debido a su secuestro por proteínas como la ferritina y la transferrina, evitando la participación del metal en la generación del radical hidroxilo. Sin embargo, en condiciones en las que aumentan los niveles de superóxido o de peróxido de hidrógeno, estos afectan el metabolismo del hierro, por ejemplo el peróxido de hidrógeno es capaz de degradar ciertas hemoproteínas como hemoglobina, mioglobina o citocromo c determinando la liberación de hierro, lo que contribuye a la reacción antes mencionada.

Otras fuentes de radical hidroxilo incluyen la fisión homolítica del peróxido de hidrógeno por acción de la radiación UV, así como la radiación ionizante. Además se ha determinado la formación de este radical como producto de la descomposición de peroxinitrito.

De acuerdo a su potencial de reducción ($E^\circ(\cdot OH/OH^-) = + 2.31 \text{ V}$) (136), el radical hidroxilo presenta una elevada reactividad química y gran poder oxidante, reaccionando

con biomoléculas generalmente a velocidades controladas por difusión, teniendo como blanco azúcares, aminoácidos, lípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos, entre otros. El radical hidroxilo experimenta fundamentalmente reacciones de abstracción de un electrón o un átomo de hidrógeno y adición. En todos estos casos se generan nuevos radicales y especies que, aunque menos reactivas respecto al radical hidroxilo, pueden sin embargo generar más radicales determinando que se produzcan reacciones en cadena y propagando el daño a nivel celular (141).

2.4.4. Ácido hipocloroso y cloraminas

Los neutrófilos activados, en presencia de microorganismos invasores, liberan la enzima mieloperoxidasa (MPO) durante el proceso de desgranulación, encargada de catalizar la formación de hipoclorito² a partir de cloruro y peróxido de hidrógeno (reacción 6) (142). La MPO es una hemoproteína que también se encuentra presente en monocitos y hay evidencia de su expresión *in vivo* en la microglía y en macrófagos (143).



El hipoclorito es un ácido débil con un pK_a de 7.5, por lo que a pH fisiológico se encuentra ionizado en un 50 % (144). Es un poderoso oxidante por dos electrones ($E^\circ(2\text{HOCl}, 2\text{H}^+/2\text{H}_2\text{O}, \text{Cl}_2) = +1.63 \text{ V}$, $E^\circ(\text{OCl}^-, \text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-, 2\text{OH}^-) = +0.89 \text{ V}$) que participa en reacciones de oxidación y cloración de varios blancos biológicos (145-147). Los grupos tiol, el tioéter de la metionina y el ácido ascórbico son los blancos preferentes ($k \approx 10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) del hipoclorito *in vivo*, seguidos por los grupos amino ($k \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (148). En este sentido, el hipoclorito reacciona rápidamente con el glutatión reducido ($k \geq 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (145), lo que representa un importante mecanismo de defensa a nivel celular frente a la toxicidad de este oxidante. Las cloraciones biológicas más relevantes incluyen grupos amino de proteínas y moléculas pequeñas dando lugar a la formación de N-cloraminas (reacción 7), que presentan reactividad y especificidad oxidante propias frente a diversas biomoléculas siendo menos reactivas que el hipoclorito (149).

2.4.5. Óxido nítrico

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO) es un radical libre que juega un papel clave como mediador de varias funciones fisiológicas tales como la señalización celular, actuando como vasodilatador en el sistema vascular y como neurotransmisor en el sistema nervioso, y es también un agente citotóxico formado por las células del sistema inmune (150, 151). El óxido nítrico es sintetizado por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) que catalizan la N-oxigenación, seguida del clivaje oxidativo de la porción guanidino del aminoácido arginina, produciendo citrulina y óxido nítrico. Las NOS utilizan como sustratos arginina, oxígeno y NADPH y requieren como cofactores al FAD, FMN, tetrahidrobiopterina (BH_4), hierro protoporfirina IX (hemo) y calmodulina. Estas enzimas son hemoproteínas que poseen además un dominio del tipo citocromo P450 reductasas y su mecanismo de reacción implica la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el hemo donde se encuentra el oxígeno que se adiciona al grupo

² El término hipoclorito se utiliza para referirse a la suma de las especies hipoclorito anión (ClO^-) y su ácido conjugado, el ácido hipocloroso (HOCl).

guanidino, formando como intermediario a la N-hidroxiarginina (152). En mamíferos existen tres isoformas de estas enzimas: nNOS y eNOS son constitutivas y se expresan en neuronas y células endoteliales respectivamente, mientras que la iNOS es inducible y se expresa en respuesta a mediadores proinflamatorios (153). El óxido nítrico es una molécula pequeña e hidrofóbica por lo que una vez sintetizado, es capaz de difundir en medios acuosos y a través de membranas, ejerciendo sus acciones en distintos compartimentos celulares. Su vida media en sistemas biológicos es relativamente corta dado que reacciona muy rápido con centros metálicos o con otros radicales.

Las reacciones de mayor relevancia a nivel fisiológico involucran en primer lugar la formación de complejos reversibles hierro-nitrosilo con el hemo de proteínas. Por ejemplo, la unión del óxido nítrico al hierro ferroso (Fe^{+2}) del hemo de la guanilato ciclasa produce un cambio conformacional que activa a la enzima y genera un aumento en la síntesis de GMP cíclico (GMPc) siendo esta reacción esencial para la activación de las vías de transducción de señales (154, 155). Otra reacción que probablemente sea la mayor responsable de la desaparición de este radical *in vivo* es la reacción rápida e irreversible con la oxihemoglobina y la oximioglobina para producir nitrato. Finalmente, dado su carácter de radical libre, el óxido nítrico reacciona rápidamente con diversos radicales. Por ejemplo las reacciones con radicales lipídicos terminan cadenas de propagación radicalar y originan aductos con potenciales roles de señalización (156, 157). La reacción con radicales proteicos, como el radical tiólo, produce una modificación postraduccional que puede impactar en la actividad. El óxido nítrico reacciona además con el oxígeno, formando especies oxidantes, nitrantes y nitrosantes como el dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), el dióxido de trinitrógeno (N_2O_3) y el tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4).

Por último, el óxido nítrico reacciona rápidamente y de forma irreversible con el radical superóxido formando el peroxinitrito, poderoso agente oxidante y nitrante (158).

2.4.6. Peroxinitrito

La reacción entre los radicales óxido nítrico y superóxido genera el peroxinitrito (reacción 8). La velocidad de esta reacción es muy rápida, cercana a los límites controlados por difusión, con constantes de reacción reportadas en el rango de $0.5 - 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (159-161). Estos valores son de dos a diez veces mayores que el de la reacción del superóxido con la superóxido dismutasa ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). De hecho, el óxido nítrico es capaz de reaccionar lo suficientemente rápido y encontrarse en concentraciones suficientemente altas como para competir con la superóxido dismutasa por el superóxido (162).



A pH fisiológico encontramos tanto al peroxinitrito anión (ONOO^-) como su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso (ONOOH) ($\text{p}K_a \sim 6.8$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$), pero predomina la forma aniónica (80 %) ³. A lo largo del texto emplearemos el término peroxinitrito para referirnos a la suma de ambas especies.

El peroxinitrito es un potente oxidante, que puede conducir a oxidaciones de múltiples blancos biológicos por uno o dos electrones, con potenciales de reducción de $E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2, \text{H}_2\text{O}) = +1.6 - 1.7 \text{ V}$ y $E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2^-, \text{H}_2\text{O}) = +1.3 - 1.37 \text{ V}$, respectivamente (163, 164). En soluciones alcalinas, el peroxinitrito es una molécula

³ De acuerdo a IUPAC, los nombres recomendados para el peroxinitrito anión y su ácido conjugado son oxoperoxonitrato(1-) y oxoperoxonitrato de hidrógeno, respectivamente.

relativamente estable. Sin embargo, se descompone rápidamente a pH neutro o ácido isomerizándose a nitrato. La descomposición del peroxinitrito sigue un decaimiento exponencial con una constante de velocidad de 0.9 s^{-1} a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 7.4, que aumenta al disminuir el pH (163, 165). Al protonarse, el ácido peroxinitroso se homoliza dando origen a la formación de los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) en una caja de solvente. Una fracción de estos radicales puede recombinarse dentro de la caja para dar nitrato, mientras que otra fracción (aproximadamente 30 %) de los radicales puede difundir fuera de la misma y llevar a cabo reacciones de oxidación (Figura 13) (166).

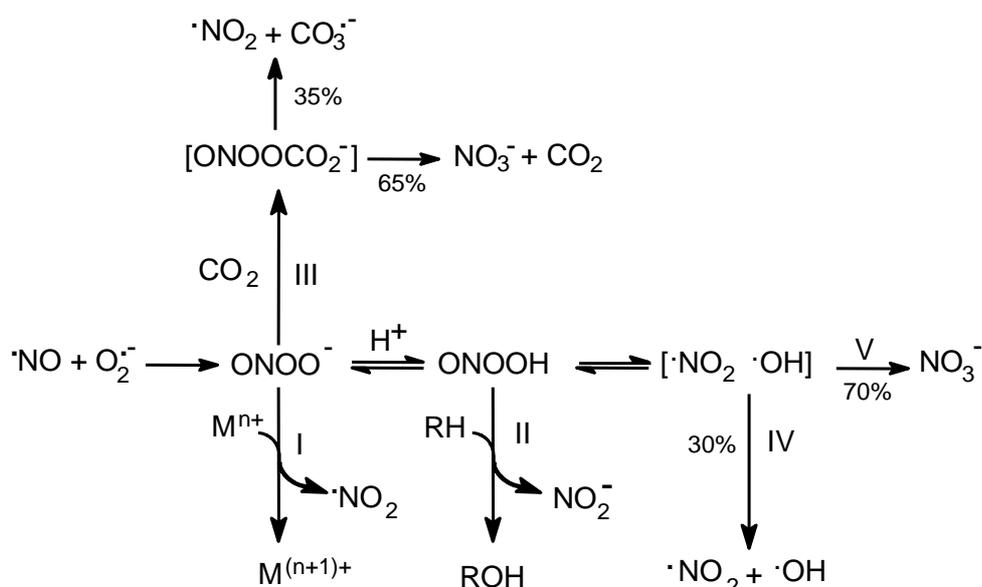


Figura 13. Esquema de la reactividad del peroxinitrito. El peroxinitrito, formado a partir de la reacción entre radical superóxido y dióxido de nitrógeno, puede reaccionar directamente oxidando moléculas blanco (rutas I y II); o puede reaccionar con CO_2 formando el aducto nitrosoperoxicarbonato, que se descompone rápidamente formando radicales con un 35 % de rendimiento. En ausencia de blancos directos, el ácido peroxinitroso evoluciona lentamente rindiendo radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno en un 30 %, capaces de promover reacciones de oxidación/nitración por un electrón (IV), o isomerizar a nitrato (V). Esquema tomado de (109).

Dado que estos radicales secundarios derivados de la homólisis del peroxinitrito poseen su propia reactividad química oxidativa, se han propuesto dos mecanismos para las reacciones de oxidación dependientes de peroxinitrito. El primero de ellos implica la reacción directa de oxidación de la molécula blanco por uno o dos electrones. Desde el punto de vista cinético estos procesos son de segundo orden, es decir que su velocidad depende tanto de la concentración del peroxinitrito como de la molécula blanco, por lo que la constante aparente de descomposición de peroxinitrito aumentará linealmente con la concentración de la molécula blanco. Este tipo de reacciones son frecuentemente estudiadas por técnicas de cinética rápida como espectrofotometría de flujo detenido, siguiendo la descomposición del peroxinitrito a 302 nm. El segundo mecanismo lo constituyen las reacciones indirectas de orden cero en peroxinitrito en las que la oxidación de las moléculas blanco está mediada por los radicales secundarios derivados de la homólisis del peroxinitrito (radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno) (162, 167, 168). Sin embargo, solo una pequeña parte de la reactividad del peroxinitrito puede ser asignada a esta vía, dado que *in vivo* la mayor parte del peroxinitrito será consumido por

su reacción directa con blancos biológicos, en lugar de escapar hacia la ruta de formación de estas especies radicalares.

A nivel biológico, los blancos preferentes de la reacción directa del peroxinitrito son los centros metálicos, el dióxido de carbono y compuestos con azufre y selenio (162, 169). Se destaca su reacción con peroxiredoxinas, enzimas que poseen tioles enormemente reactivos, que reaccionan con el peroxinitrito con constantes de velocidad muy elevadas ($10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (170-172).

2.4.7. Radical carbonato

Una de las reacciones más relevantes del peroxinitrito es con el dióxido de carbono (CO_2), dada la constante de velocidad de esta reacción ($k = 4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C) (173) y que el CO_2 se encuentra presente en los sistemas biológicos en concentraciones elevadas (1-2 mM). La reacción conduce a la formación inicial del aducto nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-) que se homoliza produciendo radical anión carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno, con rendimiento del 34 %, mientras el 66 % restante se rearregla para formar CO_2 y nitrato (NO_3^-) (174, 175) (Figura 13). En los sistemas biológicos, también se ha sugerido su formación a partir de la actividad peroxidasa de la CuZnSOD y del recambio de la xantino oxidasa en presencia de bicarbonato (176). El radical carbonato es un potente agente oxidante de un electrón, con un potencial de reducción de $E^\circ(\text{CO}_3^{\cdot-}, \text{H}^+/\text{HCO}_3^-) = + 1.78 \text{ V}$ (177) y junto al radical dióxido de nitrógeno participan en reacciones de oxidación y nitración de biomoléculas.

2.4.8. Dióxido de nitrógeno

El $\cdot\text{NO}_2$ es un radical gaseoso poco soluble en soluciones acuosas que puede ser formado de diferentes formas. Como se mencionó anteriormente una fuente importante es la descomposición homolítica del peroxinitrito. Por otra parte, el nitrito (NO_2^-) endógeno o exógeno puede ser oxidado a $\cdot\text{NO}_2$ en reacciones catalizadas por peroxidases y por química de Fenton. El dióxido de nitrógeno puede además ser producido durante la autooxidación del radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Sin embargo, dado que la autooxidación depende del cuadrado de la concentración del $\cdot\text{NO}$, la producción del radical dióxido de nitrógeno por esta vía sólo se vuelve relevante desde el punto de vista fisiológico en condiciones de producción excesiva de óxido nítrico o a nivel de compartimentos hidrofóbicos donde se concentran el óxido nítrico y el oxígeno (178). El dióxido de nitrógeno es un oxidante fuerte ($E^\circ(\cdot\text{NO}_2/\text{NO}_2^-) = 0.99 \text{ V}$) (163) que puede reaccionar por recombinación con otra especie radicalar, realizar adición a dobles enlaces, transferencia de electrones y abstracción de átomos de hidrógeno. Dada su naturaleza lipofílica, su concentración será mayor en ambientes menos polares como el interior hidrofóbico de las proteínas, en lipoproteínas o en membranas plasmáticas, donde puede desencadenar procesos de lipoperoxidación y formación de nitrolípidos y oxidación de aminoácidos (178).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

En el siguiente trabajo proponemos caracterizar algunos aspectos bioquímicos de la cistationina β -sintasa, centrándonos en su cofactor hemo, estudiando sus propiedades redox y su reactividad con el oxígeno. A su vez investigaremos la reducción del hemo por sistemas biológicos, aspecto clave para poder comprender el rol de este cofactor en la enzima. Finalmente, proponemos abordar la bioquímica del sulfuro de hidrógeno, producto de la CBS de creciente interés biomédico, determinando su reactividad con diferentes oxidantes de relevancia biológica.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Expresión, purificación y caracterización de preparados de CBS recombinante humana

Se plantea en primer lugar purificar la CBS a partir de plásmidos de expresión que codifican para la enzima recombinante humana, caracterizando el preparado enzimático, determinando la actividad específica y el contenido de hemo, piridoxal fosfato y tioles. A su vez, se optimizará la obtención del hemo reducido en condiciones anaeróbicas utilizando reductores químicos.

3.2.2. Determinación del potencial de reducción y de la reactividad frente al oxígeno del hemo de la CBS

Determinaremos el potencial de reducción del grupo hemo mediante técnicas electroquímicas. Además se estudiará la reacción del hemo reducido con el oxígeno, caracterizando la cinética y los productos de reacción. A su vez se estudiará la cinética de reacción entre el oxígeno y el producto formado entre la CBS reducida y el CO.

3.2.3. Estudio de la reducción del hemo de la CBS por sistemas biológicos

Se analizará la posible reducción del hemo de la CBS *in vivo*, a través de la exposición de la CBS a diferentes sistemas de reducción incluyendo fracciones subcelulares y proteínas reductasas purificadas.

3.2.4. Caracterización de la reactividad del sulfuro de hidrógeno frente a oxidantes de relevancia biológica

Se estudiará la cinética y mecanismos de reacción del sulfuro de hidrógeno, producto secundario de la enzima, frente a algunos oxidantes de interés biológico, para racionalizar un posible rol como antioxidante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estudios bioquímicos con la cistationina β -sintasa

Reactivos

La catalasa bovina fue adquirida de Fluka, la xantina oxidasa en Calbiochem y la superóxido dismutasa (Cu,ZnSOD) fue obtenida de DDI Pharmaceuticals (Mountain View, CA). La resina Glutathione Sepharose 4B provino de Pharmacia Biotech. El PLP, la leupeptina, la aprotinina, la pepstatina, la DNasa y el ditioneitol provinieron de AppliChem. Los restantes reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

La cepa BL-21 (DE3) de *E. coli* conteniendo el plásmido pGEX4T1/hCBS Δ C143 que codifica para la variante trunca dimérica fue proporcionado por la Dra. Ruma Banerjee (Universidad de Nebraska y Universidad de Michigan). A su vez la purificación de la MSR y NR1 fue realizada en su laboratorio en el marco de una pasantía de investigación. El tejido hepático de ratas fue proporcionado por Adriana Cassina (Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina).

Expresión y purificación de la CBS

La variante trunca dimérica de la CBS humana, que carece del dominio C-terminal de 143 aminoácidos, fue purificada a partir de un sistema de expresión que produce una proteína de fusión con glutatión S-transferasa. La purificación se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente con algunas modificaciones (68). Las cepas de *E. coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pGEX4T1/hCBS Δ 143 (179), se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) conteniendo ampicilina (75 μ g/mL) a 37 °C hasta obtener una $Ab_{S_{600nm}}$ de 0.8-1. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína recombinante con isopropiltiogalactopiranosido (IPTG, 0.2 mM), se agregó ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA, 75 mg/L) para promover la incorporación del hemo y se creció en condiciones de baja agitación a 25 °C durante 16-18 horas. Luego las células se lisaron por sonicación y se realizó una cromatografía de afinidad en una columna conteniendo la resina GSH-Sepharose 4B (Amersham), seguido por proteólisis limitada con trombina (proteasa de serina endolítica) que permite escindir el dominio GST de la proteína de fusión y posteriormente cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna con DEAE (dietilaminoetil) Sepharose CL6B. Finalmente, se realizó una segunda cromatografía de afinidad, pasando nuevamente la muestra por la resina de GSH-Sepharose pero quedándose esta vez con la fracción que no era retenida. La enzima obtenida se concentró por ultrafiltración y se conservó en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.2) a -80 °C. Alternativamente también se expresó y purificó la CBS nativa de cadena completa, a partir del plásmido pGEX4T1/hCBS en un procedimiento similar al descrito anteriormente.

Caracterización bioquímica del preparado enzimático

La concentración proteica se determinó por el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (180). El contenido de hemo fue determinado por el método de piridina-hemocromo que consiste en incubar la muestra en una solución alcalina (NaOH 0.1 M) que contiene piridina (2.5 M) y agregar ditionito de sodio para reducir el hierro de la porfirina, que lo convierte en hemocromo con un máximo de absorción en 556 nm, a diferencia del hemicromo (complejo porfirina oxidada-piridina) que no presenta un pico de absorbancia definido sino un hombro que absorbe a 540 nm. El contenido de

hemo se calcula de acuerdo a la diferencia en las absorbancias de la especie oxidada y reducida (556nm – 540nm) tomando en cuenta el coeficiente de extinción reportado ($\epsilon_{(556-540)} = 23.98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (181). Como control y para comparar el resultado con datos conocidos, se determinó el contenido de hemo de la mioglobina y del citocromo c.

La concentración de piridoxal fosfato se estudió por fluorescencia, luego de remover el PLP de la enzima con hidroxilamina seguido de diálisis, monitoreando la fluorescencia de la oxima ($\lambda_{\text{exc}} 353 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} 446 \text{ nm}$) y comparando con una curva de calibración utilizando PLP de concentraciones conocidas determinadas espectrofotométricamente ($\epsilon_{295 \text{ nm}} = 5.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (68).

El contenido de grupos tiol reducidos presentes en la enzima se cuantificó de acuerdo al método de Ellman, incubando la CBS (5 μM) con una solución de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, 200 μM), siguiendo la formación de TNB ($\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (182). Las muestras fueron ultrafiltradas utilizando centricones Ultrafree 0.5 (Millipore) para remover la interferencia debida a la absorbancia característica de los cofactores a 412 nm. En los casos en los que fue necesario bloquear los tioles reducidos de la enzima, se incubó una solución de CBS con un exceso de 10 veces de *N*-etilmaleimida (NEM, 1 mM) durante 30 min a 25 °C, seguida de gel filtración en una columna de cromatografía microBio-Spin (Bio-Rad).

Medidas de actividad de la CBS

El ensayo de actividad se basa en la reacción de la cistationina con ninhidrina, en que se forma un complejo coloreado que absorbe a 453 nm. Brevemente, se incubó a 37 °C una mezcla de reacción conteniendo PLP (0.25 mM), serina (30 mM) y CBS en amortiguador Tris (250 mM, pH 8.6), iniciando la reacción con el agregado de L-homocisteína (30 mM) (183, 184). La reacción se detuvo con el agregado de ácido tricloroacético (TCA 5 %) y se removieron las proteínas por centrifugación durante 10 min a 5590 g y 4 °C. A continuación se agregó ninhidrina al sobrenadante, la mezcla se incubó 5 min a 100 °C, se enfrió en baño con hielo durante 2 min y se dejó desarrollar color por 20 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se midió la absorbancia a 453 nm contra un blanco sin enzima. La cantidad de cistationina formada fue determinada realizando una curva de calibración con cistationina de concentración conocida. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo radiactivo, basado en la formación de cistationina a partir de serina marcada radiactivamente (68). Una unidad (U) de actividad enzimática de CBS se define como la cantidad de enzima necesaria para la formación de 1 μmol de cistationina por hora a 37 °C. La actividad específica de la enzima se expresó en U mg^{-1} de proteína.

El reactivo de ninhidrina se preparó disolviendo 1 g de ninhidrina en 100 mL de ácido acético glacial, al cual luego se agregó 1/3 del volumen de ácido fosfórico glacial. Para preparar 1 mL de L-homocisteína 200 mM, se disolvieron 0.2 mmoles de L-homocisteína tiolactona en 0.2 ml de NaOH 5 M, se incubó por 5 min a 37 °C y se ajustó el pH a 8.6 con HCl 2 M. Luego se agregó amortiguador Tris-HCl (100 mM, pH 8.6) y ditioneitol (DTT, 20 mM) (185).

Medida de la actividad glutarredoxina

La actividad hidroxietildisulfuro:glutatión oxidorreductasa de la CBS se determinó siguiendo la oxidación del glutatión, acoplado la reacción a NADPH y glutatión reductasa (186). La reacción fue monitoreada siguiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm correspondiente al consumo de NADPH ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En un volumen final de 1 mL se incubó GSH 1 mM, NADPH 0.4 mM, EDTA 2 mM, BSA 0.1 mg/mL y glutatión reductasa 6 $\mu\text{g/mL}$ en Tris 0.1 M, pH 8.0. A continuación se agregó hidroxietildisulfuro (0.7 mM) y luego de 2 min se añadió CBS, siguiendo la absorbancia a 340 nm. La unidad

de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADPH por minuto.

Obtención de condiciones anaeróbicas

Para realizar los experimentos en anaerobiosis se utilizaron viales o celdas espectrofotométricas selladas con septos de goma. Las soluciones fueron degaseadas por burbujeo intenso con argón o nitrógeno durante 20 a 30 min y se transfirieron con jeringas "gastight". En algunos casos, para asegurar la ausencia de trazas remanentes de oxígeno, se utilizó el sistema compuesto por glucosa (100 mM), glucosa oxidasa (8 U/mL) y catalasa (260 U/mL, según medidas de actividad con peróxido de hidrógeno 10 mM). La solución amortiguadora anaeróbica fue preparada disolviendo las sales de fosfato en agua destilada hervida y burbujeando con nitrógeno.

Alternativamente, en los ensayos realizados en la Universidad de Michigan se utilizaron tonómetros, dispositivos de vidrio con forma de burbuja, que permiten un degaseo eficiente de las soluciones dado que es posible alternar el burbujeo con argón y vacío, repetido en 20 ciclos, dejando finalmente la solución en presión positiva con argón hasta ser utilizada. El tonómetro tiene la posibilidad de enroscar una jeringa "gastight", para poder titular la solución, por ejemplo para reducir la enzima con ditionito de sodio y además se puede añadir un brazo de vidrio en cuyo extremo tiene incorporada una celda de espectrofotómetro. A su vez, los tonómetros pueden conectarse a las jeringas del espectrofotómetro de flujo detenido.

En los experimentos en los que se utilizó el espectrofotómetro de flujo detenido, para asegurar la anaerobiosis se incubó el equipo durante toda la noche con una solución de ditionito de sodio. En los experimentos realizados en la Universidad de Michigan, se utilizó una solución compuesta por protococatehuato (PCA, 100 mM) y protococatehuato dioxigenasa (PCD 0.06 U/mL) en amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4 (187). Estas soluciones fueron luego removidas con sucesivos lavados con agua destilada y amortiguador degaseados previo a la introducción en el equipo de las soluciones anaerobias para realizar las determinaciones.

Reducción química de la CBS

La reducción de la enzima se realizó en condiciones anaeróbicas, degaseando las soluciones de CBS por burbujeo intenso con argón. Se agregó ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) en cantidad estequiométrica y el nivel de reducción de la CBS fue monitoreado espectrofotométricamente por el corrimiento de la banda de Soret de 428 a 449 nm (69, 76). La solución stock de ditionito fue preparada en NaOH 0.1 N degaseada y se cuantificó siguiendo la reducción de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) a 420 nm ($\epsilon_{420} = 1020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (188), asumiendo una estequiometría 2 a 1, de acuerdo con que la especie reductora es el producto de disociación del ditionito, el radical anión dióxido de azufre ($\text{SO}_2^{\cdot-}$) (189). Debido a su autooxidación, se controló la concentración de ditionito, midiéndose al inicio y finalización de cada ensayo.

Alternativamente, en algunos casos, para reducir el hemo de la CBS se utilizó citrato de titanio (III), de acuerdo a procedimientos reportados previamente (68, 190). El citrato de titanio se preparó mezclando ácido cítrico 0.2 M con una solución de cloruro de titanio (TiCl_3 , 1.9 M) preparada en HCl 0.2 M, neutralizando la mezcla con carbonato de sodio. El citrato de titanio se cuantificó midiendo su absorbancia a 340 nm ($\epsilon_{340} = 0.73 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (190) o siguiendo la reducción de ferricianuro de potasio como fue descrito anteriormente.

Determinación del potencial de reducción del hemo de la CBS

Voltametría cíclica. Los voltagramas fueron registrados a temperatura ambiente en una celda de vidrio de tres electrodos utilizando un potenciostato/galvanostato BAS EC Epsilon (Bioanalytical Systems, Inc.). Como electrodo de trabajo se utilizó un alambre de platino (99.999%, Goodfellow) con el cual se obtuvo una mejor respuesta electroquímica que utilizando electrodos de oro o de carbón. El electrodo auxiliar también fue de platino y como referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl, calibrado antes de cada determinación. Los valores de potencial son reportados respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE), añadiendo 0.200 V al valor de potencial medido utilizando el electrodo de referencia Ag/AgCl. Las determinaciones fueron realizadas con una solución de CBS trunca dimérica (10 μ M) en perclorato de potasio (0.1 M) como electrolito soporte, con un pH final \sim 6.5 medido al comenzar y finalizar cada ensayo. Las soluciones y la celda fueron deoxigenadas burbujeando con nitrógeno durante 30 min previo a cada determinación.

Titulación potenciométrica. El potencial de reducción (E_m) del hemo de la CBS fue determinado potencioméricamente de acuerdo al método de Dutton, utilizando ditionito de sodio como reductor y ferricianuro de potasio como oxidante (191). Se utilizó una solución degaseada de CBS trunca dimérica (15 μ M) en amortiguador fosfato de sodio (50 mM, pH 7.2), en presencia de los siguientes mediadores redox: antraquinona 2-sulfonato ($E_m = -225$ mV), benzil viológeno ($E_m = -358$ mV) y metil viológeno ($E_m = -440$ mV) (192), cada uno en una concentración final de 10 μ M. Las titulaciones redox fueron realizadas en un dispositivo diseñado especialmente el cual consistía en una celda del espectrofotómetro de 1 mL, sellada con un septo de goma a través del cual se introdujeron los electrodos de trabajo y auxiliar, ambos alambres de platino, y el electrodo de referencia de Ag/AgCl, calibrado rutinariamente antes de cada determinación. Las medidas de potencial fueron registradas mediante un potenciostato FLUKE 75 III Multimeter. Las titulaciones redox fueron realizadas a temperatura ambiente en condiciones anaerobias, degaseando todas las soluciones, así como la celda mediante burbujeo intenso con nitrógeno. Los valores de potencial medidos son reportados respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE). Luego de la adición del reductor u oxidante, se dejó equilibrar el sistema hasta notar que el cambio en el potencial registrado fuera < 1 mV en 5 min y en ese momento se registró el espectro de absorción. Como control también se registraron los espectros UV-Vis de los mediadores en presencia de ditionito de sodio o ferricianuro, en ausencia de CBS y en cada valor de potencial se restó su contribución a la absorbancia en presencia de enzima.

Determinación de la constante de velocidad de reacción entre Fe(II)CBS y oxígeno

El estudio de la cinética de reacción fue realizado utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics SF 17MV (Leatherhead, UK) con un tiempo de mezclado menor de 2 ms. Los experimentos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, utilizando concentraciones en exceso de dioxígeno. En una de las jeringas, sellada con septo de goma y bajo flujo continuo de argón, se colocó una solución degaseada de Fe(II)CBS en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) previamente reducida con ditionito de sodio (40–100 μ M) transferida con una jeringa “gastight” en condiciones anaeróbicas. En la otra jeringa se colocaron concentraciones crecientes de dioxígeno obtenidas mezclando diferentes volúmenes de agua destilada degaseada (burbujeada con argón), con agua equilibrada con aire (0.258 mM O₂) o equilibrada con dioxígeno (1.25 mM O₂) a 25 °C (193). Las constantes de velocidad observadas para la oxidación de CBS k_{obs} (s⁻¹) se determinaron ajustando los datos de absorbancia a 449 nm a una función de caída exponencial de primer orden, utilizando el software del equipo. Las determinaciones fueron realizadas en presencia de SOD (0.25 μ M monómero). Se mantuvo la temperatura controlada a 25.0 \pm 0.1 °C. Los espectros en función del tiempo

fueron obtenidos utilizando un accesorio de arreglo de diodos (Applied Photophysics (200-750 nm), Leatherhead, UK) acoplado al espectrofotómetro de flujo detenido.

Determinación de la constante de reacción entre Fe(II)CBS y peróxido de hidrógeno

La cinética de reacción fue estudiada en un espectrofotómetro de flujo detenido siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente. Se mezcló una solución anaeróbica de Fe(II)CBS (5 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) con concentraciones crecientes y en exceso de peróxido de hidrógeno (0-4 mM) en presencia de dióxígeno (129 μM) y SOD (0.25 μM). Los trazos cinéticos correspondientes a la caída en la absorbancia a 449 nm fueron ajustados a una función exponencial de primer orden para obtener las constantes de velocidad aparente k_{obs} (s^{-1}).

Determinación de la constante de reacción entre Fe(II)CO-CBS y oxígeno

El estudio cinético de la reacción de reoxidación del Fe(II)CO por dióxígeno fue realizado en colaboración con David Ballou (Universidad de Michigan) utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido Hi-Tech Scientific modelo SF-61DX al cual se acopló un accesorio de arreglo de diodos para registrar los espectros de absorción en el tiempo.

Para obtener las soluciones anaeróbicas de la enzima se utilizaron tonómetros, como se explicó en la sección de obtención de condiciones anaeróbicas. En estos ensayos, la CBS (5 μM , concentración final luego de mezclar) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) fue primero degaseada en el tonómetro realizando varios ciclos de nitrógeno/vacío, luego se tituló con ditionito, agregado mediante la jeringa en pequeñas concentraciones y se verificó la reducción realizando espectros de absorción. A continuación, la solución de Fe(II)CBS se saturó con monóxido de carbono (CO) alternando ciclos de vacío y burbujeo con CO de tanque durante 20 min y luego se registraron espectros en el tiempo para confirmar la formación de la especie Fe(II)CO. Finalmente se conectó el tonómetro al espectrofotómetro de flujo detenido. En la otra jeringa se colocaron concentraciones crecientes y en exceso de oxígeno, obtenidas burbujeando agua destilada degaseada con oxígeno de tanques con diferentes porcentajes. Las determinaciones fueron realizadas en presencia de SOD (0.5 μM monómero) y se mantuvo la temperatura controlada a 25.0 ± 0.1 °C.

Exposición de CBS a sistemas reductores

Se incubó la CBS con diferentes sistemas reductores, en presencia o ausencia de nucleótidos de piridina (NADH o NADPH) y flavinas di- o mononucleótido (FAD y FMN), monitoreando la reducción de la enzima por los cambios en el espectro UV-Vis. La determinación fue realizada en condiciones anaerobias como fue descrito previamente. Se realizaron también ensayos donde se estudió el consumo de oxígeno utilizando un electrodo Clark, en presencia de los sistemas reductores y NADP(H) antes y después del agregado de la CBS.

Como sistemas reductores se utilizaron fracciones subcelulares de hígado de rata, en particular la fracción citosólica y microsomal; y flavina reductasas purificadas como la xantina oxidasa (comercial y purificada en nuestro laboratorio), metionina sintasa reductasa y NR1 (purificadas en el laboratorio de Ruma Banerjee).

Fraccionamiento subcelular. Se realizó el fraccionamiento subcelular a partir de extractos de hígado de rata. Los órganos fueron obtenidos en colaboración con Adriana Cassina del Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina, quien realiza experimentos

con estos animales y cuenta con la habilitación correspondiente. Brevemente, se extrae el hígado de una rata sacrificada en el momento y se mantiene en hielo durante todo el procedimiento. Se corta en trozos pequeños y se resuspende en la solución de homogeneización (10% w/v) que contiene sacarosa (0.25 M) e inhibidores de proteasas en amortiguador Tris 50 mM, pH 7.4. A continuación se homogeneiza el tejido con un homogenizador Potter-Elvehem a 1100 rpm con varias incursiones del émbolo y el homogeneizado se filtra en gasa. Posteriormente se realizó el fraccionamiento subcelular siguiendo protocolos estándar de centrifugación diferencial (194). El homogeneizado se centrifugó a 900 g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante, conteniendo las fracciones mitocondrial y citosólica se centrifugó nuevamente a 10.000 g durante 30 min⁻¹ h a 4 °C. Se recolectaron los sobrenadantes conteniendo las fracciones citosólicas. Para obtener la fracción microsomal se realizó una ultracentrifugación a 100.000 g durante 1 h a 4 °C. Los pellets enriquecidos en fracción microsomal fueron resuspendidos en 1 mL del amortiguador Tris 50 mM, pH 7.4 con sacarosa 0.25 M. Como control, se avaluó la actividad del extracto siguiendo la reducción del diclorofenolindofenol (50 μM, DCFIF) monitoreando el descenso en la absorbancia a 600 nm ($\epsilon_{600\text{ nm}} = 22000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (195), en presencia de NADH y/o NADPH 100 μM (196).

Expresión y purificación de la MSR y oxidorreductasa NR1. Estas flavoproteínas fueron purificadas siguiendo un procedimiento similar al de la CBS, mediante un sistema de expresión que produce una proteína de fusión con un dominio glutatión transferasa (GST). El cultivo se creció en medio LB con ampicilina a 37 °C hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0.6. Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con isopropiltiogalactopiranosido (IPTG, 1 mM), se agregó riboflavina (1 mg/L) y se creció en condiciones de baja agitación a 25 °C durante 16-18 horas. Luego las células se lisaron por sonicación y la purificación continuó mediante una cromatografía de afinidad utilizando una resina de glutatión-Sepharosa, seguida de proteólisis limitada con trombina para remover el dominio de glutatión transferasa y finalmente otro paso por la columna de glutatión-Sepharosa, pero ahora recogiendo el eluido donde se encuentra la enzima. Alternativamente se puede realizar una cromatografía de afinidad utilizando una resina de 2',5'-ADP-Sepharose, que une estas proteínas por su dominio de unión a NADPH. Finalmente las enzimas purificadas fueron caracterizadas mediante la realización del espectro de absorción para confirmar el contenido de flavinas y se midió su actividad determinando la reducción de citocromo c en presencia de NADPH.

4.2. Preparación y cuantificación de especies reactivas

Peroxinitrito. El peroxinitrito fue sintetizado en un reactor de flujo detenido a partir de nitrito de sodio (NaNO₂) y peróxido de hidrógeno en condiciones de pH ácido, de acuerdo al procedimiento reportado previamente (197). Las soluciones stock de peroxinitrito fueron tratadas con dióxido de manganeso para eliminar el peróxido de hidrógeno remanente de la síntesis y se conservan a -80 °C. La concentración de peroxinitrito se midió espectrofotométricamente a 302 nm ($\epsilon_{302} = 1670\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (198) y se realizaron diluciones en NaOH 10 mM o 0.1 N inmediatamente antes de su utilización. La concentración de nitrito (NO₂⁻) contaminante fue típicamente menor al 25 % respecto a la concentración de peroxinitrito.

Peróxido de hidrógeno. Las soluciones de peróxido de hidrógeno fueron preparadas a partir de la dilución del stock en agua Nanopura y su concentración se determinó de acuerdo a su absorbancia a 240 nm ($\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (199).

La formación de peróxido de hidrógeno por reacción del oxígeno con la CBS reducida, fue determinada por un método fluorescente, utilizando ácido para-hidroxifenilacético (p-HPA) cuya oxidación genera el dímero (p-HPA)₂ en una reacción catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP). El ensayo consistió en agregar alícuotas de reacción a una solución con p-HPA (1 mM) y HRP (10 nM) en amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, incubando durante 10 min a 37°C. A continuación, dado que la máxima emisión de fluorescencia del (p-HPA)₂ se obtiene a un pH alcalino, una alícuota de la mezcla se diluyó al medio en amortiguador pirofosfato 100 mM, pH 10, se midió la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 323 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$) y se determinó la concentración utilizando una curva de calibración con concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno.

Ácido hipocloroso. El ácido hipocloroso fue preparado a partir de la dilución de la solución stock en NaOH 0.1 N y se cuantificó midiendo su absorbancia a 292 nm ($\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (200).

Taurina cloramina. La solución de taurina cloramina (TauCl) fue preparada antes de cada experimento, mezclando taurina con hipoclorito en una relación de 10:1 con un exceso de taurina para evitar la formación de di- y tricloraminas y se cuantificó midiendo su absorbancia a 252 nm ($\epsilon_{252} = 429 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (148, 201). Alternativamente, se utilizó un ensayo colorimétrico basado en la oxidación de yoduro de potasio. Brevemente, se hicieron reaccionar alícuotas de TauCl de concentración desconocida con una solución de KI 50 mM en amortiguador ácido acético/acetato 0.1 M pH 4.0 y se cuantificó la absorbancia correspondiente a la formación del anión triioduro (I_3^-) a 287.5 nm ($\epsilon_{287.5} = 40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 353 nm ($\epsilon_{353} = 26400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (202). La concentración de TauCl obtenida de esta forma sólo difiere en menos de un 5 % de las obtenidas directamente por su absorbancia a 252 nm, por lo que ambos métodos son concordantes.

DetECCIÓN DE SUPERÓXIDO

La formación del radical anión superóxido como producto de la reacción del oxígeno con CBS reducida, fue determinada en primera instancia midiendo la reducción de citocromo c (cit c^{3+}) a 550 nm ($\epsilon_{550} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (203). También se utilizó nitro blue tetrazolio (NBT), cuya reducción por superóxido genera el formazán de color azul-violáceo medido a 550 nm ($\epsilon_{550} = 15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (204). Finalmente, se optó por utilizar epinefrina, cuyo producto de oxidación por el superóxido forma adrenocromo (205, 206) que absorbe a 480 nm ($\epsilon_{480} = 4020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (69). Se confirmó la especificidad del proceso evaluando la inhibición de su oxidación por superóxido dismutasa (SOD). Las soluciones stock de epinefrina bitartrato (40 mM) fueron preparadas en el momento en HCl 0.01 N y se mantuvieron en hielo para prevenir su autooxidación. En un ensayo típico se incubó Fe(II)CBS (previamente reducida con cantidades subestequiométricas de ditionito de sodio) con epinefrina y oxígeno, añadidos simultáneamente en una concentración final de 2 mM y 200 μM respectivamente, en ausencia y en presencia de SOD (1.5 μM monómero). Dado que se ha reportado que la CBS puede reoxidarse lentamente y en forma espontánea en un proceso promovido por pH ácido (207), estos experimentos fueron realizados en un medio ligeramente alcalino, en amortiguador Tris (0.1 M, pH 8.6). La oxidación de epinefrina fue seguida espectrofotométricamente registrando los espectros de absorción luego de realizar una ultrafiltración para remover la interferencia en la absorción debida a los cofactores de la enzima. Como control se realizaron ensayos

en ausencia de CBS. Para determinar la estequiometría de oxidación de epinefrina por el anión superóxido, se comparó esta reacción con la reducción de citocromo c^{+3} . Como sistema generador de superóxido se utilizó la enzima xantina oxidasa (3.5 mU/mL) agregando xantina (50 μ M) como sustrato. Como control, la actividad de la xantina oxidasa fue monitoreada espectrofotométricamente midiendo la aparición del producto ácido úrico a 292 nm ($\epsilon_{292} = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Procedimientos generales

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50. Los experimentos fueron realizados en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) excepto se indique lo contrario, conteniendo ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA, 0.1 mM) para eliminar la posible interferencia debida a trazas de metales.

4.3. Estudio de la reactividad del sulfuro de hidrógeno

Preparación y cuantificación de sulfuro de hidrógeno

Como fuente de sulfuro de hidrógeno en solución se utilizó sulfuro ácido de sodio (NaHS), almacenado en un desecador. Las soluciones de sulfuro de hidrógeno se prepararon en agua ultrapura deoxigenada, se mantuvieron en hielo en recipientes sellados y se utilizaron en el día. La concentración de la solución stock de sulfuro de hidrógeno fue estandarizada mediante titulación iodométrica. Brevemente, el sulfuro fue atrapado con acetato de zinc para minimizar su difusión y luego fue tratado con un exceso de yodo en medio ácido. El yodo remanente fue titulado con tiosulfato de sodio (208). La concentración de sulfuro de hidrógeno fue tomada como el 70.3 % de la estimada por pesada.

La concentración de sulfuro de hidrógeno en mezclas de reacción fue determinada espectrofotométricamente por el método del azul de metileno (97, 209). Las alícuotas de reacción fueron mezcladas con cloruro de zinc (2 mM) para fijar el sulfuro y luego se agregó *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPDA, 7.5 mM final a partir del stock 20 mM en HCl 7.2 M) en presencia de cloruro férrico (FeCl_3 , 11.25 mM final a partir del stock 30 mM en HCl 1.2 M). Luego de 20 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 670 nm correspondiente a la formación del azul de metileno, el cual se relacionó con la concentración de sulfuro utilizando curvas de calibración con concentraciones conocidas de NaHS. Alternativamente, el sulfuro de hidrógeno fue medido mediante un método polarimétrico, utilizando un electrodo sensor de sulfuro (Modelo ISO-H2S-2; World Precision Instruments, WPI). El voltaje se fijó en 150 mV y la señal fue detectada acoplado el analizador Apollo 4000 (WPI). Antes de cada determinación, se calibró el sensor realizando una curva de calibración con soluciones de sulfuro de hidrógeno preparadas en el momento utilizando las mismas condiciones que en el experimento.

Cinética de la reacción del peroxinitrito con sulfuro de hidrógeno

Para determinar la constante de velocidad de la reacción del peroxinitrito con sulfuro de hidrógeno, se siguió la cinética de descomposición del peroxinitrito utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido como fue descrito anteriormente. Los experimentos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, monitoreando la descomposición del peroxinitrito a 302 nm en presencia de un exceso de sulfuro de hidrógeno. No se observó una interferencia apreciable de la absorbancia del sulfuro de hidrógeno a 302 nm. Las constantes de velocidad observadas k_{obs} (s^{-1}) fueron determinadas a partir del ajuste de los trazos cinéticos a una función de caída exponencial de primer orden

utilizando el software del equipo. La temperatura fue mantenida a 37.0 ± 0.1 °C y el pH final se midió mezclando volúmenes iguales de la solución de cada jeringa (simulando la mezcla realizada en la celda del espectrofotómetro de flujo detenido). Los valores reportados son el promedio \pm desviación estándar (SD) de al menos 7 determinaciones independientes.

Las soluciones del amortiguador fosfato de sodio con DTPA 0.1 mM a pH 7.4, fueron preparadas con la precaución de no adicionar NaOH para disminuir el efecto contaminante del dióxido de carbono. Para estudiar específicamente el rol del dióxido de carbono en la reactividad del peroxinitrito, se preparó una solución stock de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 1M) que se adicionó al amortiguador fosfato pH 7.0 de forma que alcance un pH de 7.4 ± 0.1 y una concentración final de NaHCO_3 de 25 mM. La concentración final de dióxido de carbono fue de 1.2 mM, calculada de acuerdo al valor de pK_a de 6.1 para el equilibrio entre el ácido carbónico y el dióxido de carbono. Esta solución amortiguadora modificada se preparó en el momento y se utilizó inmediatamente para minimizar la difusión del dióxido de carbono. Se realizaron controles con peroxinitrito previamente descompuesto en la solución amortiguadora (experimentos de adición reversa) a fin de descontar la contribución a los rendimientos de oxidación de contaminantes presentes en las preparaciones de peroxinitrito, como la de los productos de su descomposición, en particular nitrito.

Cinética de la reacción del peróxido de hidrógeno con sulfuro de hidrógeno

Los experimentos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, utilizando una concentración en exceso de peróxido de hidrógeno. La reacción dio comienzo luego de agregar sulfuro de hidrógeno (190 μM) a viales sellados conteniendo peróxido de hidrógeno (2.5 mM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) incubados a 37 °C. Se tomaron alícuotas de la reacción a diferentes tiempos a las que se les adicionó catalasa (78 U/mL, de acuerdo a medidas de actividad con peróxido de hidrógeno 10 mM) para detener la reacción y consumir el exceso de peróxido de hidrógeno que permaneció sin reaccionar, en presencia de cloruro de zinc (10 mM) para atrapar el sulfuro. A continuación se cuantificó el contenido de sulfuro en las muestras mediante el método del azul de metileno y a partir del ajuste a una función exponencial de primer orden se determinó el valor de la constante de velocidad. Como control se determinó que la caída en la concentración de sulfuro de hidrógeno en ausencia de peróxido de hidrógeno no resultó ser significativa durante los tiempos de incubación. Además se verificó que la actividad catalasa no resultó afectada por el cloruro de zinc en nuestras condiciones experimentales.

Cinética de la reacción del hipoclorito con sulfuro de hidrógeno

La cinética de reacción de oxidación del sulfuro de hidrógeno por hipoclorito fue estudiada mediante un ensayo de competencia con metionina. Las reacciones dieron comienzo con el agregado de hipoclorito a mezclas de reacción conteniendo sulfuro de hidrógeno en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de metionina en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con Chelex) incubados en viales sellados a 37 °C. Luego del agregado del hipoclorito, las reacciones fueron incubadas durante 1 min y posteriormente se tomaron alícuotas de la reacción para cuantificar el contenido de sulfuro por el método del azul de metileno. Los controles realizados demostraron que no hubo reacción apreciable entre el sulfuro de hidrógeno y metionina en nuestras condiciones experimentales y que la metionina no interfirió de forma apreciable con el método empleado de cuantificación del sulfuro. Dado que el hipoclorito es muy reactivo hacia una gran variedad de compuestos biológicos, en particular las aminas, la elección del amortiguador es crítico para evitar interferencias, por tanto estos experimentos fueron

realizados en amortiguador fosfato tratado con Chelex para eliminar la posible interferencia debida a metales traza y evitar la utilización del agente quelante DTPA.

Alternativamente, el sulfuro de hidrógeno fue detectado utilizando el sensor de sulfuro. En un experimento típico, el hipoclorito fue inyectado en una cámara con temperatura controlada conteniendo sulfuro de hidrógeno en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de metionina. Los controles realizados demostraron que en las concentraciones utilizadas, el hipoclorito o la metionina no interfirieron en la señal de detección correspondiente al sulfuro de hidrógeno.

Cinética de la reacción de taurina cloramina con sulfuro de hidrógeno

El estudio cinético de la reacción fue realizado siguiendo el consumo de sulfuro de hidrógeno utilizando el sensor de sulfuro. La reacción dio comienzo luego de agregar sulfuro de hidrógeno (3.5 μM) a diferentes concentraciones de TauCl (30-90 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con Chelex) a 37 °C. Como control, en las concentraciones ensayadas no se detectó señal apreciable debida a TauCl en ausencia de sulfuro de hidrógeno.

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido utilizando un oxímetro Cole Parmer (Vernon Hills, IL, USA) conectado a un electrodo Clark (Modelo 5300, Yellow Springs Instrument Co.) acoplado a una computadora con un procesador DUO.18 (World Precision Instruments). El electrodo fue calibrado tomando como 100% la solubilidad del oxígeno en agua burbujeada con aire (solubilidad del oxígeno a 37 °C, 217 μM). En un experimento típico, se inyectó peroxinitrito (0.5 mM) a la cámara del oxímetro conteniendo diferentes concentraciones de sulfuro de hidrógeno en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 °C. Como control, los reactivos fueron añadidos en forma reversa, siendo el peroxinitrito descompuesto en amortiguador antes de ser mezclado con el sulfuro de hidrógeno.

Experimentos de radiólisis de pulso

El estudio fue realizado mediante la técnica de radiólisis de pulso, en un trabajo de Madia Trujillo en colaboración (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina) con Lisa Folkes y Peter Wardman, en el Gray Cancer Institute (University of Oxford, UK). Se utilizó un acelerador lineal de 6 MeV. Se realizaron pulsos electrónicos de 6 MeV de energía durante 0.2 μs , que resultan en ~ 0.8 Gy, determinado por dosimetría de tiocianato.

La constante de velocidad de la reacción entre el radical dióxido de nitrógeno y sulfuro de hidrógeno fue determinada en un ensayo de competencia con 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina 6 ácido sulfónico) (ABTS^{2-}), como fue reportado previamente (210). El radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) fue generado por radiólisis de pulso de soluciones acuosas conteniendo óxido de dinitrógeno (N_2O , 25 mM), dando lugar a concentraciones submicromolares de radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), que en presencia de nitrito de sodio (NaNO_2 , 5 mM) generó el $\cdot\text{NO}_2$. Una vez formado, el $\cdot\text{NO}_2$ reaccionó con ABTS^{2-} , cuya oxidación genera el radical $\text{ABTS}^{\cdot-}$ seguido a 645 nm ($\epsilon = 13400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (211); o con sulfuro de hidrógeno dando lugar a la formación del radical sulfanilo ($\text{S}^{\cdot-}$) que también oxida al ABTS^{2-} para formar $\text{ABTS}^{\cdot-}$. Las concentraciones de ABTS^{2-} y de sulfuro de hidrógeno utilizadas en el ensayo fueron seleccionadas de forma que aunque en gran exceso respecto a $\cdot\text{NO}_2$, no compitieran con el nitrito para la formación inicial del radical hidroxilo. Las soluciones de ABTS^{2-} (20-100 μM) fueron preparadas en amortiguador fosfato de sodio (25 mM, pH 6 y 7.5) y saturadas con N_2O . La constante de velocidad de la reacción

de oxidación del ABTS^{2-} por el $\text{S}^{\cdot-}$ también fue determinada por radiólisis de pulso, siguiendo el procedimiento descrito previamente para la reacción del ABTS^{2-} con radicales tiólo (210). Las constantes de velocidad observadas fueron obtenidas por ajustes de la formación de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ a una función doble exponencial. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Simulaciones y análisis de los datos

Todos los experimentos reportados fueron repetidos en días diferentes, con cada condición realizada habitualmente por triplicado con resultados reproducibles. Los resultados se expresan como valores promedio con los correspondientes valores de desvío estándar o se muestra un experimento representativo de los mismos. Las gráficas y el análisis de los datos fueron realizados utilizando el programa Origin 6.1 (Microcal Software).

Las simulaciones asistidas por computadora fueron realizadas utilizando el programa Gepasi versión 3.30 (212). Para el estudio de la oxidación aeróbica del sulfuro de hidrógeno por peroxinitrito, las constantes cinéticas utilizadas fueron seleccionadas para las reacciones a pH 7.4 y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando no se encontraron constantes en estas condiciones se utilizó el valor reportado más cercano.

Las estructuras cristalográficas fueron visualizadas y analizadas con el programa PyMol v0.99 (61) utilizando las coordenas atómicas obtenidas del Protein Data Bank con el código de acceso 1JBQ (50). Para los cálculos electrostáticos se utilizó la aplicación Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) (213).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Expresión, purificación y caracterización de preparados de CBS recombinante humana

Esta parte del trabajo fue realizado en conjunto con Laura Celano, como parte de su Maestría en Ciencias Biológicas referente a las interacciones de CBS con el peroxinitrito. También participó Ernesto Cuevasanta en el marco de su tesina de grado.

5.1.1. Expresión y purificación de la CBS

La CBS humana fue purificada en su variante trunca dimérica, a partir de un sistema de expresión que produce una proteína de fusión con un dominio glutatión transferasa. En la Figura 14, se indican las diferentes etapas en la purificación de la CBS mediante un gel de electroforesis.

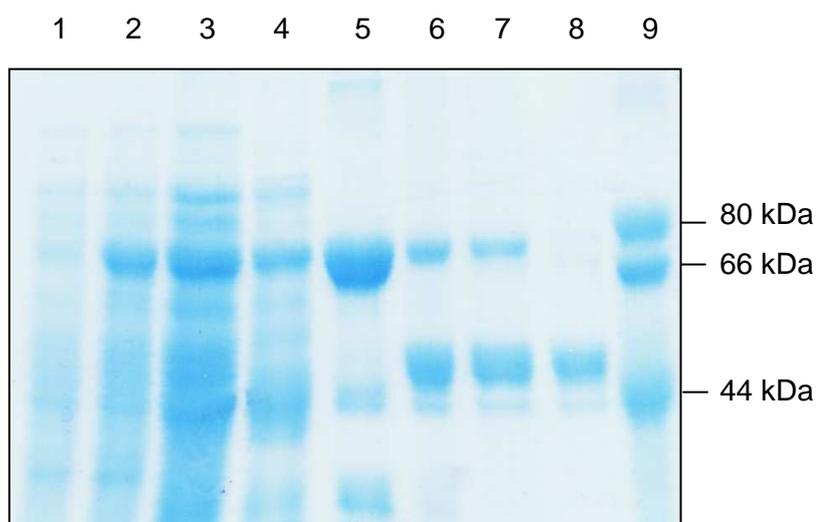


Figura 14. Análisis en SDS-Page de las diferentes etapas de la purificación de la CBS. Se sembraron los lisados de células bacterianas antes y después de inducir la expresión de la proteína recombinante con IPTG (carriles 1 y 2, respectivamente). Luego se sembró la fracción obtenida en la sonicación y extracción (carril 3). A partir de la fracción soluble, se realizó un intercambio iónico (carril 4), cromatografía de afinidad (carril 5), proteólisis con trombina (carril 6) y nuevamente un intercambio iónico (carril 7) seguido de otro paso de cromatografía de afinidad (carril 8).

Luego de la inducción, se observa una banda mayoritaria con un peso molecular de aproximadamente 68 kDa correspondiente a la CBS trunca (45 kDa) unida al dominio de glutatión S-transferasa (23 kDa), con un incremento importante en su intensidad que corresponde al aumento en el nivel de expresión de la proteína recombinante. Posteriormente, se lisaron las células y se procedió a purificar la proteína por cromatografía de afinidad, utilizando una resina de glutatión-sepharosa. La CBS se

separó del dominio de glutatión transferasa por proteólisis limitada por trombina, la cual fue controlada para evitar la proteólisis de la CBS. En el gel de electroforesis se observa la aparición de una banda mayoritaria correspondiente al monómero de la CBS dimérica (45 kDa), además una banda menor de la proteína de fusión aún sin digerir (68 kDa) y la correspondiente al dominio escindido de glutatión S-transferasa (23 kDa). Por tanto, se realizó otro paso de intercambio iónico, seguido de una nueva cromatografía de afinidad pero en este caso nos quedamos con la fracción eluida (que pasó por la columna sin interactuar con la resina) donde se encuentra solamente la CBS, que fue finalmente concentrada y almacenada en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.2) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Es importante destacar que en las sucesivas purificaciones de la CBS se han introducido pequeñas modificaciones al protocolo original que han permitido optimizar el proceso de expresión y purificación, logrando finalmente obtener muy buenos rendimientos de enzima funcional y con alto grado de pureza con para poder realizar los diferentes ensayos.

5.1.2. Caracterización bioquímica de la CBS purificada

Determinación de la actividad enzimática

Las medidas de actividad de CBS fueron realizadas utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción del producto de la reacción cistationina con ninhidrina, reactivo que reacciona específicamente con grupos amino. En la Figura 15 (panel A), se observa un espectro de absorción del complejo ninhidrina-cistationina con un máximo de absorción a 453 nm y como control los espectros correspondientes a la reacción de ninhidrina con cada uno de los sustratos, serina y homocisteína. Ambos sustratos presentan un espectro de absorción diferente. Debemos considerar además que la concentración final de cada uno luego de agregar ninhidrina a los ensayos de actividad es de 1.5 mM y su aporte a la absorbancia medida será menor que la observada en este control. De todas formas, en cada determinación de la actividad se realizó un blanco con todos los reactivos en ausencia de enzima y se restó su contribución en la absorbancia final medida. La cistationina formada en la mezcla de reacción se cuantificó realizando una curva de calibración con concentraciones conocidas de cistationina (Figura 15, panel B). Se obtuvo una relación directa entre la cantidad de cistationina formada y la concentración de enzima (Figura 15, panel C). La actividad específica de la CBS trunca dimérica fue determinada como $550\text{ }\mu\text{moles mg}^{-1}\text{ h}^{-1}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, similar a valores reportados (47).

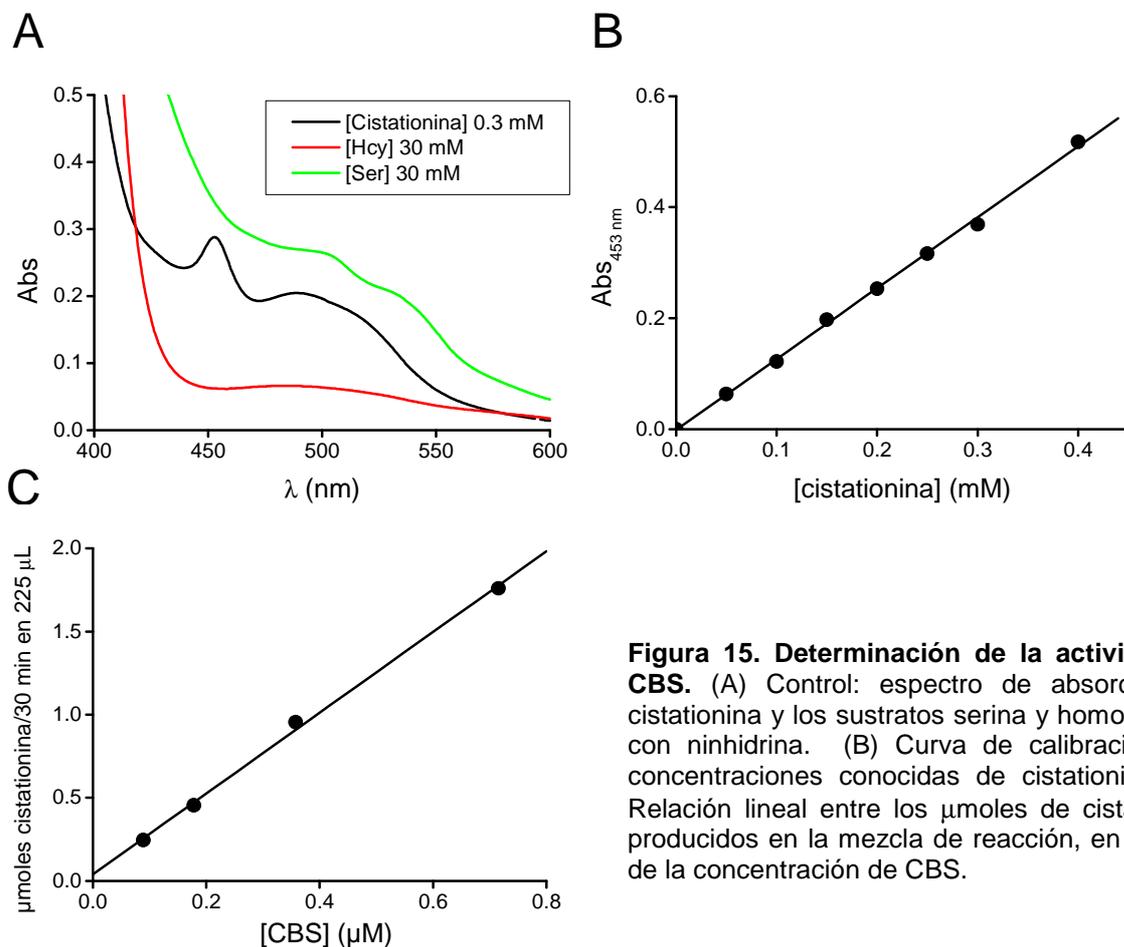


Figura 15. Determinación de la actividad de CBS. (A) Control: espectro de absorción de cistationina y los sustratos serina y homocisteína con ninhidrina. (B) Curva de calibración con concentraciones conocidas de cistationina. (C) Relación lineal entre los μ moles de cistationina producidos en la mezcla de reacción, en función de la concentración de CBS.

Determinación del contenido de hemo

El espectro de absorción del hemo de la CBS es típico de una hierro protoporfirina IX. Luego de la purificación, la enzima en estado oxidado férrico presenta un máximo de absorbancia a 428 nm que corresponde a la banda γ de Soret, junto con las bandas $\alpha\beta$ en el entorno de los 550 nm, característico de un hemo hexacoordinado de bajo espín (Figura 16). Se distingue además el máximo correspondiente a la banda δ del hemo a 364 nm. El cofactor PLP, unido a la enzima mediante una base de Schiff con la Lys119, presenta a pH 7.4 dos formas tautoméricas en equilibrio correspondientes a la forma protonada de la aldimina interna (cetoenamina) que absorbe a \sim 400 nm y a la desprotonada (enolimina) a \sim 330 nm, con lo cual se estima que contribuyen en un pequeño porcentaje a los máximos de absorbancia a 428 y 364 nm (214).

Para evaluar la pureza de la muestra, se calculó la relación Abs_{280}/Abs_{428} , con un valor promedio de 1.07, similar al valor reportado de \sim 1.0 (68, 73). El contenido de hemo fue determinado mediante el método de piridina hemocromo, obteniendo para la CBS trunca dimérica un 80 % de hemo con un coeficiente de extinción para la forma férrica a 428 nm y pH 7.4 de $73500 \pm 3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (basado en proteína) y $92700 \pm 4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (basado en hemo), comparable con el reportado previamente (47).

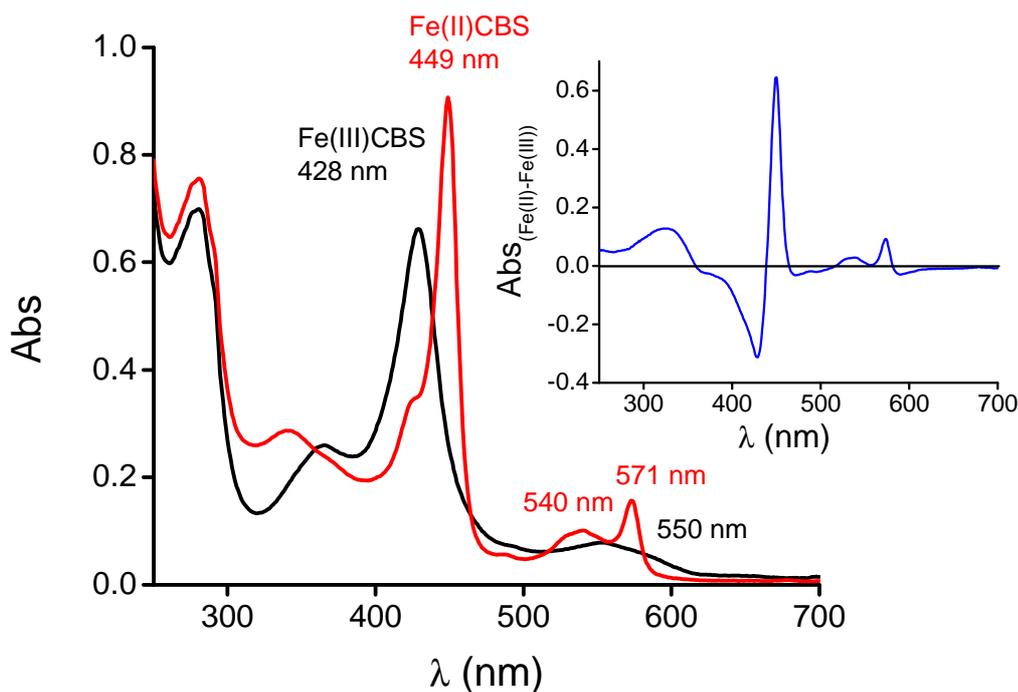


Figura 16. Espectro UV-Vis de la CBS oxidada y reducida. Una solución de Fe(III)CBS (9 μ M) en amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4, fue reducida en condiciones anaerobias con el agregado de ditionito de sodio. *Inserto.* Espectro diferencial calculado como $Abs_{Fe(II)CBS} - Abs_{Fe(III)CBS}$, por lo que los máximos positivos representan los picos de la forma reducida.

Reducción química del hemo de la CBS

El hemo de la CBS puede ser reducido utilizando diferentes reductores químicos, tales como ditionito de sodio o citrato de titanio. Es importante puntualizar que la reducción de la enzima debe realizarse en condiciones anaeróbicas. Para ello pusimos a punto un protocolo para trabajar en anaerobiosis que implicó sellar las celdas del espectrofotómetro con septos y degasear previamente todas las soluciones utilizadas en el ensayo por burbujeo intenso con argón. Adicionalmente se utilizó un sistema para consumir las trazas de oxígeno remanentes, compuesto por glucosa/glucosa oxidasa y catalasa y como control para verificar la ausencia de oxígeno en el sistema se utilizó hemoglobina, determinando espectrofotométricamente la ausencia de la forma oxiHb.

El espectro de absorción en la forma ferrosa indica un desplazamiento en el máximo de Soret, con un corrimiento hacia el rojo a 449 nm, lo cual indica la retención del ligando tiolato. Además se definen dos nuevos picos centrados en 571 y 540 nm, que corresponden a las bandas α y β respectivamente (Figura 16). En la Figura 17, se observa una titulación de la CBS con la adición de pequeñas alícuotas de ditionito. La CBS pasa directamente del estado férrico Fe(III)CBS al ferroso Fe(II)CBS con la aparición de puntos isobésticos bien definidos a 440, 464 y 555 nm, indicando que no hay formación de especies intermediarias durante la reducción. La contribución a la absorbancia en el entorno de 314 nm, corresponde a trazas de ditionito de sodio.

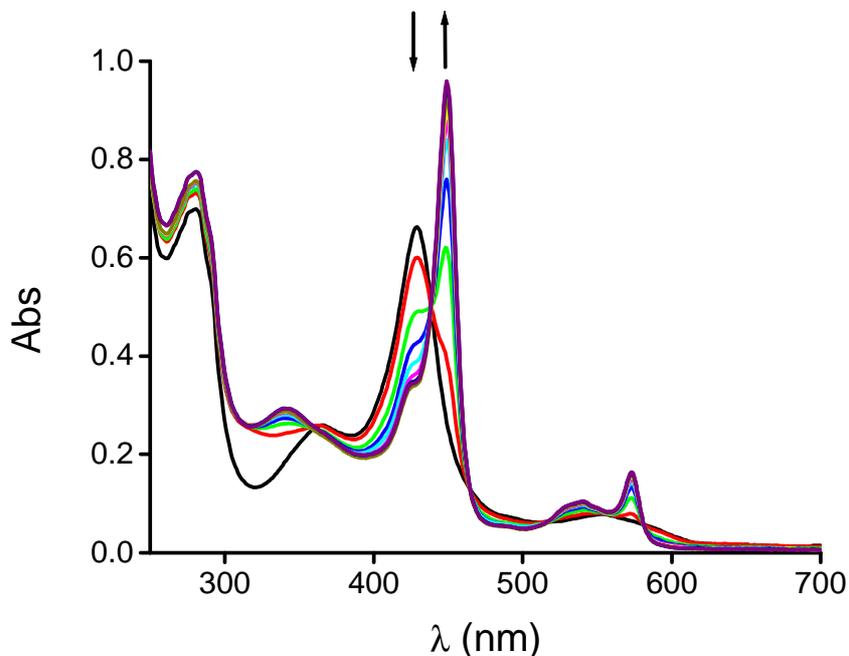


Figura 17. Espectro UV-Vis de la titulación de CBS con ditionito. A una solución de Fe(III)CBS (9 μM) en amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4, en condiciones anaerobias se agregaron pequeñas alícuotas de ditionito de sodio. Se observa una disminución de la especie oxidada y un aumento en la absorbancia a 449 nm, correspondiente a la forma reducida.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con Inés Marmisolle, en el marco de su tesina de grado, han permitido caracterizar la cinética de reducción de la CBS por ditionito de sodio. La constante de velocidad de reacción fue determinada mediante espectrofotometría de flujo detenido, mezclando una solución anaeróbica de Fe(III)CBS con concentraciones crecientes y en exceso de ditionito de sodio. Las constantes observadas (k_{obs}) fueron determinadas a partir del ajuste de los valores de absorbancia a 449 nm a una función exponencial, para cada concentración de ditionito. Al graficar k_{obs} vs $[\text{ditionito}]^{1/2}$ se obtuvo una relación lineal, por lo que la reacción siguió un orden de $\frac{1}{2}$ con respecto al ditionito, indicando que la especie reductora es el radical anión dióxido de azufre ($\text{SO}_2^{\cdot-}$), producto de disociación del ditionito (reacciones 9 y 10). El valor de la constante de velocidad de reducción fue de $(1.24 \pm 0.03) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a pH 7.4 y 25 $^{\circ}\text{C}$ (215).



Determinación del contenido de tioles

De acuerdo con la secuencia aminoacídica de la CBS humana, en la variante de cadena completa cada monómero tiene 11 cisteínas que se encuentran altamente conservadas en mamíferos. Una de ellas, la Cys431 se localiza en el extremo C-terminal, por lo que está ausente en la variante trunca dimérica que presenta 10 cisteínas. En nuestro caso determinamos el contenido de cisteínas reducidas en la CBS purificada de acuerdo al método de Ellman y el resultado indica un tiol reducido por monómero de CBS (1.0 ± 0.4 , $n = 2$), valor consistente con el reportado para la variante trunca dimérica, donde además se sugirió que podría tratarse de la Cys15, que se encuentra expuesta y accesible al solvente (216). Este residuo se encuentra en el extremo N-terminal, en la región del hemo

pero no participa en su unión. Sin embargo a pesar de conocer que está expuesto, no es posible determinar su rol en la estructura de la enzima dado que las estructuras cristalográficas disponibles comienzan en el aminoácido 40. Es interesante el hecho que en la variante de cadena completa se ha reportado la existencia de dos tioles reducidos, donde además de la Cys15, la Cys431 del extremo C-terminal también se encuentra accesible al solvente y podría tener un rol en la unión del AdoMet (216).

Caracterización de la posible actividad glutarredoxina

La CBS presenta una secuencia CXXC que comprende los residuos aminoacídicos Cys₂₇₂-Pro₂₇₃-Gly₂₇₄-Cys₂₇₅, localizada en la región catalítica próximo al hemo y al PLP, a una distancia de ambos de ~20 Å. Curiosamente, este motivo cuya función se desconoce, está conservado en otras CBS de mamíferos que contienen hemo, pero ausente en distintas especies más distantes que no lo contienen, como en la CBS de levaduras o de *Dictyostelium* (50). De acuerdo a estudios estructurales, estas cisteínas han sido detectadas en el estado tiol oxidado formando un enlace disulfuro intramolecular, pero también en el estado tiol reducido, presumiblemente por la presencia de ditiotreitól en el medio de cristalización (50, 51). Las secuencias CXXC, son características de la familia de proteínas denominadas tiol-disulfuro oxidorreductasas, como la tiorredoxina o glutarredoxina. Las enzimas de esta familia se caracterizan por tener en el sitio catalítico dos residuos de cisteína redox-activos en un dominio típico de tiorredoxina altamente conservado. Con el fin de comprender la función de esta secuencia CXXC presente en la CBS, se analizó una posible actividad enzimática del tipo glutarredoxina, mediante la determinación de la reducción del sustrato hidroxietildisulfuro (XSSX) por GSH, que se oxida a GSSG y se vuelve a reducir a GSH acoplando la reacción a glutatión reductasa y NADPH (Figura 18).

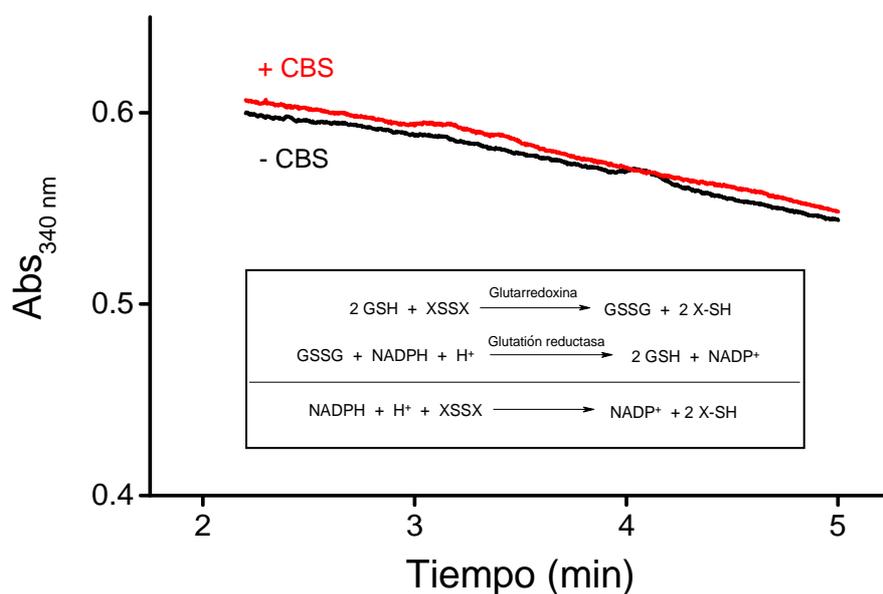


Figura 18. Determinación de actividad oxidorreductasa en CBS.

En un volumen final de 1 mL se incubó GSH 1 mM, NADPH 0.4 mM, EDTA 2 mM, BSA 0.1 mg/mL y glutatión reductasa 6 µg/mL en Tris-Cl 0.1 M, pH 8.0. A continuación se agregó HED 0.7 mM y luego de 2 min se añadió CBS 2 µM. Se realizó además un control sin enzima (línea negra). La reacción fue monitoreada espectrofotométricamente siguiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación de NADPH.

La reacción fue monitoreada siguiendo el consumo de NADPH a 340 nm, definiendo la unidad de actividad glutarredoxina como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADPH por minuto. En presencia de CBS, la actividad glutarredoxina fue determinada como menor a 0.014 U/mg para la variante trunca dimérica y menor a 0.0038 U/mg para la variante de cadena completa (Figura 18). Estos resultados al ser comparados con la actividad oxidoreductasa de la glutarredoxina (Grx1) de *E. coli*, reportada como 220 U/mg (217, 218), sugieren que la CBS no presenta actividad glutarredoxina apreciable. Esto está de acuerdo con el hecho de que las dos cisteínas accesibles al solvente en la CBS de cadena completa no correspondían a las del dominio CPGC, resultando poco probable la función como oxidoreductasa para la CBS (216). Otro elemento importante para tener en cuenta son los estudios realizados por Ernesto Cuevasanta en el marco de una colaboración con Martín Graña del Instituto Pasteur, en los que mediante análisis bioinformático de estructuras no se evidenció una homología estructural clara ni superposición de dominios entre la CBS y otras enzimas de la familia de oxidoreductasas de tioles.

5.2. Potencial redox del hemo de la CBS y estudio de su reactividad con oxígeno

5.2.1. Determinación del potencial redox

Voltametría cíclica

Para determinar el valor del potencial redox del hemo en la CBS, se empleó como una aproximación inicial la técnica de voltametría cíclica. El procedimiento consistió en aplicar a la solución de CBS un barrido de voltaje a una velocidad de 0.1 V s^{-1} , utilizando como electrodo de trabajo un alambre de platino y registrando la intensidad de corriente al realizar varios ciclos, tanto en el sentido directo como en el inverso. Estos experimentos se realizaron con Fernando Zinola (laboratorio de electroquímica). Como se observa en la Figura 19, el voltagrama exhibió dos picos, uno anódico (en el cual la enzima está completamente oxidada) centrado en $-0.316 \pm 0.017 \text{ V}$ y otro catódico (en el que la CBS está totalmente reducida) en $-0.457 \pm 0.006 \text{ V}$ versus NHE (promedio \pm desviación estándar, $n = 6$).

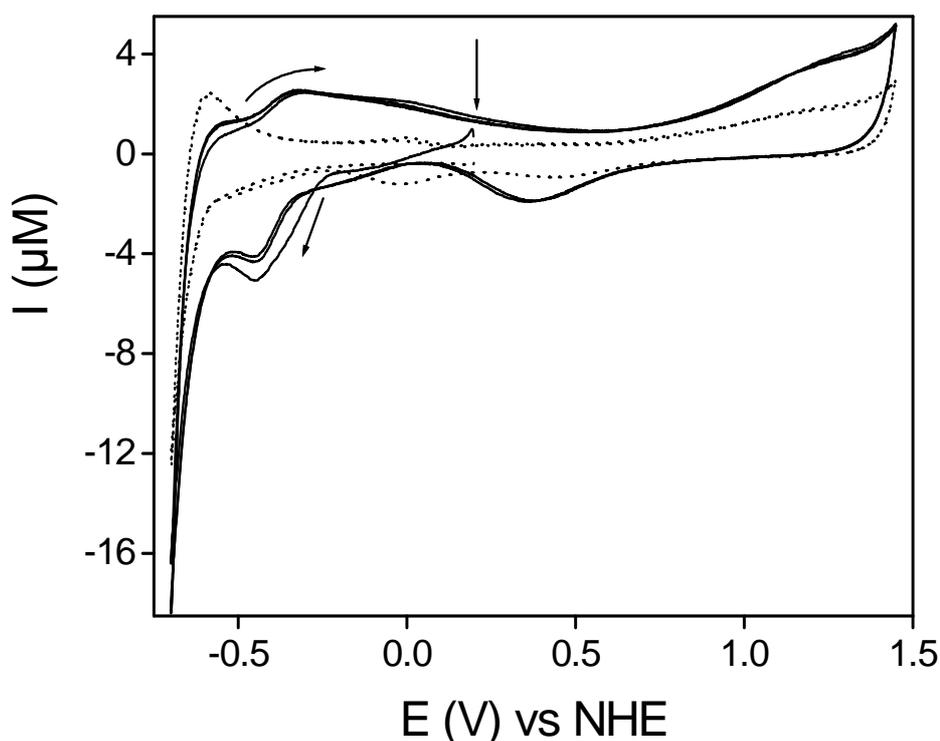


Figura 19. Voltametría cíclica de la CBS. Los voltagramas cíclicos fueron registrados en condiciones anaeróbicas aplicando una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V s^{-1} en presencia (trazo continuo) o en ausencia (trazo punteado) de la CBS trunca dimérica ($10 \mu\text{M}$) en perclorato de potasio (0.1 M), pH 6.46. Los valores de potencial son reportados respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE). Las flechas indican la dirección del barrido de potencial.

Como control, estos picos no se observaron en ausencia de enzima. Para descartar que la señal obtenida fuera debida a los grupos tiol en la CBS, se repitió el procedimiento con la CBS previamente tratada con NEM para bloquear de forma irreversible sus grupos tiol. En este caso se obtuvo un resultado similar que con la CBS sin modificar, confirmando que la respuesta electroquímica observada fue originada en el hemo (no se muestra). Sin embargo, considerando la respuesta típica de un sistema reversible por la transferencia de un electrón, la separación entre los picos debería ser 0.059 V. En nuestro caso, la diferencia entre los picos fue de 0.141 V, por lo que la respuesta obtenida puede considerarse de un sistema cuasi-reversible y por lo tanto no es posible determinar con exactitud el valor del potencial redox realizando el promedio entre los valores de potencial anódico y catódico. La causa de esta respuesta no totalmente reversible en la respuesta electroquímica, puede haber sido la adsorción de la CBS a la superficie del electrodo de trabajo. Es importante mencionar que la reversibilidad no mejoró con el incremento en la velocidad del barrido de voltaje ni con el agregado de mediadores químicos que facilitarían la transferencia del electrón entre el hemo y el electrodo. De todas formas, con hemoproteínas generalmente es difícil obtener mediante voltametría cíclica señales electroquímicas en forma directa, por lo cual se destaca el haber obtenido una respuesta con la CBS. Esto está de acuerdo con el hecho que el hemo en la proteína se encuentra relativamente expuesto y accesible al solvente, tal como lo indican los estudios estructurales (50, 51).

Titulación potenciométrica

Como alternativa, con el fin de mejorar la reversibilidad de la respuesta electroquímica y poder determinar con mayor exactitud el valor del potencial de reducción del hemo en la CBS, se utilizó una técnica electroquímica diferente, la titulación potenciométrica. Esta técnica es usualmente utilizada para determinar el potencial redox de hemoproteínas y se basa en la medida del potencial, monitoreando al mismo tiempo alguna propiedad del cofactor hemo como cambios en el espectro UV-Vis. El procedimiento consiste en agregar pequeñas alícuotas de ditionito de sodio a una solución de CBS totalmente oxidada y en cada punto de la titulación, una vez que se alcanza el equilibrio, registrar simultáneamente la medida del potencial y los cambios de absorbancia mediante espectros UV-VIS. De esta forma se puede determinar la distribución de las especies oxidada y reducida para cada valor de potencial medido. La titulación continúa hasta que la enzima está totalmente reducida. Alternativamente se puede realizar la titulación potenciométrica en el sentido inverso, partiendo de la CBS previamente reducida con ditionito y agregando sucesivas alícuotas de ferricianuro de potasio hasta oxidarla completamente.

En la Figura 20, se muestra un experimento representativo obtenido por titulación potenciométrica oxidativa, en el cual se registró en cada punto de la titulación, el espectro de absorción y el valor de potencial. Los experimentos fueron realizados en presencia de mediadores redox que facilitan la transferencia de electrones entre el hemo y el electrodo de trabajo, ayudando a la reversibilidad de la respuesta electroquímica. Dado que estos mediadores presentan espectros de absorción y potenciales redox bien definidos, se realizaron los controles correspondientes para descartar alguna interferencia de los mismos en las señales detectadas. Los datos de absorbancia a 428 nm y 449 nm en función del potencial, fueron ajustados a la ecuación de Nernst modificada (ec. 1), donde A_o representa la absorbancia de la CBS completamente oxidada, A_R es la absorbancia de la CBS totalmente reducida y A_x la absorbancia de ambas especies, oxidada y reducida en cada punto de la titulación.

$$A_x = A_o + \frac{A_R - A_o}{1 + e^{\left(\frac{E - E^o}{RT/nF}\right)}} \quad (\text{ec. 1})$$

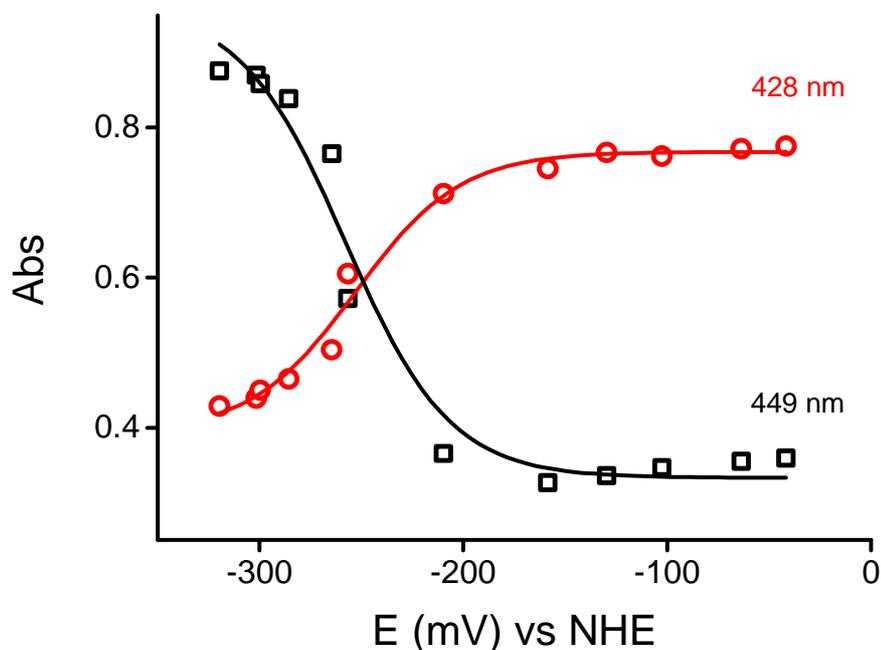


Figura 20. Titulación potenciométrica de la CBS. Una solución anaeróbica de Fe(II)CBS (15 μ M), previamente reducida con ditionito de sodio en amortiguador fosfato (50 mM, pH 7.4, fue oxidada con el agregado de sucesivas alícuotas de ferricianuro de potasio, registrando simultáneamente el voltaje y los espectros de absorción. Los datos de absorbancia a 428 nm (círculos) y 449 nm (cuadrados) fueron ajustados a la ecuación de Nernst modificada (ec. 1, líneas continuas). Como mediadores se utilizaron trifeniltetrazolio, safranina O, rojo neutro y metil viológeno, en concentraciones finales de 0.8-1.25 μ M.

El potencial de reducción estimado a partir de las titulaciones en sentido oxidativo, fue de -252 ± 90 mV ($n = 4$) a 449 nm y -241 ± 90 mV ($n = 4$) a 428 nm, *versus* NHE a pH 7.4. Para las titulaciones en sentido reductivo, se obtuvieron valores de potencial de -260 ± 80 mV ($n = 6$) y de -230 ± 70 mV ($n = 4$) a 449 nm y 428 nm, respectivamente, *versus* NHE a pH 7.4. Sin embargo, nos preocupó la excesivamente alta dispersión de las medidas. Esta baja reproducibilidad probablemente pudo deberse a la dificultad de mantener anaerobiosis sostenida durante estos experimentos prolongados. Por lo tanto, las titulaciones fueron repetidas por Peter Madzellan y Ruma Banerjee en la Universidad de Nebraska, utilizando una cámara anaerobia. En la Figura 21, se muestra un experimento representativo de titulación potenciométrica en sentido reductivo, en el que se partió de la CBS oxidada con un máximo de absorción de Soret a 428 nm y se agregaron alícuotas de ditionito hasta reducirla completamente, con un corrimiento en el máximo de absorbancia a 449 nm. En este caso, para obtener el valor del potencial redox (E_m), se utilizó la ecuación de Nernst (ec. 2) ajustando los datos del potencial medido (E) y la concentración de la especie reducida obtenida calculando la diferencia en los valores de absorbancia a 428 o 449 nm entre el espectro registrado a determinado potencial y el espectro inicial de la enzima totalmente oxidada (en la titulación en sentido reductivo).

$$E = E_m + \frac{0.059}{n} \log \frac{[ox]}{[red]} \quad (\text{ec. 2})$$

Los valores obtenidos del potencial de reducción para la titulación reductiva fueron de -287 mV a 449 nm (pendiente = 54 mV) y de -285 mV a 428 nm (pendiente = 59 mV), *versus* NHE a pH 7.2. Para las titulaciones en sentido oxidativo se obtuvieron valores de potencial de -293 mV (pendiente = 58 mV) y -294 mV (pendiente = 50 mV) a 449 nm y 428 nm, respectivamente. A partir de las pendientes obtenidas en cada caso surge un valor muy próximo a los 59 mV, lo cual permite establecer que la reacción redox en el hemo de la CBS siguió el esperado comportamiento Nernstiano cuando se considera que en la reacción hubo intercambio de un electrón. El valor promedio (\pm desviación estándar) del potencial redox considerando diferentes determinaciones independientes, fue de -291 ± 5 mV ($n = 4$) para la titulación reductiva y -289 ± 6 mV ($n = 3$) para la titulación oxidativa.

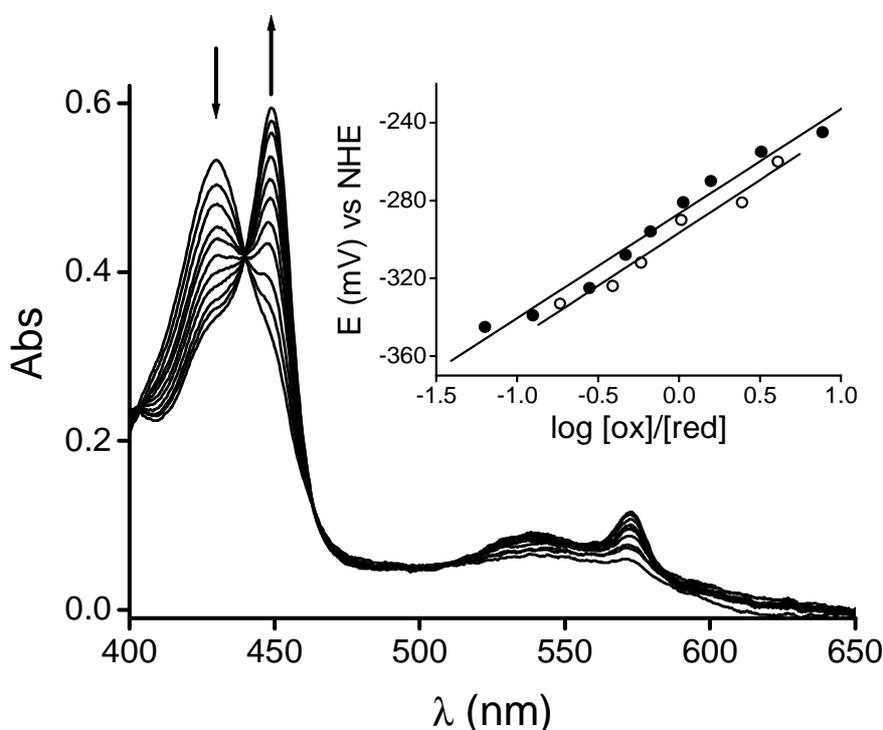


Figura 21. Titulación potenciométrica de la CBS. Una solución anaeróbica de Fe(III)CBS ($7 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato (50 mM , pH 7.2), fue reducida con el agregado de sucesivas alícuotas de ditionito de sodio, registrando simultáneamente el voltaje y los espectros de absorción. Se utilizaron como mediadores: antraquinona 2-sulfonato, benzil viológeno y metil viológeno, en concentraciones finales $10 \mu\text{M}$. *Inserto.* Ajuste a la ecuación de Nernst (ec. 2) de datos representativos correspondientes a la titulación reductiva con ditionito (círculos negros) y a la titulación oxidativa con ferricianuro (círculos blancos).

Inicialmente, basado en la naturaleza de la CBS, con un hemo de bajo espín con dos ligandos axiales relativamente fuertes, se había pronosticado un valor de potencial redox relativamente bajo. Los valores de potencial de reducción medidos para el hemo de la CBS se encuentran en el rango de los reportados en la literatura para otras hemoproteínas con un ligando tiolato (Tabla 2) e incluso son bien comparables con otros hemo que al igual que la CBS presentan ligandos Cys/His.

Tabla 2. Comparación del potencial redox de hemo-tiolato proteínas

proteínas hemo-tiolato	ligandos	potencial redox vs. NHE	referencia
citocromo P450	Cys/-	-360 a -170 mV	(3)
oxido nítrico sintasa	Cys/-	-347 a -239 mV	(2)
cloroperoxidasa	Cys/-	-140 mV	(4)
<i>R. rubrum</i> CooA	Cys/Pro	-320 mV	(6)
citocromo <i>R. sulfidophilum</i>	Cys/His	-160 mV	(7)
citocromo <i>c</i> Met80Cys	Cys/His	-390 mV	(1)
cit. <i>c</i> ₅₅₀ <i>T. elongatus</i> His92Cys	Cys/His	-300 mV	(8)
SoxAX <i>P. pantotrophus</i>	Cys/His	-432 mV	(5)

Debemos tener en cuenta que el valor del potencial de reducción en hemoproteínas se ve influenciado por múltiples factores, entre los que se incluyen: la identidad de los aminoácidos ligandos del hemo, la hidrofobicidad y nivel de exposición o accesibilidad al solvente, así como los puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas que puedan generarse entre residuos cargados en el entorno del hemo. En este sentido, el tiolato en la CBS establece interacciones polares con Arg266 y con el átomo de nitrógeno del Trp54 (50, 51). Estas interacciones, al disminuir la capacidad de donar electrones al centro metálico, tenderían a estabilizar el estado reducido e incrementar el valor del potencial redox (219, 220). Por otra parte, en colaboración con Martín Graña del Instituto Pasteur, se ha podido determinar que el hemo en la CBS se encuentra en un entorno electropositivo, con varios residuos aminoacídicos con carga positiva, incluyendo las argininas Arg51 y Arg224, que interaccionan con los carboxilatos del hemo (Figura 22). La correlación entre el potencial de reducción y un entorno electropositivo está bien documentada para hemoproteínas en general (129, 219, 220) y se puede predecir que tendrá un efecto estabilizador del estado reducido del hemo y por tanto tenderá a incrementar el valor del potencial.

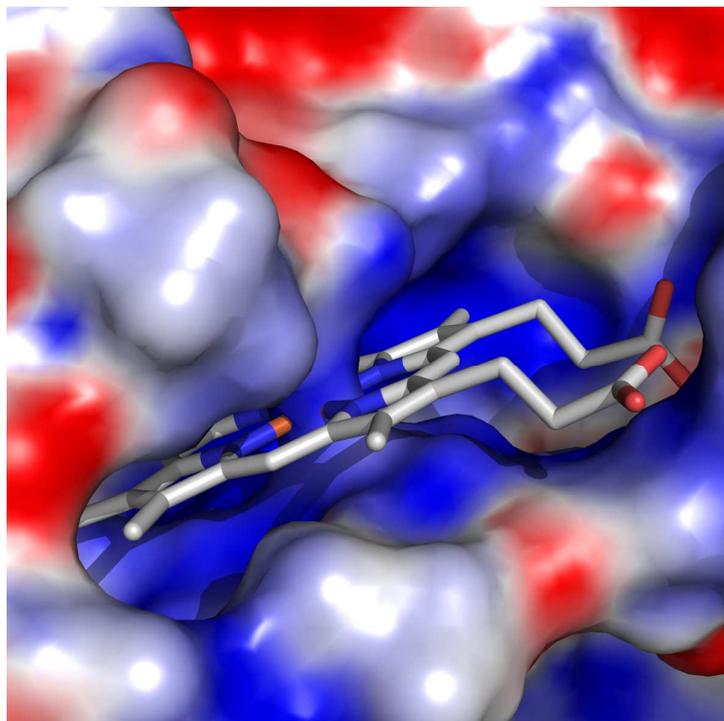


Figura 22. Estudio del potencial electrostático en el entorno de unión del hemo en la CBS. La superficie de la proteína se representa coloreada de acuerdo al potencial electrostático. Las regiones con carga positiva se muestran en azul y con carga negativa en rojo. La información estructural se obtuvo de PubMed (1JBQ) utilizando PyMol para visualizarla y Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) para el cálculo electrostático.

A diferencia de otras hemoproteínas en las que el grupo hemo se encuentra escondido en el interior de la estructura proteica, en la CBS el hemo parece estar bastante expuesto en la superficie ($\sim 150\text{\AA}^2$). Hay que considerar sin embargo que en la estructura cristalográfica, están ausentes aproximadamente 40 aminoácidos del extremo N-terminal, con lo cual se desconoce cuál sería su efecto y qué influencia podrían tener en el grado de exposición del hemo.

Paralelamente, Peter Madzellan y Ruma Banerjee determinaron por el mismo procedimiento el potencial de reducción del hemo de la CBS de cadena completa con un valor de -350 ± 4 mV (95). Resulta sorprendente la diferencia obtenida en el valor del potencial de ~ 60 mV entre la CBS de cadena completa y la variante trunca, lo cual sugiere que quizás el cambio en el estado de oligomerización de tetrámero a dímero pueda de algún modo influir en el entorno del hemo, o que el dominio regulatorio en la CBS de cadena completa pueda interactuar con el dominio de unión al hemo, modulando de esta forma su potencial de reducción. Sin embargo, entre ambas variantes no se encontraron diferencias en otras propiedades, como características espectroscópicas, o como se verá a continuación en la reactividad frente al oxígeno.

5.2.2. Reactividad del oxígeno con el hemo reducido de la CBS

Reactividad del Fe(II)CBS con oxígeno

A partir de la observación experimental de que se tornaba muy difícil poder trabajar con la CBS reducida, excepto en condiciones anaeróbicas estrictas dado que la enzima se reoxidaba muy rápidamente aún en presencia de pequeñas trazas de oxígeno, surgió la inquietud de estudiar la cinética de oxidación por el oxígeno de la CBS reducida, así como determinar el mecanismo de reacción e identificar sus productos.

La reacción fue estudiada por técnicas de cinética rápida, empleando un espectrofotómetro de flujo detenido. Como se observa en la Figura 23, cuando una solución anaeróbica de Fe(II)CBS previamente reducida con ditionito de sodio se mezcló con un exceso de oxígeno en condiciones de pseudo-primer orden, se observó una muy rápida reoxidación (en el orden de milisegundos) de la enzima, evidenciada en los espectros de absorción por una disminución en el máximo de absorbancia a 449 nm correspondiente a la forma reducida de la CBS, y un concomitante aumento de la forma oxidada a 428 nm. Claramente se observa además la aparición de un punto isobéptico a 438 nm, confirmando que no hay formación detectable de especies intermedias tales como oxiCBS ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{O}_2$ o $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{O}_2^{\cdot-}$) u oxiferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$).

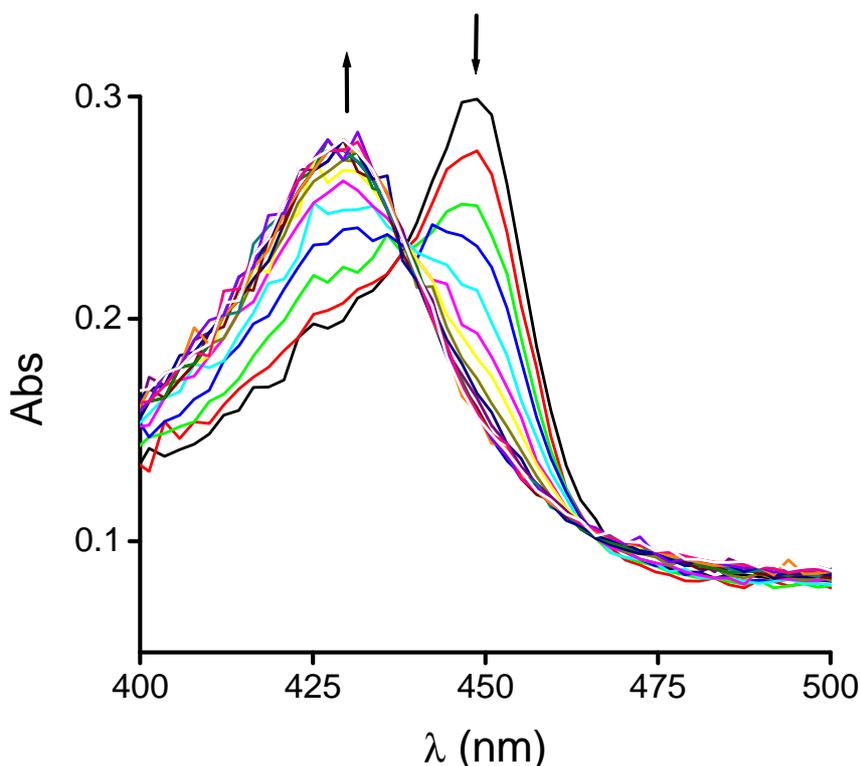


Figura 23. Oxidación de Fe(II)CBS por el oxígeno. Espectro UV-Vis luego de mezclar Fe(II)CBS ($5 \mu\text{M}$) con O_2 ($129 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato (0.1 M , $\text{pH } 7.4$, con DTPA 0.1 mM) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los espectros fueron registrados cada 8 ms luego del mezclado, entre 4 y 140 ms . Las flechas indican la dirección del cambio de absorbancia en el tiempo.

Para determinar la constante de velocidad de la reacción se siguió el curso temporal del decaimiento de la CBS reducida a 449 nm, al ser expuesta a concentraciones crecientes y en exceso de oxígeno. Los trazos cinéticos mostraron una desviación del comportamiento esperado de pseudo-primer orden, pues no ajustaron bien a una función de caída exponencial, evidenciado en los gráficos de escala logarítmica que no mostraron una dependencia lineal (Figura 24). Pensando en que quizás como producto de la reacción se estuviera formando algún intermediario responsable de la desviación observada, se realizó el experimento en presencia de catalasa (0.2 o 1.25 μM), pero no se determinó una corrección en la desviación, lo cual sugiere que de formarse peróxido de hidrógeno, éste no interfiere en la reacción de oxidación. Sin embargo, cuando en la determinación experimental se incluyó SOD (0.2 o 0.4 μM), la desviación fue suprimida, implicando la formación del anión superóxido. Una explicación plausible para este hecho es que en ausencia de SOD, tanto el oxígeno como el radical superóxido pueden oxidar la Fe(II)CBS. El radical superóxido puede ser originado en nuestro sistema ya sea en la reacción misma de reoxidación de la CBS, pero también como producto de la autooxidación del ditionito vía la reacción de su producto de disociación ($\text{SO}_2^{\cdot-}$) con el oxígeno. Para ayudar a la comprensión de este mecanismo y confirmar su incidencia en la reacción se realizaron simulaciones cinéticas asistidas por computadora, utilizando las reacciones listadas en la Tabla 3, utilizando condiciones similares a las experimentales. Como resultado, el curso de la reacción simulada pudo ser bien reproducido con la inclusión de la reacción del radical superóxido con Fe(II)CBS, con una constante de velocidad de reacción en el orden de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 24).

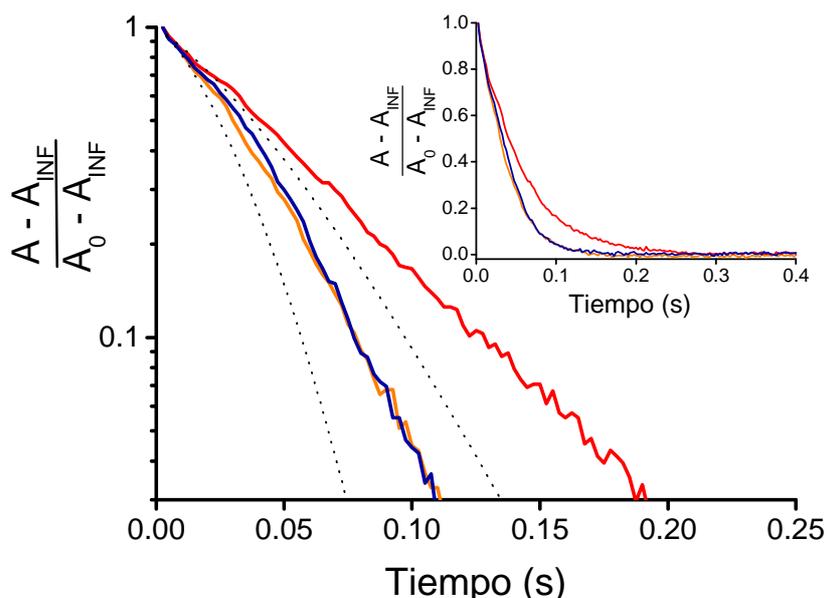


Figura 24. Trazos cinéticos de la reacción entre Fe(II)CBS y oxígeno. Gráfico en escala logarítmica de los trazos cinéticos a 449 nm luego de mezclar Fe(II)CBS (4.4 μM , reducida con ditionito de sodio 23 μM , concentraciones finales) con O_2 (129 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM) a 25 $^\circ\text{C}$, en ausencia (línea anaranjada) o en presencia de SOD (0.4 μM , línea roja), o catalasa (0.2 μM , línea azul). A corresponde a la absorbancia a tiempo t, A_0 y A_{INF} son los valores de absorbancia inicial y final, respectivamente. Las líneas punteadas representan los trazos cinéticos simulados para la reacción de oxidación del Fe(II)CBS con radical superóxido (Tabla 3), asumiendo constantes de velocidad de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (línea punteada superior) o de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (línea punteada inferior) *Inserto*: gráfico de escala lineal hasta 0.4 s.

Tabla 3. Reacciones involucradas en la oxidación aeróbica de CBS reducida por ditionito.

Reacción	constante de velocidad (<i>k</i>)	Referencia
$\text{Fe(II)CBS} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)CBS} + \text{O}_2^{\bullet-}$	$1.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C)	Este trabajo
$\text{Fe(II)CBS} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe(III)CBS} + \text{H}_2\text{O}_2$	$2\text{-}10 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C)	Este trabajo
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} \rightleftharpoons 2 \text{SO}_2^{\bullet-}$	$1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (r) ^a 2.5 s^{-1} (d) (pH 6.5, 25 °C)	(221, 222)
$\text{SO}_2^{\bullet-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_2 + \text{O}_2^{\bullet-}$	$1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 6.5, 25 °C)	(222)
$2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	$2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4)	(127)

^a (r), reversa; (d) directa

Por tanto, para determinar el valor de la constante de velocidad para la reacción entre Fe(II)CO con el oxígeno, se midieron las constantes de decaimiento de pseudo-primero orden de la enzima reducida frente a diferentes concentraciones de oxígeno, en presencia de SOD (0.25 μM). El resultado obtenido muestra que las constantes observadas k_{obs} aumentaron linealmente con concentraciones crecientes de oxígeno, lo cual indica la ausencia de cinética de saturación, descartando la unión directa del oxígeno al hemo (Figura 25).

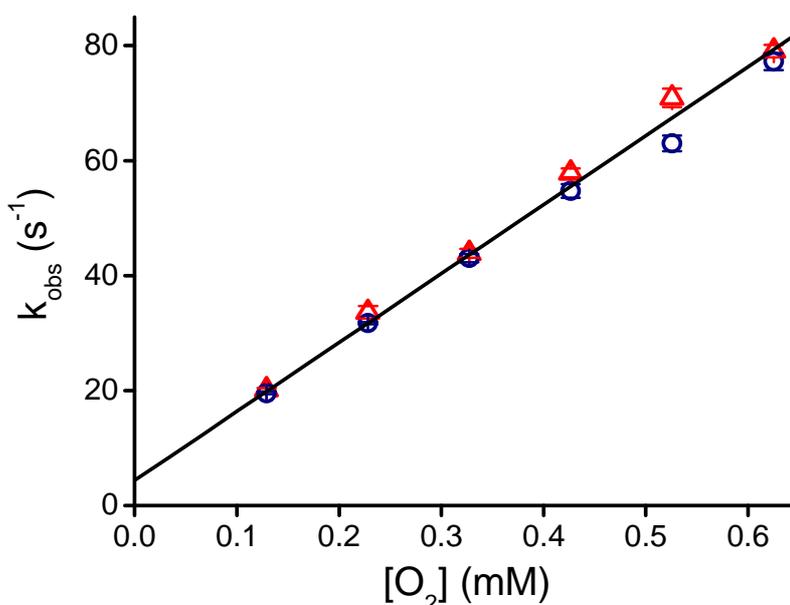


Figura 25. Constante de velocidad entre Fe(II)CBS y oxígeno. Se mezcló una solución anaeróbica de Fe(II)CBS (5 μM) con concentraciones crecientes de O_2 en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, con DTPA 0.1 mM) a 25 °C, en presencia de SOD (0.25 μM). Las k_{obs} (s^{-1}) fueron determinadas del ajuste a la función de caída exponencial de Fe(II)CBS a 449 nm, para cada concentración de oxígeno. Los resultados son el promedio \pm desviación estándar ($n \geq 8$). Se muestran datos de dos experimentos independientes representativos.

A partir de la pendiente se determinó un valor para la constante de velocidad de reacción de segundo orden de $(1.11 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$). Como se observa en el gráfico, el intercepto no pasa por cero ($5.5 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$) y desconocemos su causa. Para la CBS de cadena completa se siguió el mismo procedimiento experimental y se determinó una reactividad con oxígeno muy similar que para la variante trunca dimérica, con un valor de constante de reacción de segundo orden de $(1.13 \pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este resultado contrasta con la diferencia de potencial de 60 mV encontrada para las dos variantes de la CBS.

Se determinó además la constante de velocidad de la reacción de reoxidación de Fe(II)CBS por peróxido de hidrógeno, que resultó ser más lenta con un valor de $(5.8 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 26). La inclusión de esta reacción en las simulaciones no afectó el decaimiento de Fe(II)CBS por el oxígeno, descartando su incidencia en la reacción.

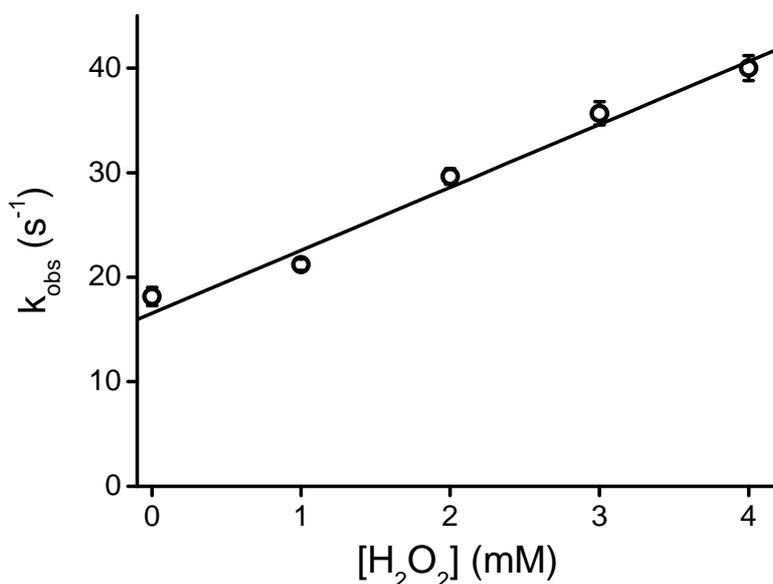


Figura 26. Constante de velocidad entre Fe(II)CBS y H₂O₂. Se mezcló una solución anaeróbica de Fe(II)CBS (5 μM) con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, con DTPA 0.1 mM) a 25 °C, en presencia de SOD (0.25 μM). Las k_{obs} (s⁻¹) fueron determinadas del ajuste a la función de caída exponencial de Fe(II)CBS a 449 nm, para cada concentración de peróxido de hidrógeno. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar ($n \geq 8$).

Determinación de la generación de radical anión superóxido

A continuación nos avocamos a la identificación del producto de la reacción entre la CBS reducida y el oxígeno. Considerando el valor del potencial redox determinado para la CBS, -291 mV y el reportado para la reducción del oxígeno por un electrón $E^\circ(\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-})$, de -160 mV (1 M O₂ estado estándar) (129), la formación del radical superóxido estaría favorecida termodinámicamente, más aún teniendo en cuenta que el superóxido dismuta rápidamente y su concentración será varios órdenes de magnitud menor que la del oxígeno, desplazando el equilibrio en el sentido de su formación.

Para el estudio de la formación de superóxido, se siguió en primera instancia la reducción del citocromo c o del NBT (203, 205, 223). Sin embargo, cuando la CBS previamente reducida con mínima cantidad de ditionito de sodio en condiciones anaeróbicas era

incubada con citocromo *c* o NBT, éstos se reducían antes de agregar el oxígeno. Pensando en que quizás podían haber quedado pequeñas trazas del reductor en el medio que pudieran estar interfiriendo, la CBS reducida fue gel filtrada bajo condiciones anaeróbicas antes de agregar el citocromo *c* o NBT, sin embargo el problema no pudo ser solucionado. Como alternativa se utilizó otra molécula, la epinefrina, que a diferencia de las anteriores puede ser oxidada por superóxido y genera como producto el adrenocromo que puede ser detectado espectrofotométricamente (205, 206). En este caso, cuando la Fe(II)CBS fue expuesta a una concentración en exceso de oxígeno, en presencia de epinefrina, dio lugar a la formación de adrenocromo, evidenciado en el espectro de absorción por la aparición de un máximo a 480 nm. Su formación fue inhibida en forma significativa en presencia de SOD, confirmando la generación del radical superóxido (Figura 27, panel A).

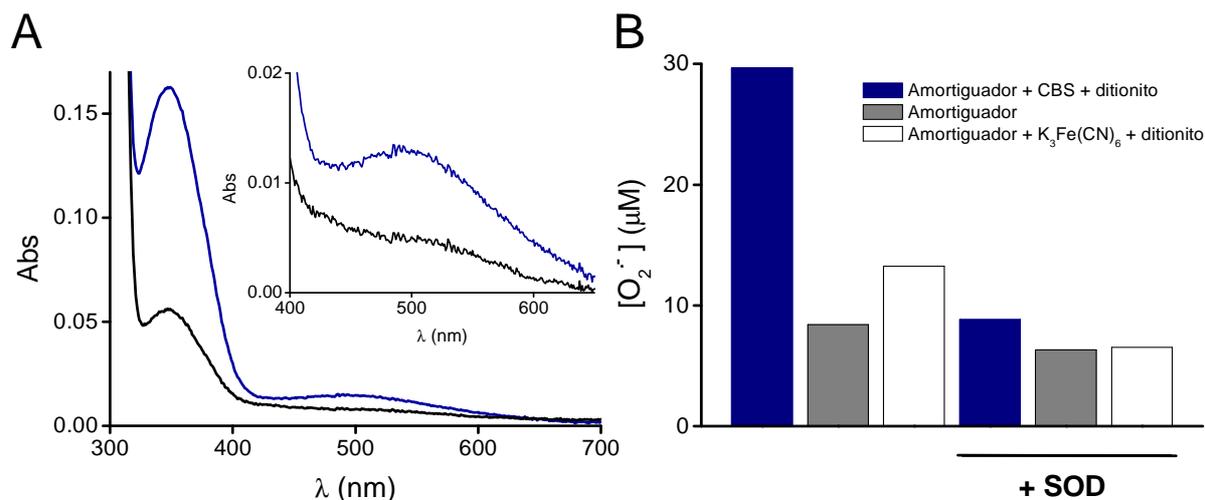


Figura 27. Detección del radical superóxido como producto de la reacción de Fe(II)CBS con oxígeno en presencia de epinefrina. (A) Una solución anaeróbica de CBS (25 μM) fue reducida previamente con ditionito de sodio (12.5 μM) y luego se mezcló con epinefrina (2 mM) y oxígeno (200 μM) en ausencia (línea azul) o en presencia de SOD (1.5 μM, línea negra). *Inserto:* Acercamiento de la región en el espectro de 400-650 nm. (B) La concentración de superóxido fue determinada a partir del adrenocromo a 480 nm junto al producto adrenocromo-sulfito a 350 nm. En los controles en ausencia de CBS se utilizó en su lugar ferricianuro (25 μM), que no forma superóxido. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que difieren en menos del 10 %.

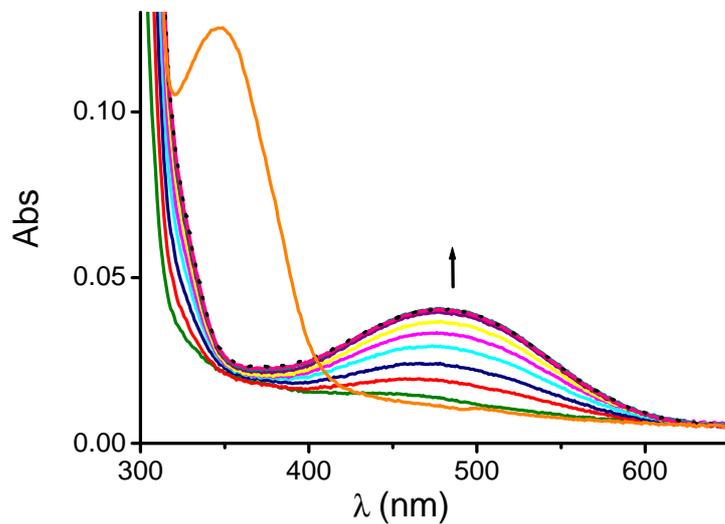


Figura 28. Oxidación de epinefrina por flujos de superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Se incubó epinefrina (0.2 mM) con xantina (50 μ M) y xantina oxidasa (3.5 mU/mL) y se registraron los espectros de absorción cada 1 min hasta los 10 min (formación de adrenocromo). Luego se agregó ditionito (22 μ M, línea anaranjada).

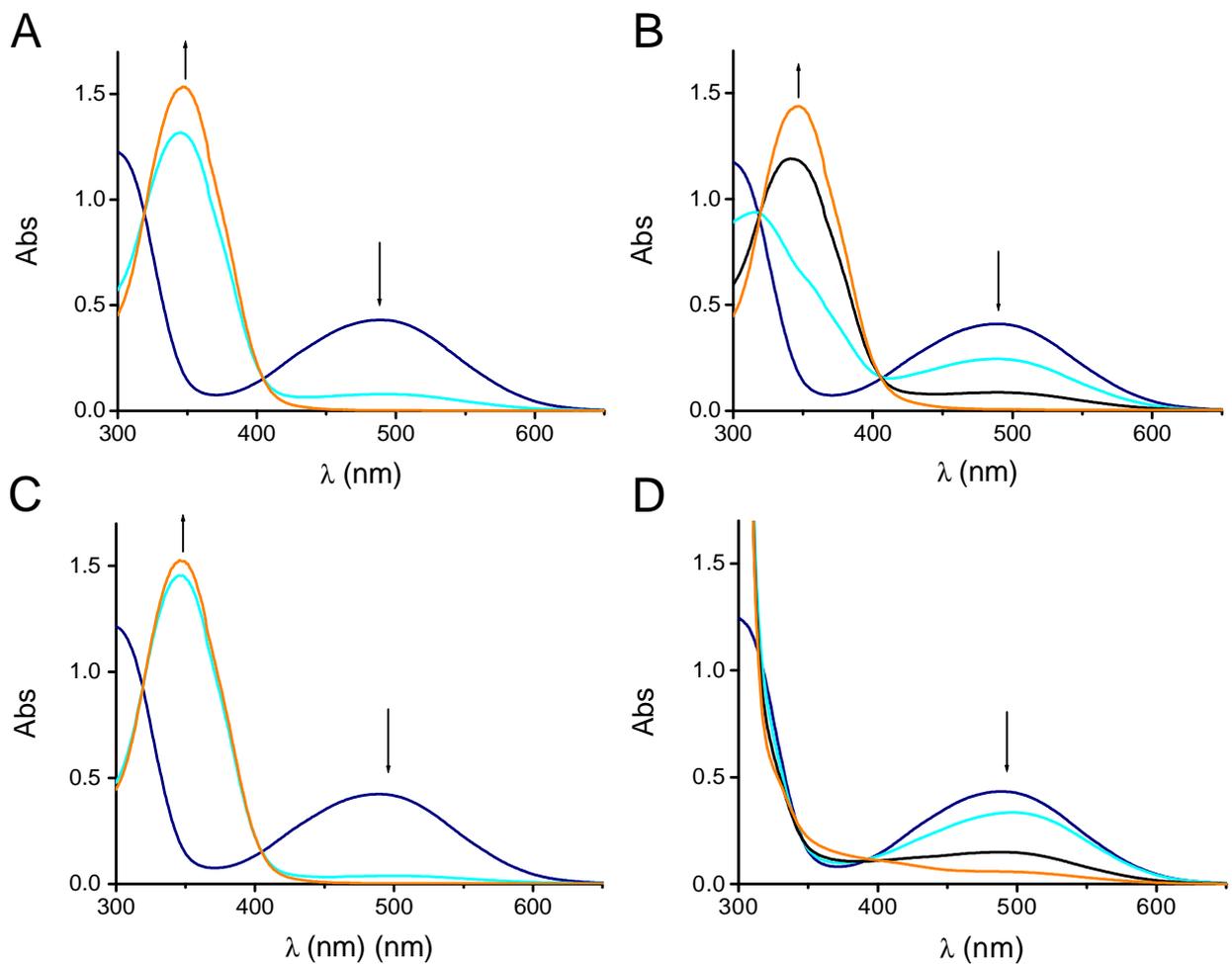


Figura 29. Efecto de agentes reductores en el adrenocromo. El adrenocromo fue inicialmente generado mediante la oxidación de epinefrina (0.2 mM) con ferricianuro (0.4 mM) (línea azul), seguido de la adición: (A) ditionito de sodio (25 y 50 μ M, líneas celeste y anaranjada, respectivamente); (B) sulfito de sodio (40, 80 y 120 μ M, líneas celeste, negra y anaranjada, respectivamente); (C) ditionito previamente descompuesto en amortiguador (25 y 50 μ M, líneas celeste y anaranjada, respectivamente); o (D) ácido ascórbico (20 mM, a tiempo inicial, 5 y 20 min, líneas celeste, negra y anaranjada, respectivamente).

Sin embargo, la cantidad de superóxido detectada no fue la esperada, de acuerdo a la concentración inicial de CBS utilizada en el ensayo. Además en el espectro se observó un pico adicional con un máximo de absorción centrado en ~350 nm, consistente con la formación de un derivado del adrenocromo. Fue así que encontramos reportes en la literatura que establecían que el adrenocromo puede reaccionar con reductores, como el ditionito y su producto de descomposición sulfito (SO_3^{2-}), dando lugar a la formación del producto adrenocromo-sulfito que absorbe a 350 nm (224, 225). Como control, confirmamos la formación de este derivado en ensayos en los cuales generamos previamente el adrenocromo, mediante la oxidación de epinefrina por ferricianuro o flujos de superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa, y luego lo incubamos con sulfito de sodio, ditionito y ditionito que fue previamente descompuesto en amortiguador (Figuras 28 y 29). Además a partir de estos experimentos se pudo determinar un valor del coeficiente de extinción para este derivado del adrenocromo, estimado como $14500 \pm 330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 350 nm.

Por otra parte, estudiamos la estequiometría de la oxidación de epinefrina por flujos de superóxido, comparando la velocidad de formación del adrenocromo respecto a la generación del citocromo reducido (Figura 30). Comparando con la relación molar de 1.0 para el citocromo reducido respecto al superóxido, en nuestras condiciones de reacción estimamos que se requieren 1.78 mol de superóxido para la formación de 1 mol de adrenocromo a partir de 1 mol de epinefrina a pH 8.6, lo cual es consistente con el valor reportado de 1.39 a pH 7.8 (206). Como control, también determinamos que en nuestras condiciones de reacción el peróxido de hidrógeno (1-40 mM) no oxidó la epinefrina.

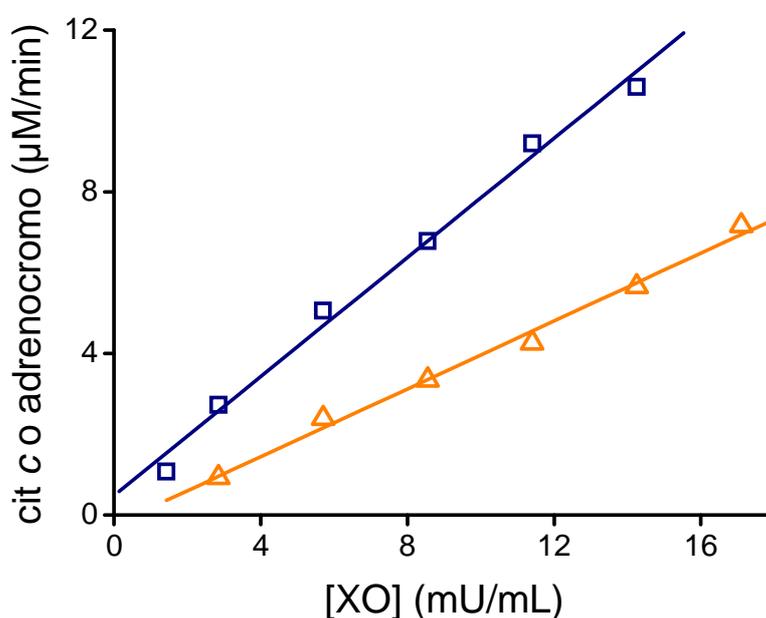


Figura 30. Oxidación de epinefrina a adrenocromo y reducción del citocromo c por flujos de superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Se incubó citocromo c (20 μM , cuadrados) o epinefrina (2 mM, triángulos) con xantina (50 μM) y concentraciones crecientes de xantina oxidasa en amortiguador Tris (0.1 M, pH 8.6, con EDTA 0.1 mM) a 25 °C. Las reacciones fueron monitoreadas espectrofotométricamente a 550 o 480 nm, respectivamente.

Por tanto, el rendimiento total en la generación del radical superóxido a partir de la CBS puede ser calculado a partir de los productos detectados a 480 y 350 nm, como la cantidad de adrenocromo formado directamente y aquella que derivó en la formación del derivado adrenocromo-sulfito, respectivamente (Figura 27, panel B). Dado que aunque en forma muy lenta la epinefrina puede sufrir autooxidación y generar adrenocromo, se incluyeron controles sin CBS, ambos en ausencia y en presencia de ditionito. Aunque el ensayo no permite determinar en forma cuantitativa la cantidad exacta de superóxido generado, podemos observar que en presencia de CBS la formación de superóxido fue aproximadamente 2 veces mayor respecto a las condiciones control, por lo que estos resultados confirman la generación de superóxido como producto de la reacción entre la Fe(II)CBS y el oxígeno.

Con el fin de detectar la posible formación de peróxido de hidrógeno, realizamos varios esfuerzos realizando los ensayos habituales basados en la reducción enzimática del peróxido de hidrógeno, utilizando la peroxidasa de rábano (HRP). En primer lugar tratamos de detectar directamente la formación de los compuestos I y II de la HRP mediante espectros UV-Vis de muestras de Fe(II)CBS (15 μM) previamente reducidas con ditionito, incubadas con HRP (20 μM) y oxígeno (200 μM), en ausencia o en presencia de SOD (1.25 μM). Sin embargo, no fue posible detectar los compuestos I y II, probablemente debido a la interferencia en el espectro de absorción de la CBS o por la posible reacción de trazas de ditionito o sus productos de descomposición con los compuestos. Como alternativa, tratamos de detectar el peróxido de hidrógeno monitoreando la oxidación del 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona 6 ácido sulfónico) (ABTS^{2-}) siguiendo el incremento en la absorbancia a 725 nm correspondiente a la formación de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ y de esta forma evitar la interferencia en la absorbancia por la banda de Soret del hemo de la CBS. En este caso tampoco fue posible detectar $\text{ABTS}^{\cdot-}$ y los controles realizados con peróxido de hidrógeno exógeno, nuevamente indicaron la interferencia debida al ditionito o sus productos de descomposición. Finalmente, exploramos una nueva opción basada en la formación del producto fluorescente (p-HPA)₂ a partir de la oxidación por peróxido de hidrógeno del para-hidroxifenilacético (p-HPA) en una reacción catalizada por la HRP. En la Figura 31 se muestra un experimento representativo en el que se detectó la formación de 2.9 μM de peróxido de hidrógeno, que fue completamente inhibido al agregar catalasa. Sin embargo, partiendo de Fe(II)CBS (10 μM), en presencia de SOD, se esperaba detectar 5 μM de peróxido de hidrógeno. Por otra parte, el control de autooxidación debido a las trazas de ditionito, dió cuenta de un 30 % del peróxido de hidrógeno formado. Por lo cual, al igual que para el caso con la epinefrina, aunque el ensayo con p-HPA confirmó cualitativamente la formación de peróxido de hidrógeno, no fue posible cuantificar su formación en forma exacta.

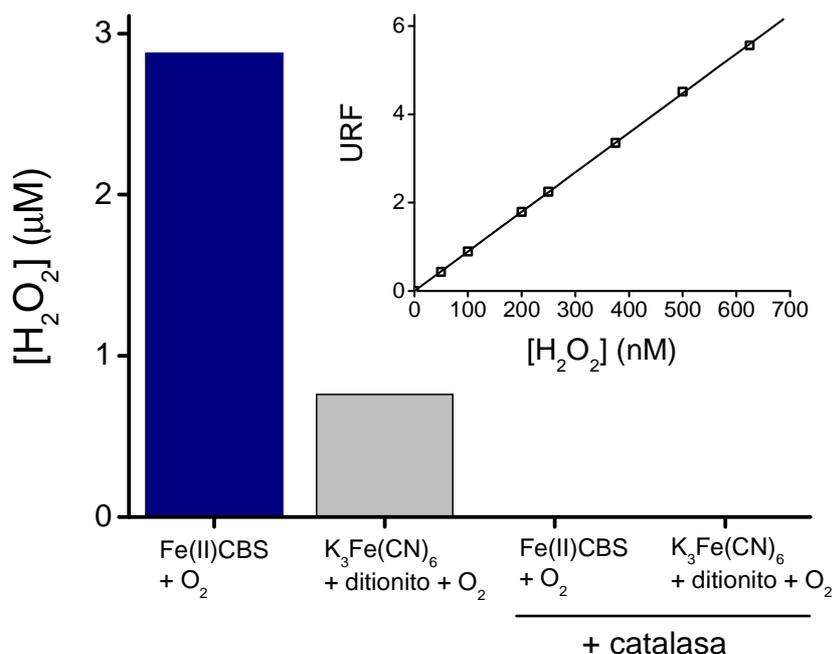


Figura 31. Detección de peróxido de hidrógeno como producto de la reacción de Fe(II)CBS con oxígeno en presencia de HRP y p-HPA. Una solución anaeróbica de Fe(II)CBS (10 μM) se mezcló con oxígeno (200 μM) y SOD (1.25 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) a 25 °C, en ausencia o en presencia de catalasa (50 nM). Alícuotas de reacción se mezclaron con p-HPA (1 mM) y HRP (10 nM) y luego de diluir las muestras en amortiguador pirofosfato (0.1 M, pH 10), se midió la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 323 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$). En los controles se utilizó ferricianuro (10 μM), que no forma superóxido. *Inserto:* curva de calibración. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que difieren en menos del 10 %.

5.2.3. Determinación de la constante de velocidad de reacción entre Fe(II)CO-CBS y oxígeno

Como se mencionó anteriormente, el hemo en el estado reducido es capaz de unir CO llevando a la formación de la especie Fe(II)CO-CBS e inactivando la enzima. Se observó que el Fe(II)CO una vez formado y expuesto al aire era capaz de reoxidarse rápidamente, con una recuperación de la actividad enzimática. A partir de allí surgió la inquietud de caracterizar la cinética de la reacción entre el Fe(II)CO y el oxígeno. Estos ensayos fueron efectuados en los laboratorios de la Dra. Ruma Banerjee y del Dr. David Ballou, en el marco de la pasantía realizada en la Universidad de Michigan.

Realizamos estudios de cinética rápida, mediante la utilización de un espectrofotómetro de flujo detenido. A su vez, para asegurar la anaerobiosis en las preparaciones de la enzima, se emplearon tonómetros. El diseño experimental consistió en primer lugar en reducir la CBS en condiciones anaerobias, mediante el agregado de sucesivas alícuotas de ditionito de sodio. Dado que este reductor en presencia de oxígeno puede generar radical superóxido, en estos ensayos y tal como fue planteado en el estudio de la cinética de reoxidación de Fe(II)CBS por el oxígeno, se cuidó de no agregar ditionito en exceso y los ensayos se realizaron en presencia de SOD. La titulación con ditionito fue efectuada en el tonómetro especialmente acondicionado con una jeringa "gastight", así como con un brazo de vidrio con una celda espectrofotométrica incorporada en el extremo, lo cual

permitió realizar espectros UV-VIS para controlar la reducción de la CBS. Una vez reducida completamente, la enzima fue saturada con CO, mediante sucesivos ciclos de vacío y burbujeo con CO. Posteriormente y previo a conectar el tonómetro a una jeringa del espectrofotómetro de flujo detenido, se registraron como control espectros para asegurar la formación del Fe(II)CO, comprobado por la aparición del máximo característico de absorción a 420 nm (Figura 32).

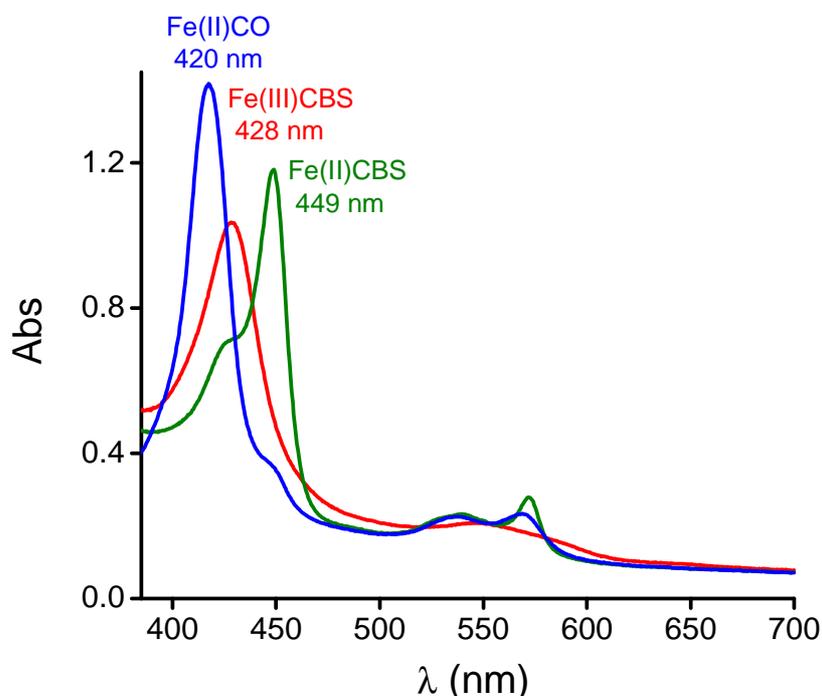


Figura 32. Espectro UV-Vis durante la preparación de Fe(II)CO. Una solución anaeróbica de Fe(III)CBS (10 μ M) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM), fue titulada con ditionito de sodio para obtener la forma reducida Fe(II)CBS, y luego se saturó con CO durante 20 min, dando lugar a la formación de la especie Fe(II)CO.

A continuación, una vez obtenida la especie Fe(II)CO, se conectó el tonómetro a una jeringa del espectrofotómetro de flujo detenido, mientras en la otra se colocaron concentraciones crecientes y en exceso de oxígeno, para tener condiciones de pseudo-primer orden. Las concentraciones de oxígeno fueron obtenidas burbujando agua destilada con oxígeno proveniente de tanques conteniendo diferentes porcentajes de oxígeno y nitrógeno. Luego de cada disparo, se registraron los espectros UV-Vis en modo cinético, variando el tiempo de adquisición desde pocos segundos hasta 1425 s para cada concentración de oxígeno. En la Figura 33 se muestra un registro típico en el que se observa una disminución tiempo-dependiente del máximo correspondiente al Fe(II)CO a 420 nm y su corrimiento hacia a la forma oxidada de la enzima con un máximo de Soret a 428 nm. A su vez, hay un desplazamiento de las bandas α y β con picos a 571 y 540 nm, respectivamente, en la forma Fe(II)CO hacia el hombro centrado en \sim 550 nm característico de la forma Fe(III)CBS.

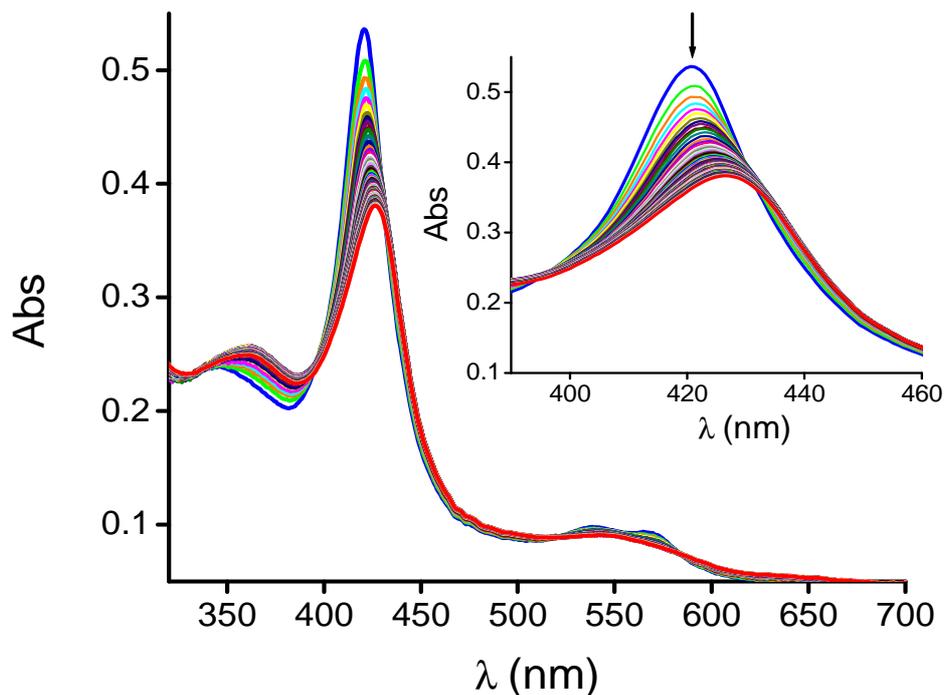


Figura 33. Oxidación de Fe(II)CO por el oxígeno. Espectro UV-Vis luego de mezclar Fe(II)CO (5 μ M, 500 μ M CO) con O₂ (0.625 mM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, con DTPA 0.1 mM) a 25 °C. Las determinaciones se realizaron en presencia de SOD (0.5 μ M monómero). Los espectros fueron registrados hasta 1425 s. La flechas indican la dirección del cambio de absorbancia en el tiempo.

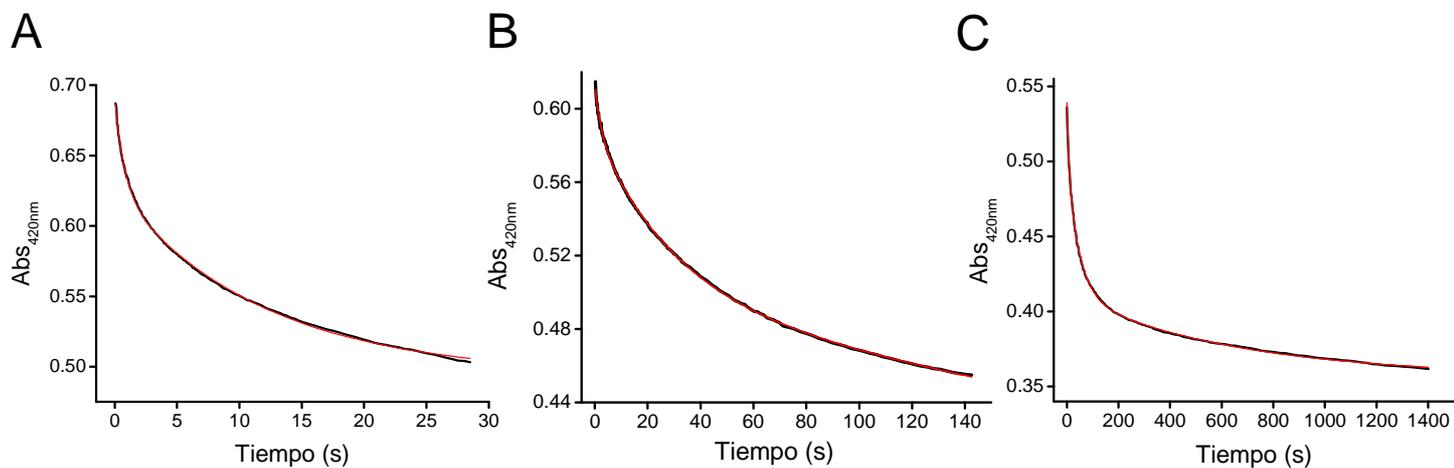


Figura 34. Trazos cinéticos de la reacción entre Fe(II)CO y oxígeno. Registro de la absorbancia a 420 nm a diferentes tiempos: (A) 28 s, (B) 142 seg y (C) 1425 s. Datos obtenidos a partir de los espectros adquiridos en el tiempo tal como se indica en la leyenda de la Figura 33. Las líneas rojas representan el ajuste a la función doble exponencial (A y C) y doble exponencial más recta (B).

Para determinar la constante de velocidad de la reacción se realizó un análisis preliminar con el software del espectrofotómetro de flujo detenido en Michigan, a partir del cual se determinó la existencia de más de una fase en la reacción de oxidación del Fe(II)CO. Al regreso de la pasantía se hizo un análisis exhaustivo de los datos utilizando el programa informático ProK de Applied Photophysics, para lo cual hubo que transformar la matriz de

datos. La ventaja de utilizar este programa radica en que permite realizar un análisis cinético global, a todas las longitudes de onda. También se realizaron ajustes de los diferentes datos a la longitud de onda de 420 nm con el programa Origin. La presencia de múltiples fases repercutió en que se obtuvieron diferentes constantes exponenciales para las diferentes ventanas temporales (Figura 34). Se destacó una constante observada de pseudo-primero orden k_{obs} , del orden de 10^{-2} que presentaba una amplitud importante, aproximadamente 3 veces mayor que la de la fase rápida previa, y nos enfocamos en ella. Para esta fase, se determinó una buena concordancia entre los valores de k_{obs} obtenida a partir del análisis global y los obtenidos a partir del ajuste a una función doble exponencial más recta. La dependencia de k_{obs} con la concentración de oxígeno fue hiperbólica (Figura 35). A partir del ajuste global de los diferentes experimentos obtenidos a 142 y 285 s, se obtuvo una k_{obs} máxima de aproximadamente $(0.033 \pm 0.013) \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C . A su vez, la concentración de oxígeno a la mitad de la k_{obs} máxima fue de 0.10 mM. Esto sugiere un mecanismo de reacción diferente al de esfera externa determinado para la reoxidación de Fe(II)CBS con el oxígeno. Por su parte, la presencia de múltiples fases puede ser atribuida a la coexistencia de más de una subpoblación de especies, es decir además de la forma Fe(II)CO mayoritaria, no podemos descartar la presencia de Fe(II)CBS remanente que no unió el CO o de la especie Fe(II)424, cuya formación a partir de la especie reducida ha sido reportada bajo ciertas condiciones y se desconoce cuál sería su reactividad con el CO y con el oxígeno. Como se observa en la Figura 34, panel C, el cambio de absorbancia a 420 nm se prolongaba hasta los 1425 s, pero el análisis cinético se realizó hasta los 285 s, por posibles interferencias a tiempos largos.

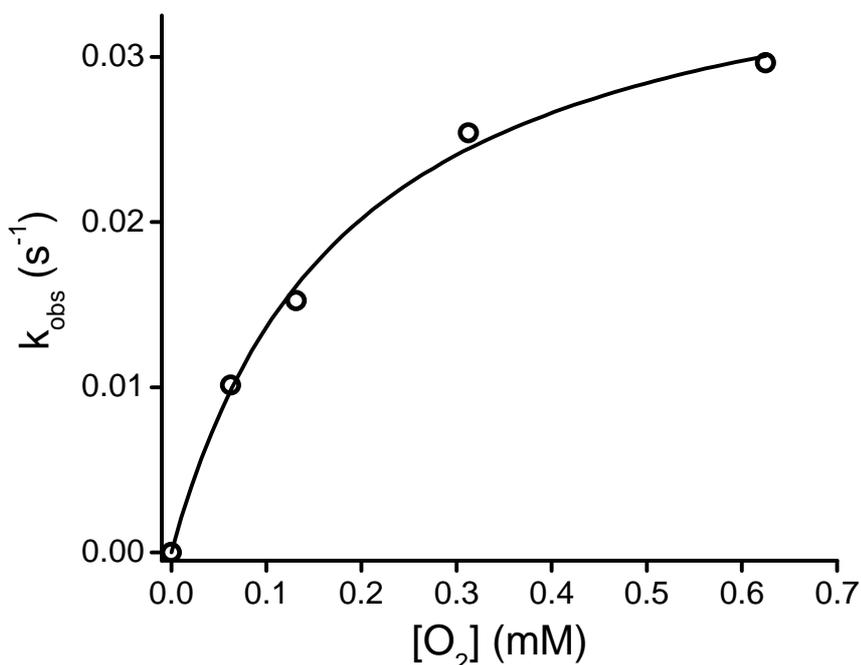


Figura 35. Constante de velocidad entre Fe(II)CO y oxígeno. Se mezcló una solución anaeróbica de Fe(II)CO ($5 \mu\text{M}$) con concentraciones crecientes de oxígeno, tal como se indica en la leyenda de la Figura 33. Las k_{obs} (s^{-1}) fueron determinadas a partir del ajuste global hasta los 142 s, para cada concentración de oxígeno. Los resultados se representan como el promedio de dos experimentos independientes.

5.2.4. Discusión

En esta sección del trabajo hemos caracterizado el potencial redox del grupo hemo en la CBS. Mediante titulación potenciométrica, en presencia de mediadores, se determinó un valor de potencial de reducción para el hemo de -291 ± 5 mV a pH 7.2, en el rango del potencial reportado para otras hemoproteínas que también presentan un tiolato como ligando. Además, mediante espectrofotometría de flujo detenido se caracterizó la cinética de reacción de la CBS reducida y el oxígeno, determinando para esta reacción de reoxidación una constante de velocidad de $(1.11 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C. La ausencia detectable de formación de especies intermediarias verificada en los espectros de absorción registrados en el tiempo, junto al hecho de obtener una cinética lineal en lugar de un comportamiento de saturación, sugieren para la reacción un mecanismo de esfera externa. De hecho, la disociación del ligando cisteína del hemo de la CBS se ha reportado que ocurre con una constante de velocidad de primer orden de 0.0166 s^{-1} (80), lo cual es muy lento para dar cuenta de la reacción con el oxígeno que ocurre con constantes de pseudo-primer orden de 20-80 s^{-1} . Aunque en general para las hemoproteínas que sufren procesos de autooxidación se ha propuesto que el mecanismo involucra la unión del oxígeno al centro metálico (226), hay ciertos sistemas para los cuales se han reportado mecanismos de esfera externa (227, 228). Un dato curioso que encontramos en la literatura es que el hemo del citocromo b_{558} , componente de la NADPH oxidasa de fagocitos encargada de formar superóxido mostró, al reaccionar con el oxígeno, propiedades cinéticas muy similares a las observadas para la CBS, con una constante de velocidad de $9.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (229).

La reacción de reoxidación del hemo en la CBS dio lugar a la formación de radical anión superóxido, detectado mediante la oxidación de epinefrina y confirmado por su inhibición con superóxido dismutasa. De acuerdo a su relativamente elevado potencial de reducción $E^\circ(\text{O}_2^{\cdot-}, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2) = +940$ mV (130), el radical superóxido podría también reoxidar la Fe(II)CBS. En este sentido, mediante simulaciones cinéticas pudimos estimar para esta reacción una constante de velocidad de $2\text{-}10 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, esta reacción no sería significativa puesto que *in vivo*, el superóxido tiene entre sus destinos principales la dismutación a peróxido de hidrógeno y oxígeno, en una reacción que procede de forma espontánea o catalizada por la SOD ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (128)), así como la reacción con óxido nítrico que conduce a la formación de peroxinitrito ($1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (161)).

El valor del potencial de reducción estimado indica que la CBS podría estar en estado reducido *in vivo*, lo cual tendría implicancias muy relevantes a la hora de especular en sus posibles funciones a nivel celular. Por un lado, el rol propuesto como sensor precisa del hemo reducido, estado en el cual es menos estable y pierde la coordinación con la cisteína, por ejemplo cuando una moléculas gasotransmisoras como el CO o el NO. En segundo lugar, una vez reducido el hemo podría reaccionar rápidamente con el oxígeno, constituyendo una nueva fuente de generación de superóxido a nivel celular en el compartimento citosólico y posiblemente en el núcleo. El superóxido y sus productos, como el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito, no solo pueden contribuir al daño oxidativo sino que además son capaces de iniciar mecanismos señalizadores.

5.3. Estudio de la reducción del hemo de la CBS por sistemas biológicos

Como planteamos, la dilucidación de si el hemo puede ser reducido *in vivo* por sistemas biológicos, tendría implicancias muy relevantes y se torna de fundamental importancia para poder asignarle un rol en la enzima. El valor de potencial de reducción determinado, aunque bajo, lo cual refleja la estabilidad del estado férrico, podría de todas formas permitir su reducción. Además el hemo está particularmente expuesto en la estructura proteica por lo que estaría fácilmente accesible a posible reductores celulares. Algunos candidatos que, de acuerdo a su potencial conseguirían catalizar esta reducción pueden ser flavoproteínas, en presencia de nucleótidos de piridina y flavina como dadores de electrones. Ciertas flavoproteínas como la citocromo P450 reductasa microsomal (-365 mV y -270 mV para los dominios FAD y FMN, respectivamente) (230), o la NADH:quinona oxidorreductasa mitocondrial (-414 mV para la reducción de flavosemiquinona a hidroquinona) (231), de acuerdo a su potencial podrían dar cuenta de la reducción del hemo de la CBS, sin embargo se debe tener en cuenta que se localizan en compartimentos celulares diferentes a la CBS. En cambio, hay otras flavoproteínas localizadas en el citosol que pueden resultar buenos candidatos, por ejemplo la metionina sintasa reductasa (potencial de reducción de la semiquinona a hidroquinona de -291 mV y -227 mV para los dominios FAD y FMN, respectivamente (232)), la oxidorreductasa NR1 (-365 mV y -305 mV (196)), la nNOS (-347 y -239 mV (2)), o la xantina deshidrogenasa (-340 mV (233)).

Poder determinar la reducción del hemo de la CBS en forma directa en líneas celulares o tejidos es muy dificultoso principalmente por la baja concentración en la que se encuentra la enzima y dada la presencia de otros componentes o contaminantes que pueden interferir, a lo que se suma el hecho que puede haber reacción con el oxígeno y de esta forma afectar las medidas. Por tanto la estrategia experimental consistió en exponer la CBS purificada a diferentes sistemas reductores, en presencia de nucleótidos de piridina y flavina, en condiciones anaeróbicas, monitoreando la reducción del hemo por sus cambios en los espectros de absorción. Como sistemas reductores se emplearon: a) extractos de hígado de rata, órgano en el cual se encuentra la CBS, utilizando diferentes fracciones subcelulares, en particular la citosólica; y b) enzimas purificadas como la xantina oxidasa/deshidrogenasa, la metionina sintasa reductasa y la oxidorreductasa NR1.

5.3.1. Exposición de CBS a fracciones subcelulares

En una primera aproximación se monitoreó directamente el espectro de absorción de un cultivo de *E. coli* que sobreexpresó la variante trunca dimérica de la CBS recombinante humana. Como se observa en la Figura 36, luego de inducir la expresión de la enzima en el cultivo de células bacterianas se observa la presencia de un máximo de absorción a 428 nm, indicativo de la presencia de la CBS en estado oxidado. Sin embargo, no se obtuvo evidencia de la presencia de la forma reducida de la enzima a 449 nm.

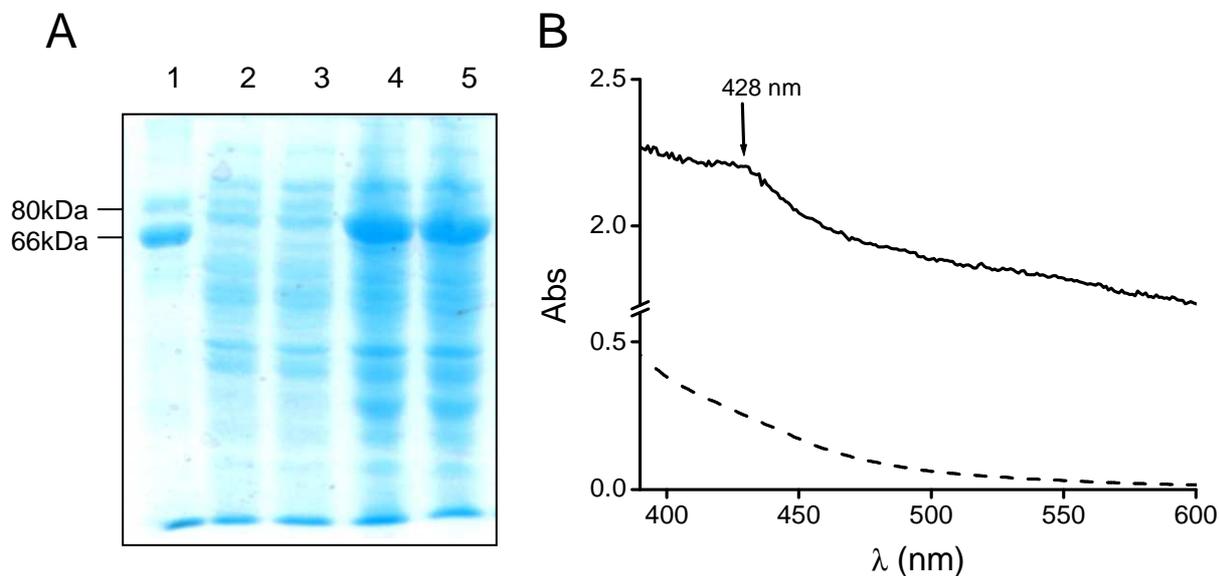


Figura 36. Expresión y espectro UV-Vis de la CBS recombinante humana en cultivo bacteriano. (A) La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* conteniendo el plásmido de expresión pGEX4T1/hCBS Δ 143 se cultivó en LB con ampicilina (50 μ g/mL) a 37 $^{\circ}$ C. Cuando la Abs_{600nm} llegó a 0.6 (carriles 2 y 3) se indujo la expresión con IPTG (0.2 mM), en presencia de ácido δ -aminolevulínico (75 mg/L), manteniéndose el cultivo por 25 horas a 25 $^{\circ}$ C (carriles 4 y 5). Las células se resuspendieron en buffer de muestra con SDS y β -mercaptoetanol y se sembraron en gel SDS-PAGE. Los marcadores de peso molecular (carril 1) corresponden a glucosa oxidasa (80 kDa) y albúmina bovina (66 kDa). (B) Espectro UV-Vis del LB (línea punteada) y del cultivo celular dil 1:2 (línea continua) luego de la sobreexpresión.

Una segunda aproximación para explorar la reducción biológica, consistió en exponer la CBS purificada a fracciones subcelulares, particularmente las fracciones citosólica y microsomal, donde se espera que algunas flavoproteínas puedan ser capaces de efectuar la reducción del hemo *in vivo*. Estas fracciones fueron obtenidas por técnicas usuales de centrifugación diferencial a partir de un extracto de hígado de rata. El procedimiento consistió en incubar la CBS con nucleótidos de piridina y agregar alícuotas de las fracciones subcelulares, en condiciones anaerobias, registrando los espectros de absorción en el tiempo.

Como resultado, no se observó la aparición de un máximo de absorción a 449 nm, que indicara la reducción del hemo (Figura 37). El ensayo fue también realizado agregando flavinas (FAD y FMN), obteniendo el mismo resultado negativo. Como control, se muestra que la CBS pudo ser reducida con el agregado de ditionito de sodio. A su vez, tomando ventaja que el hemo reducido de la CBS, a diferencia del oxidado, puede reaccionar con cianuro, formando un complejo característico que absorbe a 435 nm (76), también realizamos ensayos en los que se agregó cianuro de potasio, pero en este caso tampoco se observaron cambios en el espectro de absorción (Figura 38).

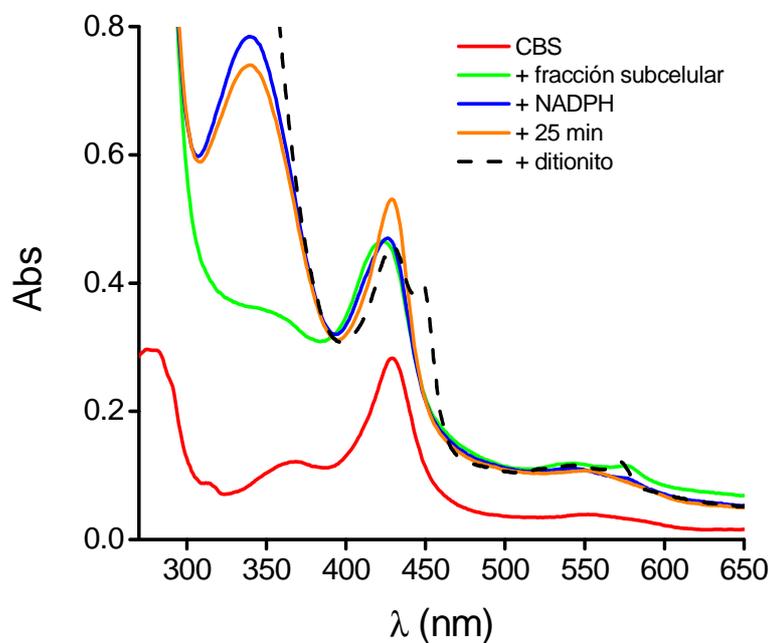


Figura 37. Ensayo para determinar la reducción de CBS por una fracción citosólica de hígado de rata. Espectros UV-Vis luego de incubar CBS (5 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con alícuotas de una fracción subcelular (citosólica y microsomal) (0.6 mg/mL) en presencia de NADPH (100 μM). Las condiciones anaeróbicas fueron obtenidas por burbujeo con argón y las trazas remanentes de oxígeno fueron removidas utilizando el sistema de glucosa (100 mM), glucosa oxidasa (8 U/mL) y catalasa (260 U/mL). Como control, la CBS fue reducida en forma química con el agregado de ditionito de sodio.

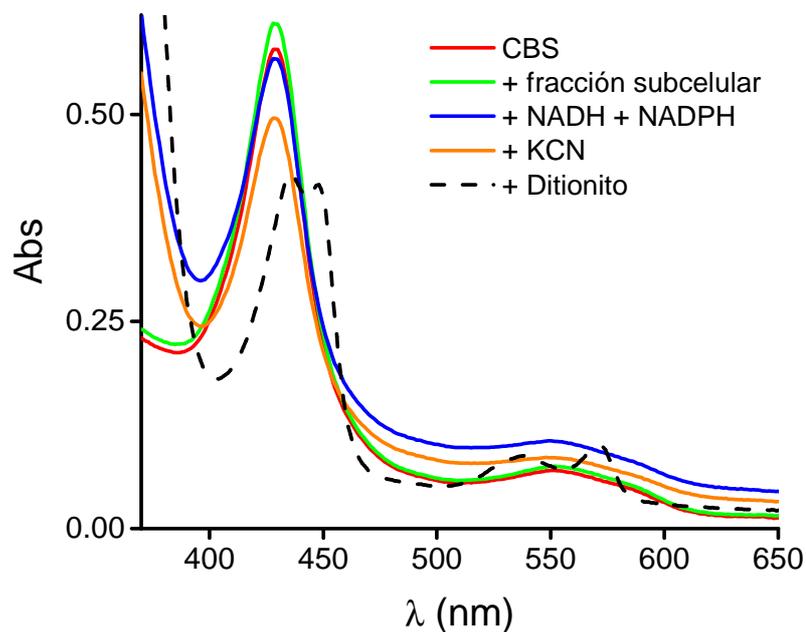


Figura 38. Ensayo para determinar la reducción de CBS por una fracción citosólica en presencia de KCN. Se incubó CBS (10 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con alícuotas de una fracción subcelular citosólica (0.13 mg/mL) en presencia de NADH y NADPH (100 μM). Se agregó KCN (20 mM). Las condiciones anaeróbicas fueron obtenidas como en la Figura 37. Como control, la CBS fue reducida en forma química con el agregado de ditionito de sodio.

Dada la rápida reacción del hemo reducido con el oxígeno, como alternativa se realizaron experimentos en los que se siguió el consumo de oxígeno con un electrodo Clark de las fracciones subcelulares en presencia de NAD(P)H. La hipótesis era que la CBS, si se reducía con los extractos celulares, podría reoxidarse con oxígeno llevando a un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno, pero en los ensayos no se evidenció un aumento apreciable en el consumo luego de agregar la CBS (Figura 39).

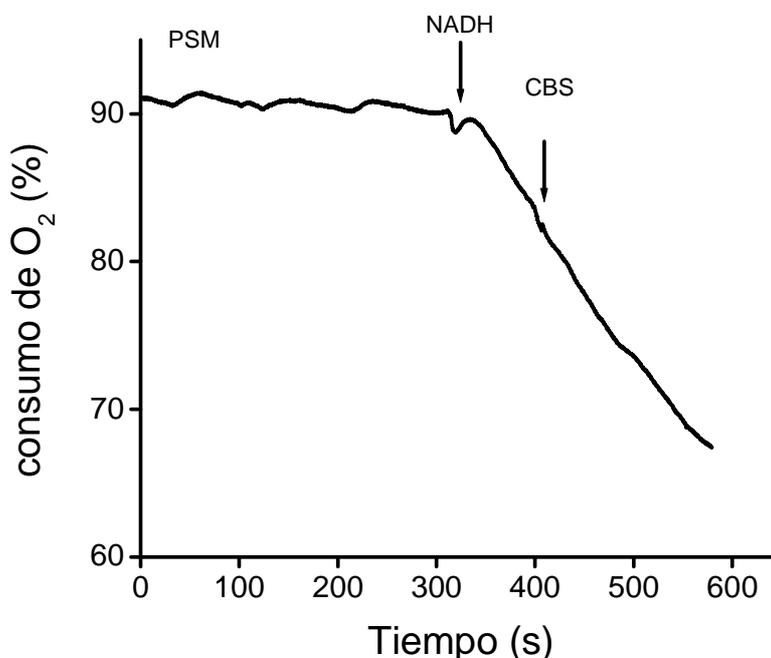


Figura 39. Consumo de oxígeno. A una solución de partículas submitocondriales (PSM, 0.05 mg/mL) en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.4, 0.2 mM DTPA) se agregó NADH (200 μ M). El consumo de oxígeno no aumentó con la adición de CBS (10 μ M). El experimento fue realizado con la adición de succinato (5 mM), así como con el extracto citosólico de hígado de rata (0.13 mg/mL), sin observar cambios en el consumo de oxígeno.

En su conjunto, estos resultados no mostraron evidencia de la posible reducción del hemo por sistemas biológicos. Sin embargo el hecho de no haber detectado la forma reducida de la CBS en los ensayos *in vitro* tampoco permite descartar que la misma pueda ocurrir. Por ejemplo, aunque se utilizaron sistemas anaerobios y se efectuaron varios controles para asegurar la ausencia de oxígeno, la presencia de alguna traza remanente puede haber perjudicado las medidas, otro factor puede haber sido el hecho que en los ensayos utilizamos la enzima recombinante humana y las fracciones subcelulares fueron aisladas a partir de tejido hepático de rata. Por tanto, pensamos que el siguiente paso implicaría la utilización de sistemas homólogos, o la utilización de otro sistema reductor, por ejemplo, en lugar de fracciones subcelulares, exponer directamente la CBS a flavoproteínas.

5.3.2. Exposición de CBS a flavoproteínas

A continuación analizamos la posible reducción del hemo al exponer la CBS a flavoproteínas citosólicas purificadas, que de acuerdo a su potencial de reducción podrían dar cuenta de su reducción *in vivo*. Los estudios en los que se utilizó metionina sintasa reductasa y oxidorreductasa NR1, fueron realizados en el marco de una pasantía de investigación en el laboratorio de la Dra. Ruma Banerjee del Departamento de Química Biológica, Universidad de Michigan. Cabe destacar que este laboratorio cuenta con cámaras y accesorios para el trabajo en anaerobiosis, así como tanques de monóxido de carbono escasos en nuestro medio.

Exposición a xantina oxidasa

En primer lugar utilizamos la enzima xantina oxidasa, purificada en nuestro laboratorio. Esta enzima participa en las fases finales del catabolismo de las purinas en mamíferos, catalizando la oxidación de la hipoxantina y xantina a ácido úrico, al mismo tiempo que reduce el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y radical anión superóxido. La xantina oxidasa contiene tres centros redox como grupos prostéticos: molibdeno, hierro-azufre y una flavina. El ensayo consistió en incubar en condiciones anaerobias la CBS con xantina oxidasa, en presencia de sus sustratos, xantina e hipoxantina, registrando los espectros de absorción en el tiempo. El resultado indicó que en estas condiciones de reacción no se observaron cambios apreciables en los espectros que evidenciaran la reducción del hemo en la CBS, aún repitiendo el ensayo variando la relación de concentraciones.

Exposición a metionina sintasa reductasa

A continuación, utilizamos la enzima metionina sintasa reductasa (MSR), una flavoproteína oxidorreductasa que como se señaló en la introducción, está involucrada en la activación reductiva de la metionina sintasa. La MSR es una proteína monomérica soluble de 78 kDa que presenta un dominio FAD y otro FMN, característicos de los miembros de la familia de diflavinas oxidorreductasas, que incluyen por ejemplo la citocromo P450 reductasa, las óxido nítrico sintasas y la oxidorreductasa NR1 (234). La transferencia de electrones en estas reductasas sigue la siguiente secuencia: NADPH → FAD → FMN. En el caso de la MSR, el FAD y el FMN transfieren equivalentes de reducción secuencialmente desde el dador de dos electrones, NADPH al aceptor de un electrón cob(II)alamina, cofactor de la metionina sintasa que se oxida ocasionalmente durante el ciclo catalítico (14).

La MSR se obtiene a partir de un sistema de expresión que produce una proteína de fusión con el dominio glutatión S-transferasa y se purifica siguiendo un procedimiento similar que para la CBS. Antes de utilizar la MSR en los distintos ensayos, caracterizamos el preparado enzimático obtenido. El espectro de absorción de la MSR oxidada presenta el comportamiento típico de una flavoproteína, con máximos de absorción a 380 nm y 454 nm, con un hombro a 480 nm. La reducción al agregar NADPH en condiciones aeróbicas, resulta en la disminución de la absorbancia a 450 nm y la aparición de un hombro pequeño en el entorno de 585 nm y 640 nm, consistente con la formación de una semiquinona estable (Figura 40, panel A). De acuerdo a la relación Abs_{280}/Abs_{454} , el contenido de flavinas fue similar al reportado (14), al igual que su actividad específica, que fue determinada mediante un ensayo de reducción de citocromo c NADPH-dependiente (Figura 40, panel B).

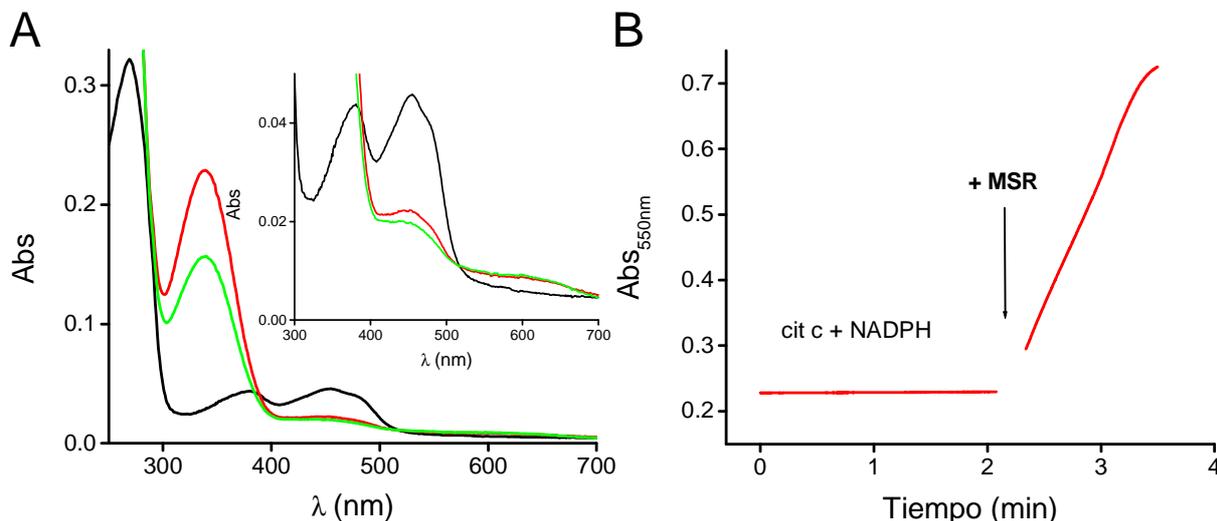


Figura 40. Caracterización de MSR purificada. (A) Espectro UV-Vis de la MSR (1.5 μM) en amortiguador Tris 50 mM, pH 7.6. La CBS oxidada (línea negra) fue reducida con el agregado de NADPH (50 μM) y se registraron espectros cada 2 min (líneas verde y roja). (B) Ensayo de actividad siguiendo la reducción de citocromo c (36 μM) en presencia de NADPH (100 μM) en amortiguador Tris 50 mM, pH 7.6. la reacción dió comienzo con el agregado de MSR (55 nM) y fue monitoreada por la reducción del citocromo c, siguiendo el cambio de absorbancia a 550 nm. Se obtuvo un valor de 4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, en el orden de los valores usuales de la literatura.

La estrategia experimental consistió en exponer en condiciones anaerobias la Fe(III)CBS con MSR previamente reducida con NADPH y registrar los espectros UV-Vis. No se observaron cambios en los máximos de absorción correspondientes a la CBS que indicaran su reducción. El ensayo fue repetido en varias oportunidades, variando las concentraciones de MSR o de CBS y en ningún caso se evidenció directamente la reducción del hemo. Como alternativa, mediante la utilización de CO tratamos de incrementar las chances de poder detectar la CBS reducida a través del producto Fe(II)CO que tiene un máximo de absorbancia característico a ~ 420 nm. Estos ensayos fueron realizados en una cámara anaerobia que cuenta en su interior con un espectrofotómetro común y otro de flujo detenido. El procedimiento consistió en reducir la MSR agregando NADPH (verificando su reducción mediante espectros de absorción), luego se agrega Fe(III)CBS, y se transfiere la celda (sellada con un septo de goma para mantener la anaerobiosis) de la cámara anaerobia al tanque de CO donde es burbujeadada durante 10-15 min hasta saturar la solución. Posteriormente se registraron los espectros de absorción en el tiempo. El resultado muestra un desplazamiento tiempo-dependiente en el máximo de la CBS oxidada (428 nm) hacia un nuevo pico cercano a 420 nm, indicando la formación del producto con CO (Figura 41). Esto sugiere que la CBS fue reducida por la MSR en presencia de NADPH y que luego unió el CO. Sin embargo, resulta interesante y a la vez intrigante el hecho que en los espectros no se observe la especie reducida a 449 nm, dado que de acuerdo a datos reportados, para formar el Fe(II)CO, el CO se une a la Fe(II)CBS previo desplazamiento del ligando tiolato, que ocurre de forma muy lenta con una constante reportada de primer orden de 0.0166 s^{-1} (80).

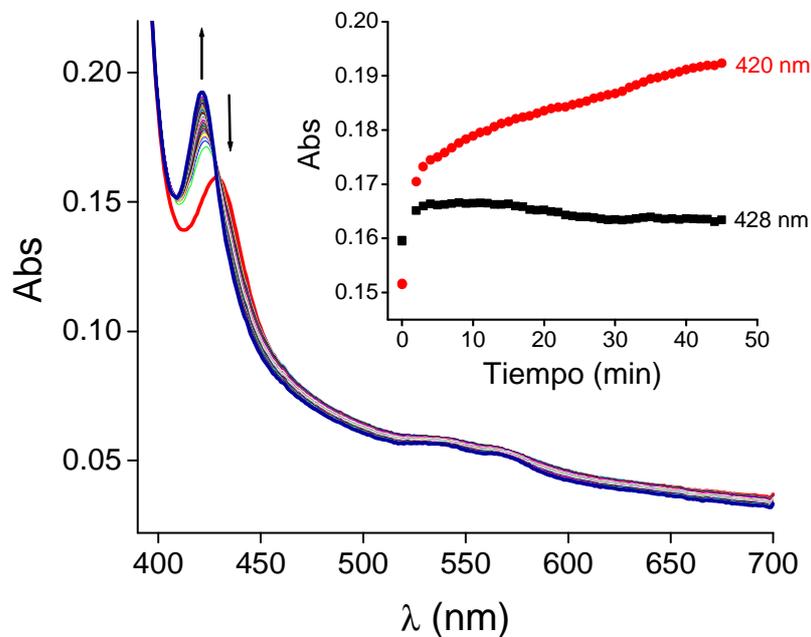


Figura 41. Estudio de la reducción de CBS por MSR en presencia de CO. Se agregó Fe(III)CBS ($1 \mu\text{M}$) a una solución de MSR ($4 \mu\text{M}$) previamente reducida con NADPH (1 mM) en condiciones anaerobias. Luego se saturó la solución con CO (1 mM) y se inició el registro de los espectros tomados hasta 60 min.

Como control, cuando el ensayo se realizó en las mismas condiciones pero en ausencia de CO, no se observaron cambios en el máximo de absorbancia de la enzima. Por otra parte cuando la CBS fue reducida con ditionito y luego se expuso a CO, se formó el Fe(II)CO, confirmando que el máximo de absorción coincide con el observado a 420 nm (Figura 42). Otro aspecto tenido en cuenta en el diseño experimental fue la potencial interferencia en la absorbancia de las flavinas de la MSR, con máximos a 380 nm y en particular en el entorno de 450 a 480 nm (Figura 40), dado que presentan coeficientes de absorptividad del orden de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por tanto, aunque luego de la reducción por NADPH, el máximo a 450 nm de la flavina disminuye, se realizaron los controles correspondientes en ausencia de CBS.

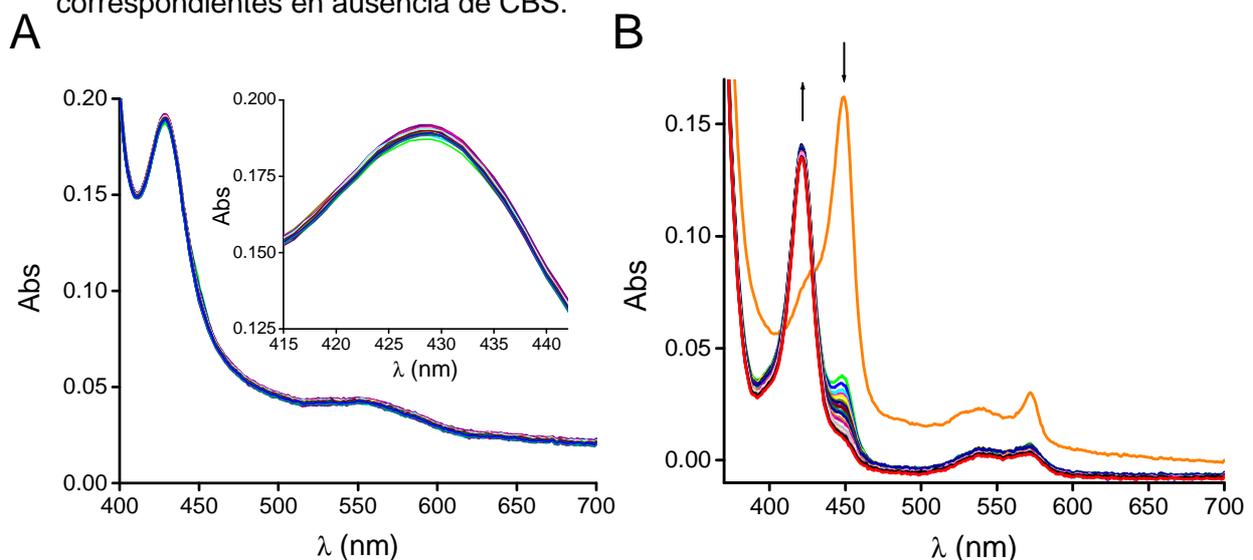


Figura 42. Experimentos control. (A) Se incubó Fe(III)CBS ($1 \mu\text{M}$) con MSR ($2 \mu\text{M}$) en presencia de NADPH (1 mM), en ausencia de CO y se registraron los espectros de absorción, donde no se observan cambios en el máximo correspondiente a la enzima oxidada a 428 nm . (B) Una solución de Fe(III)CBS ($1 \mu\text{M}$) fue reducida con ditionito de sodio y luego se saturó con CO, registrando los espectros en el tiempo. Se observa la disminución de la absorbancia a 449 nm , correspondiente a la forma reducida de la CBS y la formación del producto Fe(II)CO que absorbe a 420 nm .

Analizando los espectros, el curso temporal parece indicar la existencia de dos fases en el aumento de la absorbancia a 420 nm, una rápida cuya duración es de pocos minutos y otra más lenta de incremento sostenido en el tiempo. Este comportamiento coincide con datos reportados acerca de la dinámica de unión del CO estudiada por espectrofotometría de flujo detenido, en los que la cinética de reacción se ajustó a dos funciones exponenciales sucesivas, con una fase rápida con mayor amplitud que la fase lenta (80). Cuando los ensayos se realizaron variando la relación de concentraciones de CBS:MSR, dejando fija la concentración de CBS (1 μM) y aumentando la de MSR (2 o 4 μM) y manteniendo el NADPH y CO en concentraciones en exceso y saturantes, se observó un incremento en la velocidad de la fase inicial más rápida, de forma concentración-dependiente.

En la reducción de la CBS por la MSR podrían estar involucradas interacciones proteína-proteína, tal como sucede por ejemplo en la reacción de reactivación de la metionina sintasa catalizada por la MSR (14). Para analizar este punto se determinó el efecto de la fuerza iónica en la reacción. Sorprendentemente la velocidad de formación de Fe(II)CO en los primeros 10 min mostró una dependencia con la fuerza iónica, obteniendo un perfil en forma de campana con un máximo cercano a los ~200-300 mM de fuerza iónica (Figura 43). Por tanto, la interacción de la MSR con la CBS parece involucrar interacciones de carga, posiblemente entre grupos de carga negativa en la reductasa y de carga positiva en la CBS, dado el entorno electropositivo en el que se encuentra inmerso el hemo en la estructura proteica.

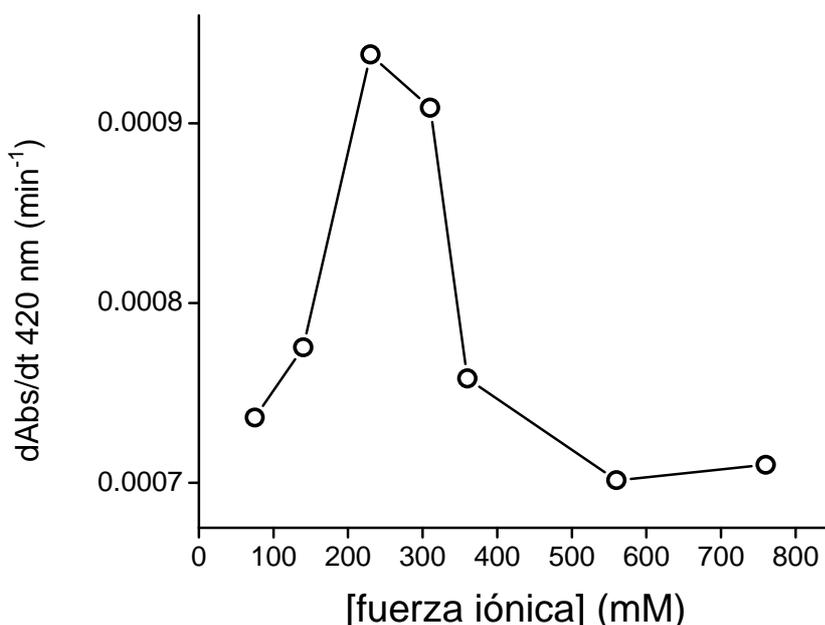


Figura 43. Efecto de la fuerza iónica. Se agregó CBS (1 μM) a una solución de MSR (2 μM) previamente reducida por NADPH (1 mM) y luego se saturó con CO (1 mM). El ensayo fue repetido utilizando en cada caso amortiguador fosfato con concentraciones crecientes de KCl (75-760 mM) controlando el pH final, mantenido en 7.4.

Se realizaron nuevos ensayos utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido. En este caso en colaboración con el Dr. David Ballou del Departamento de Química Biológica de la Universidad de Michigan. Otra variante fue la utilización de tonómetros, en lugar de preparar y degasear las soluciones en la cámara anaerobia.

El procedimiento experimental consistió en colocar en una jeringa del espectrofotómetro de flujo detenido un tonómetro conteniendo una solución de CBS ($1 \mu\text{M}$, final luego de la mezcla) en amortiguador fosfato, pH 7.4, previamente degaseada con ciclos de vacío y nitrógeno y luego saturada en CO. Por otra parte, se prepararon diferentes tonómetros cada uno con concentraciones crecientes de MSR (2, 5 y $10 \mu\text{M}$) a las que se agregó NADPH ($500 \mu\text{M}$) en exceso para asegurar la reducción de MSR. Estos tonómetros se colocaron en la segunda jeringa y al mezclar, luego de cada disparo, se registraron los espectros de absorbancia en el tiempo, variando la adquisición de los mismos desde milisegundos hasta 1425 s.

En la Figura 44, se muestra un registro representativo de los espectros obtenidos. El resultado indica una disminución del máximo correspondiente a la CBS oxidada, y un concomitante aumento de la absorbancia a 420 nm , correspondiente a la formación del Fe(II)CO . A diferencia de los ensayos anteriores, en este caso sí observamos la aparición de un pico a 449 nm , correspondiente a la CBS reducida que luego reacciona con CO para formar Fe(II)CO .

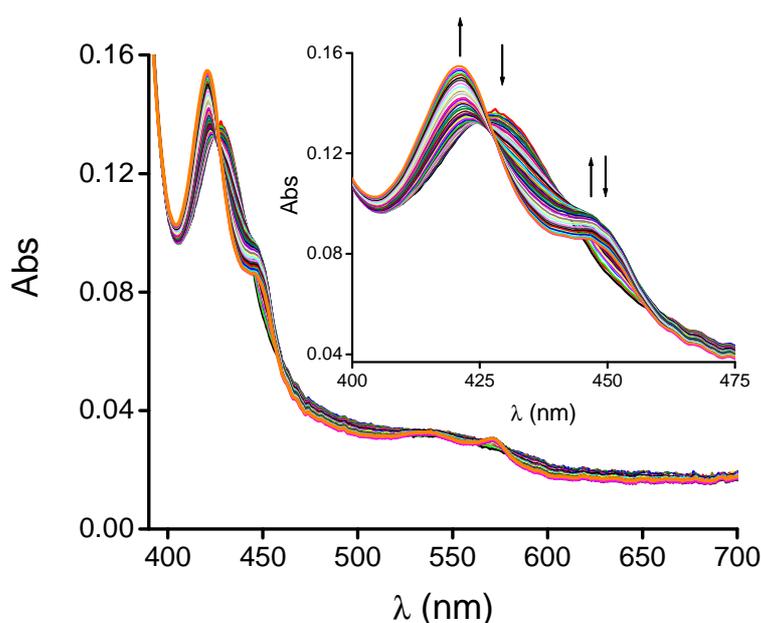


Figura 44. Reducción de CBS por MSR en presencia de CO. En un espectrofotómetro de flujo detenido, se mezcló una solución anaeróbica de Fe(III)CBS (final $1 \mu\text{M}$) saturada con CO, con MSR ($2 \mu\text{M}$) previamente reducida con NADPH ($500 \mu\text{M}$), en amortiguador fosfato (0.1 M , pH 7.4, con DTPA 0.1 mM) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los espectros fueron registrados luego del mezclado desde 0.75 a 1425 s. Las flechas indican la dirección del cambio de absorbancia en el tiempo.

Estos ensayos fueron repetidos en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de MSR. En la Figura 45, se comparan los cambios de absorbancia registrados en el tiempo para las longitudes de onda de 449 nm y 420 nm obtenidos. A 449 nm se observa un incremento en la absorbancia y luego una disminución, lo cual se

correspondería primero con la formación de la especie reducida Fe(II)CBS y luego, al reaccionar con CO, su conversión en la especie Fe(II)COCBS. En este sentido, se distingue un aumento en la absorbancia a 422 nm que a tiempos cortos parece tener una fase lag. Es destacable además la dependencia del cambio de absorbancia en el tiempo con el incremento de la concentración de MSR.

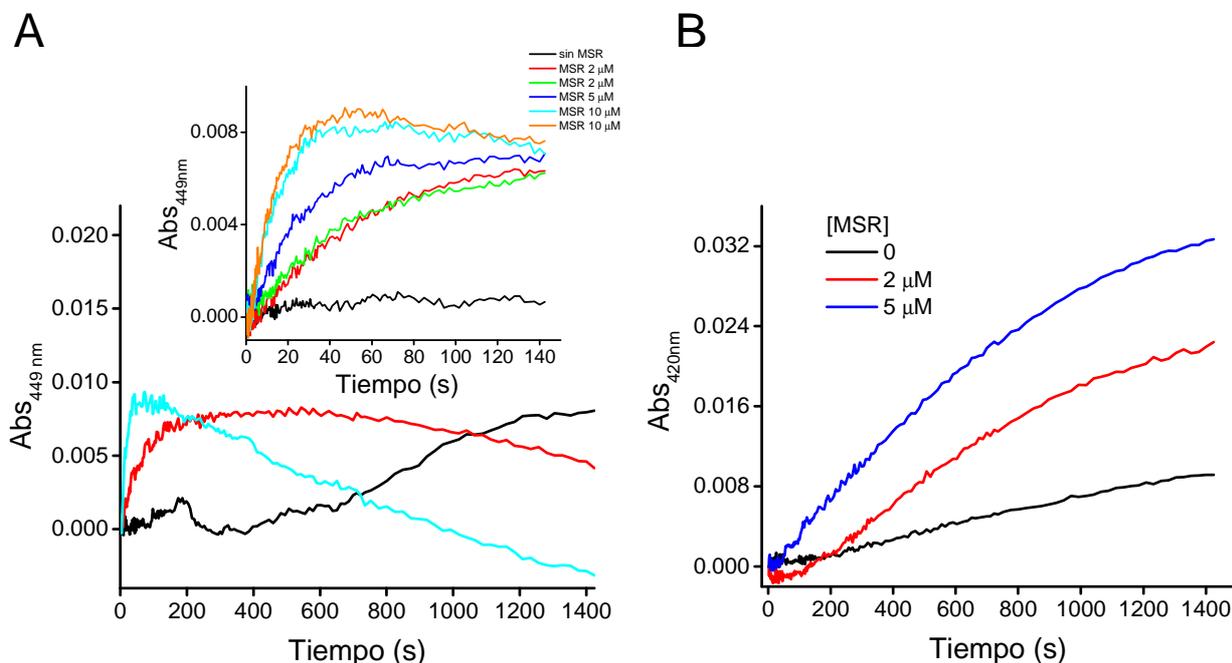


Figura 45. Dependencia del cambio de absorbancia con la concentración de MSR. Se grafican los máximos de absorbancia a 449 nm (A) y 420 nm (B) obtenidos a partir de los espectros UV-Vis registrados hasta 1425 s, luego de mezclar una solución de Fe(III)CBS (final 1 μM) saturada con CO, en ausencia (línea negra) o en presencia de diferentes concentraciones de MSR (2, líneas roja y verde, 5 μM línea azul y 10 μM , líneas celeste y anaranjada) previamente reducida con NADPH (500 μM), en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, con DTPA 0.1 mM) a 25 $^{\circ}\text{C}$. *Inserto:* registro del curso temporal de la absorbancia a 449 nm hasta 142s.

Un resultado muy sorprendente, del cual aún no tenemos una explicación clara, fue que en los experimentos control, al mezclar Fe(III)CBS saturado con CO en una jeringa, con NADPH en ausencia de MSR en otra jeringa, se observó un incremento en el máximo a 449 nm (Figura 46). Cabe mencionar que este comportamiento se repitió en todos los ensayos realizados en ausencia de MSR. Incluso cuando se utilizaron preparados de CBS y de MSR de distintas purificaciones, o al cambiar el stock de NADPH. En la literatura no hay reportes sobre una posible reducción de CBS por NADPH y no se espera que esto ocurra directamente, dado que el NADPH es un dador de dos electrones y para reducir el hemo de la CBS se precisa un solo electrón. De hecho ese sería el trabajo de las flavina reductasas. Además se hicieron controles bloqueando entre sucesivas medidas la luz incidente en la celda del espectrofotómetro de flujo detenido, pero igual se observó la reducción, con lo que descartamos un efecto fotoquímico. De todas formas, a pesar de este comportamiento inesperado, es bien destacable que en presencia de MSR hay un claro incremento de las absorbancias a 449 nm y 420 en el tiempo y de manera concentración-dependiente.

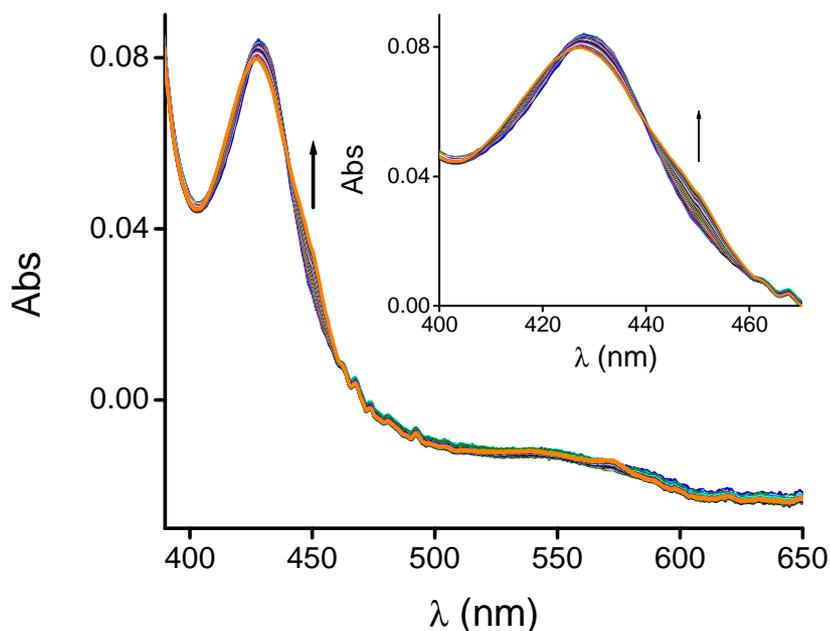


Figura 46. Ensayo control. Espectros UV-Vis de una solución de Fe(III)CBS (1 μ M) saturada con CO, mezclada con NADPH (1 mM) en ausencia de MSR en un espectrofotómetro de flujo detenido. Los espectros de absorción fueron registrados hasta los 285 s.

Para poder determinar una constante para la reacción de reducción se realizaron dos tipos de análisis cinéticos, en primer lugar se utilizó el método de velocidades iniciales, calculando la pendiente de la porción inicial de la reacción en los primeros 15 segundos y por otro lado, los datos de absorbancia a 449 nm en función del tiempo fueron analizados mediante el ajuste a una función exponencial.

El método de velocidades iniciales consiste en determinar la pendiente inicial en el gráfico de absorbancia a 449 nm en función del tiempo, para cada concentración de MSR. Se considera que la concentración de los reactivos durante el intervalo de medida, en los primeros 15 segundos, permanece constante e igual a la inicial. Es necesario además conocer el coeficiente de absorptividad para la forma reducida de la CBS. Este valor fue estimado a partir de datos recopilados de diferentes espectros donde la CBS fue completamente reducida por ditionito (el cálculo se efectuó restando la absorbancia a 449 nm de la CBS reducida menos la contribución a 449 nm de la CBS oxidada y luego dividiendo por la concentración de CBS). El valor calculado del coeficiente de extinción fue de $63900 \pm 5020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($n = 11$, basado en proteína). Como se observa en la Figura 47, las velocidades iniciales muestran un aumento lineal con las concentraciones de MSR y a partir de la pendiente del gráfico se estimó una constante de velocidad de reducción de $931 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C (promedio de dos experimentos independientes).

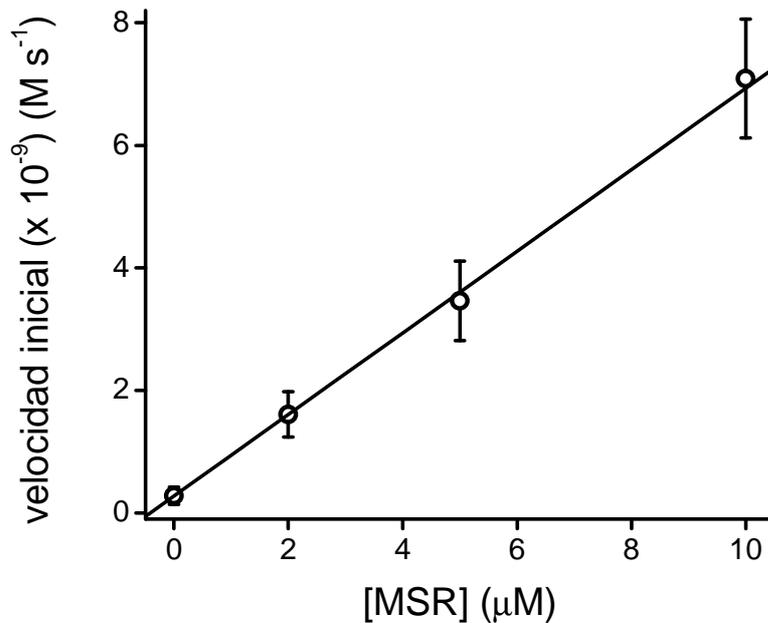


Figura 47. Análisis de la cinética de reducción de CBS por MSR por el método de velocidades iniciales. Las velocidades iniciales fueron obtenidas a partir de la pendiente inicial en la absorbancia a 449 nm en los primeros 15 s, para cada concentración de MSR. Cada punto representa el promedio (\pm desviación estándar) de al menos 8 determinaciones. Se muestran datos de un experimento representativo.

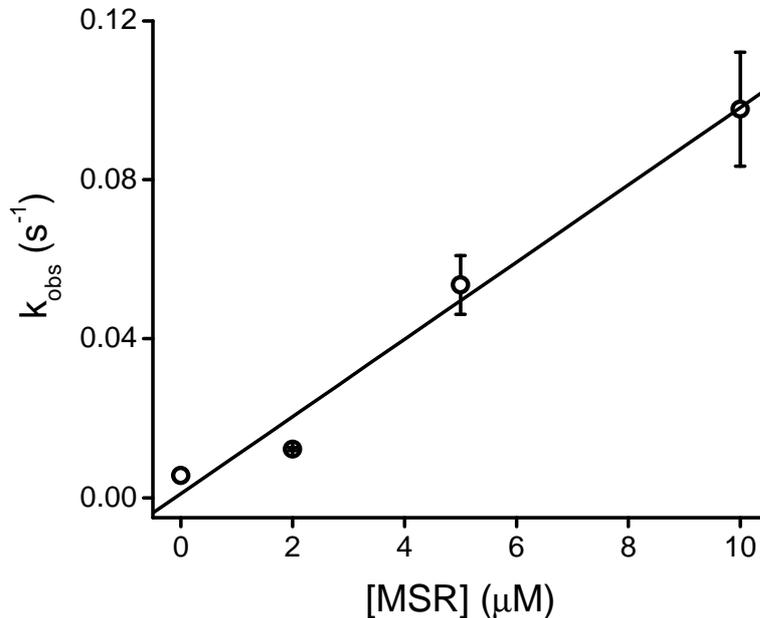


Figura 48. Análisis de la cinética de reducción de CBS por MSR por el ajuste a una función exponencial. Las constantes observadas k_{obs} (s^{-1}) fueron determinadas a partir del ajuste de la formación de Fe(II)CBS a 449 nm a una función exponencial hasta siete vidas medias, para cada concentración de MSR. Cada punto representa el promedio (\pm desviación estándar) de al menos 5 determinaciones. Se muestran datos de un experimento representativo.

A su vez, los datos de absorbancia a 449 nm en función del tiempo, fueron analizados mediante el ajuste a una función exponencial hasta 7 vidas medias. De esta forma, a partir del gráfico de k_{obs} en función de la concentración de MSR, se estimó una constante de velocidad de $8630 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (promedio de dos experimentos independientes) (Figura 48).

Las constantes determinadas a partir del ajuste a la función exponencial, son un orden de magnitud mayores que las obtenidas por la aproximación de velocidades iniciales. Una explicación para esta diferencia puede ser que al ajustar los datos a una función de aumento exponencial simple solo hasta 7 vidas medias, estamos sobreestimando el valor de la constante, dado que hay una parte del registro no incluida en el ajuste. Por otra parte, es importante tener en cuenta que en los primeros puntos no tenemos un gran exceso de MSR respecto a la CBS, por lo que no estamos en condiciones de pseudo primer orden. Como alternativa se realizó un ajuste a una doble función exponencial, que no mostró un buen ajuste.

Exposición a oxidorreductasa NR1

Como sistema reductor alternativo utilizamos la enzima oxidorreductasa NR1, identificada recientemente como una flavoproteína citosólica de 68 kDa, que al contener dominios FAD y FMN también integra la familia de diflavinas y se ha visto que presenta gran homología con la MSR (235). En primer lugar la NR1 fue expresada y purificada siguiendo un procedimiento similar al descrito para la CBS y MSR. En la Figura 49, se indican en un gel de electroforesis las diferentes etapas en la purificación.

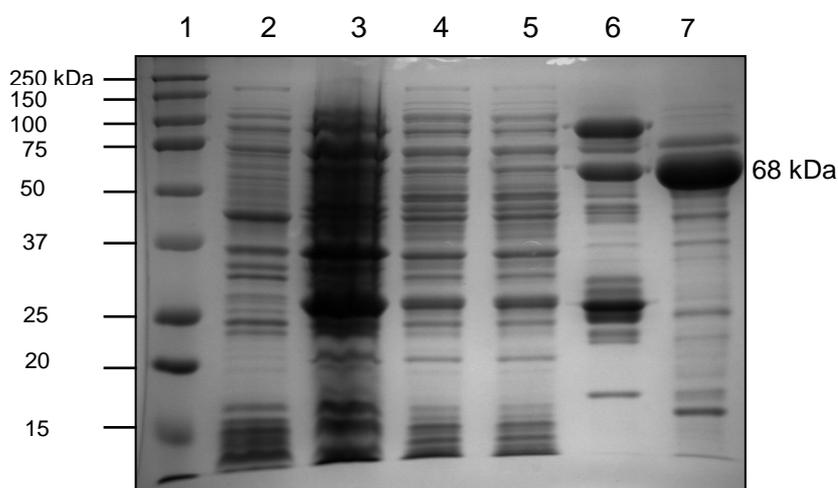


Figura 49. SDS-Page de etapas de la purificación de NR1. Se sembraron los lisados de células bacterianas antes y después de inducir la expresión de la proteína recombinante con IPTG (carriles 2 y 3, respectivamente). A continuación se efectuó la sonicación (carril 4) y a partir de la fracción soluble (carril 5), se realizó una cromatografía de afinidad con glutatión-sepharosa (carril 6), seguida de proteólisis con trombina con otro paso de cromatografía de afinidad (carril 7). Los marcadores de peso molecular se indican en el carril 1.

En cuanto a la caracterización de la enzima purificada, se realizó el espectro de absorción para confirmar el contenido de flavinas y se midió su actividad determinando la reducción de citocromo c en presencia de NADPH. La NR1 mostró tener un contenido de flavinas menor al esperado de acuerdo a la relación de absorbancias Abs_{270}/Abs_{450} (Figura 50), además la actividad resultó ser sólo un 20 % respecto a la reportada ($0.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ vs. $1.98 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (14).

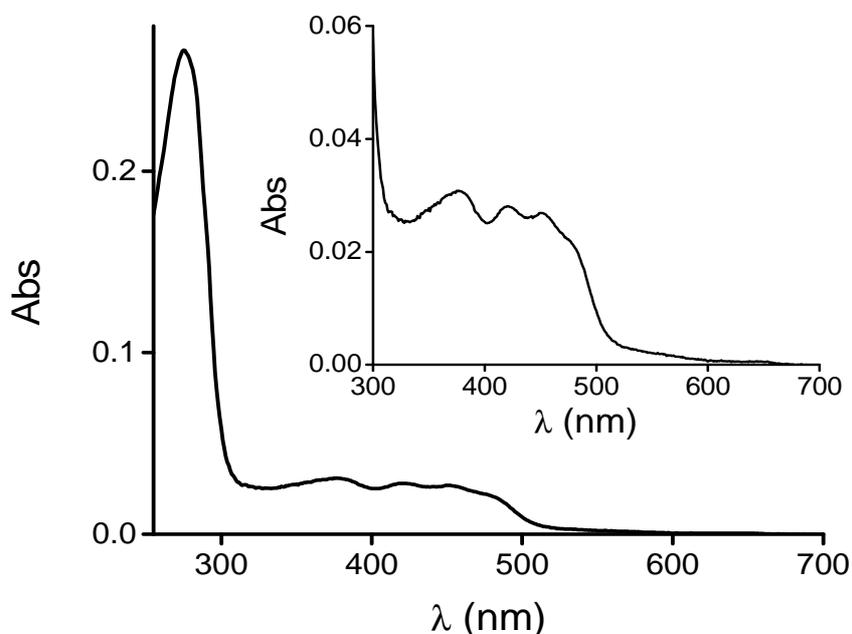


Figura 50. Espectro UV-Vis de la NR1 purificada. Espectro UV-Vis de la NR1 ($1.5 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4. Se observan los máximos de absorción característicos de las flavinas a 380 y 450 nm y un hombro a 480 nm. La relación Abs_{270}/Abs_{450} fue de ~ 9.6 , mientras el valor reportado es de 5, por lo que esta preparación de NR1 tiene un bajo contenido de flavinas

Por tanto, se optó por reconstituir el preparado enzimático promoviendo la incorporación de flavinas mediante el agregando FAD y FMN, removiendo por filtración el exceso no unido. Sin embargo, luego del tratamiento nuevamente se obtuvo un bajo contenido de flavinas y una muy baja actividad enzimática. Por tanto se comenzó una nueva purificación, pero en este caso no se logró una buena expresión de la proteína. La NR1 se intentó purificar en numerosas oportunidades sin lograr obtener la enzima activa y con el contenido adecuado de flavinas, por lo que lamentablemente no fue posible incluirla en los ensayos para determinar la reducción del hemo.

Exposición al dominio reductasa de la NOS

A su vez, se exploró la reducción del hemo de la CBS por el dominio reductasa de la nNOS, que como fue mencionado anteriormente, también contiene FAD, FMN y une el NADPH y de acuerdo a su potencial de reducción podría dar cuenta de esta reducción *in vivo*. Estos ensayos fueron realizados por Inés Marmisolle, utilizando el dominio reductasa purificado de la nNOS cedido por Dennis Stuehr (Cleveland Clinic). El procedimiento experimental consistió en exponer una solución de CBS anaeróbica al

dominio reductasa de la NOS, en presencia de NADPH y registrar los cambios en los espectros UV-Vis, registrados en el tiempo. En este caso no se evidenció la aparición del máximo a 449 nm correspondiente a la enzima reducida. Al agregar KCN u óxido nítrico utilizando ProlINO como dador de NO, no se observó la aparición de máximos a 435 o 390 nm, respectivamente que indicaran la reducción del hemo de la CBS.

5.3.3. Discusión

En esta parte del trabajo hemos abordado el estudio de la posible reducción biológica del hemo de la CBS mediante distintas aproximaciones experimentales. Por un lado, como posible sistema reductor utilizamos fracciones subcelulares de hígado de rata, en particular la fracción citosólica del tejido donde se encuentra la CBS en mayor abundancia. El resultado indica que con los extractos en nuestras condiciones de reacción no fue posible detectar la reducción del hemo, que fue monitoreado por los cambios a nivel de los espectros UV-Vis, así como por el consumo de oxígeno. A continuación realizamos un nuevo abordaje experimental mediante la exposición de la CBS a distintas flavoproteínas citosólicas purificadas. En este caso, con la MSR y en presencia de CO obtuvimos evidencia que sugiere la reducción del hemo de la CBS. Los cambios observados en los espectros de absorción en el tiempo, permiten aventurar que la MSR prereducida por NADPH, es capaz de reducir el hemo de la CBS que a su vez, en presencia de CO, genera el producto Fe(II)COCBS. Una observación inesperada que surge de estos ensayos, fue la aparición en el espectro de un máximo de absorbancia correspondiente a la CBS reducida, en ausencia de MSR pero en presencia de NADPH, lo cual constituye un punto para seguir explorando en futuras determinaciones. De todas formas, hay un marcado incremento en la velocidad de reducción del hemo de la CBS en presencia de concentraciones crecientes de MSR. El hecho de haber obtenido estos resultados es bien destacable, dada la complejidad del sistema en estudio, en particular debido a la dificultad inherente del trabajo en condiciones anaerobias.

Los resultados obtenidos son preliminares y es necesario efectuar nuevos ensayos para confirmar plenamente esta hipótesis. En este sentido, como continuación del trabajo puede resultar de gran relevancia complementar los estudios de cinética rápida con otras técnicas espectroscópicas, por ejemplo mediante resonancia paramagnética electrónica. Dado que el hemo reducido es diamagnético, se podría seguir la desaparición del paramagnetismo asociado con el hemo oxidado, al incubar CBS con MSR en presencia de NADPH, realizando controles en ausencia de CBS, o incluso también tomar ventaja del hecho que cuando el hemo reducido reacciona con el óxido nítrico, el hierro del hemo pasa del estado diamagnético al paramagnético, con lo cual se podría tratar de detectar en la señal de EPR la aparición del patrón característico de tres líneas de división hiperfina que resultan de la interacción del NO con Fe(II)CBS. Además de confirmar el rol de la MSR en la reducción, se podrían expresar en forma separada los dominios NADPH/FAD o el dominio FMN de la MSR para identificar cuál sería el encargado de reducir el hemo. A su vez, esperamos poder obtener en el corto plazo la flavoproteína NR1 purificada y activa para poder evaluar un posible rol en la reducción de la CBS. Dado que la NR1 presenta un potencial redox más negativo que la MSR, sería incluso un mejor candidato para efectuar la reducción del hemo.

5.4. Reactividad del sulfuro de hidrógeno con peroxinitrito y otros oxidantes de interés biológico

Entre los efectos citoprotectores asignados al sulfuro de hidrógeno, se ha propuesto que podría tener un rol antioxidante. Sin embargo, no existe una caracterización sistemática de la cinética y mecanismos de reacción del sulfuro con oxidantes y radicales libres. Con el fin de comprender y racionalizar el posible potencial protector del sulfuro en sistemas biológicos, se abordó el estudio de su reactividad con diversos oxidantes de uno y dos electrones, en particular con el peroxinitrito. Además se comparó la reactividad del sulfuro con la de tioles de bajo peso molecular, como cisteína y glutatión.

5.4.1. Reactividad del sulfuro de hidrógeno con peroxinitrito

Estudios directos de espectrofotometría de flujo detenido

El estudio cinético de la reacción directa entre sulfuro de hidrógeno y peroxinitrito fue realizado por técnicas de cinética rápida, empleando un espectrofotómetro de flujo detenido. Las determinaciones experimentales se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, utilizando concentraciones de sulfuro en exceso, de por lo menos 5 veces respecto al peroxinitrito. La reacción fue monitoreada siguiendo la descomposición del peroxinitrito, en presencia de concentraciones crecientes de sulfuro de hidrógeno. Como se observa en la Figura 51, la caída en la absorbancia a 302 nm correspondiente al consumo de peroxinitrito siguió una función exponencial simple, lo cual se evidencia en el gráfico de escala logarítmica donde se aprecia una relación lineal. Las constantes de velocidad de primer orden k_{obs} (s^{-1}) se incrementaron linealmente con la concentración de sulfuro de hidrógeno, excepto por una pequeña aunque reproducible desviación observada a bajas concentraciones de sulfuro. A partir de la pendiente del gráfico se determinó la constante aparente de segundo orden para la reacción, con un valor de $(4.8 \pm 1.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C (promedio \pm desviación estándar con $n = 4$). La desviación de la linealidad observada a bajas concentraciones de sulfuro, ocurre en una condición en la cual el decaimiento del peroxinitrito por homólisis (0.9 s^{-1}) se torna más significativo respecto a su reacción directa con el sulfuro. Este comportamiento es similar al reportado previamente para la reacción entre peroxinitrito y los tioles de bajo peso molecular cisteína y glutatión (236) y es probablemente causado por la reacción entre el radical dióxido de nitrógeno y el anión superóxido que da lugar a la formación de peroxinitrato (O_2NOO^-), que también absorbe a 302 nm y puede provocar un enlentecimiento aparente artefactual en las constantes observadas de decaimiento del peroxinitrito (237).

La estequiometría de la reacción fue determinada en colaboración con el Lic. Ernesto Cuevasanta, exponiendo peroxinitrito (0.246 mM) a una solución de sulfuro de hidrógeno en exceso (2.10 mM) en viales cerrados a pH 7.33. Luego de incubar la mezcla de reacción durante 3 min a 37 °C, la cantidad de sulfuro remanente fue determinado como $(1.64 \pm 0.04) \text{ mM}$ (promedio \pm desviación estándar con $n = 6$). Este valor corresponde a 1.87 mol de sulfuro de hidrógeno oxidado por mol de peroxinitrito. En estas condiciones, se calculó que $> 90\%$ del peroxinitrito reaccionó de forma directa con el sulfuro en lugar de homolizar. Además, en los controles en los que el peroxinitrito fue previamente descompuesto en el amortiguador antes de ser expuesto al sulfuro, no se observó oxidación, descartando una potencial interferencia debida a contaminantes del peroxinitrito.

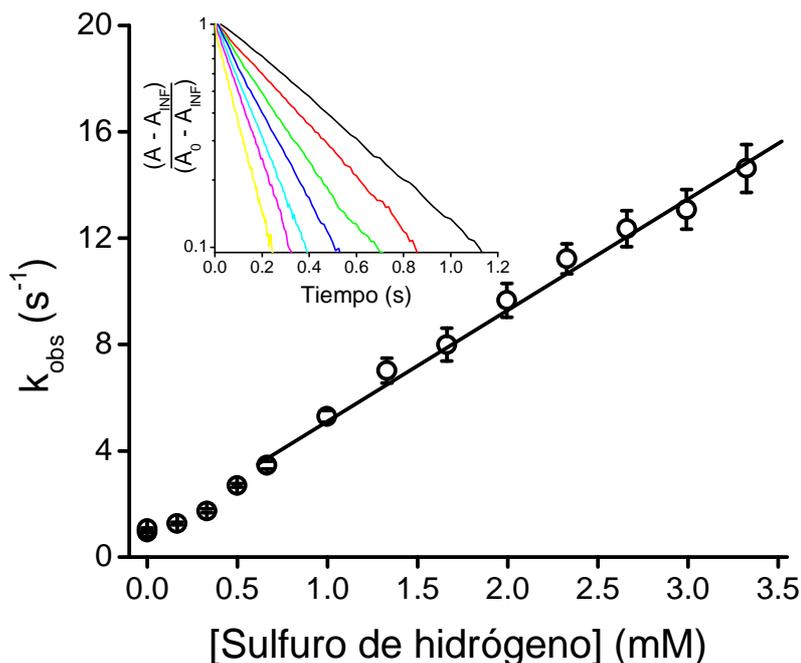


Figura 51. Constante de velocidad de la reacción entre sulfuro de hidrógeno y peroxinitrito. Se mezcló peroxinitrito (50 μM) con concentraciones crecientes de sulfuro de hidrógeno en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las k_{obs} (s^{-1}) fueron obtenidas a partir del ajuste de la absorbancia del peroxinitrito a 302 nm a una función exponencial. La constante de velocidad de segundo orden fue determinada de la pendiente del gráfico de k_{obs} versus concentración de sulfuro de hidrógeno (0.67-3.33 mM). *Inserto.* Trazo cinético representativo a 302 nm en escala logarítmica, en ausencia y en presencia de sulfuro de hidrógeno (desde la derecha hacia la izquierda: 0, 0.34, 0.67, 1, 1.34, 1.67 y 2.32 mM). A es la absorbancia a tiempo t, y A_0 y A_{INF} representan los valores de absorbancia inicial y final, respectivamente.

Dependencia del pH

A continuación se estudió la dependencia de la cinética de la reacción con el pH, determinando las constantes aparentes de segundo orden (obtenidas a partir de los gráficos de k_{obs} versus concentración de sulfuro de hidrógeno) a diferentes valores de pH (Figura 52, inserto). Una particularidad a mencionar es que en los experimentos realizados con valores de pH ácidos y elevadas concentraciones de sulfuro, los trazos cinéticos mostraron desviaciones al ser ajustados a una función simple de caída exponencial y además presentaron un incremento en la absorbancia a tiempos mayores, probablemente causados por interferencias debidas a los productos de reacción. En la Figura 52, el gráfico correspondiente a las constantes aparentes de segundo orden en función del pH mostró un perfil con forma de campana, lo cual se explica por la participación en la reacción de dos especies disociables en el rango de pH estudiado. Aunque la proximidad en los dos valores de $\text{p}K_{\text{a}}$, de 7.0 para el sulfuro y 6.8 para el peroxinitrito, dificulta un análisis mayor, el resultado es consistente con un mecanismo de reacción que involucra la forma aniónica del sulfuro de hidrógeno (HS^-) con la forma protonada del peroxinitrito (ONOOH).

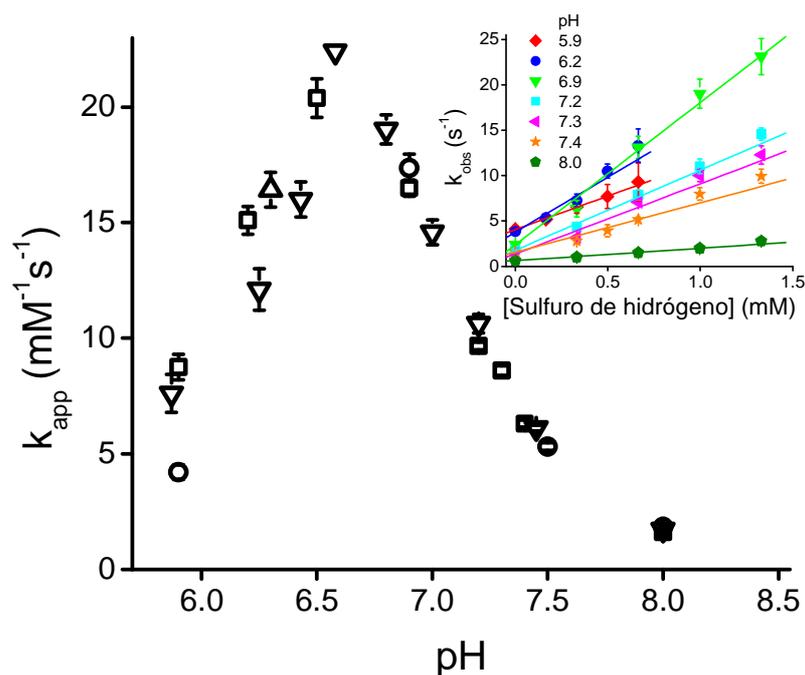


Figura 52. Dependencia del pH de la reacción entre sulfuro de hidrógeno y peroxinitrito. El peroxinitrito (50 μM) fue mezclado con concentraciones crecientes de sulfuro de hidrógeno en amortiguador fosfato (0.1 M, 0.1 mM DTPA) a 37 $^{\circ}\text{C}$, al pH indicado. *Inserto.* Los valores de k_{obs} (s^{-1}) fueron determinados para cada concentración de sulfuro de hidrógeno y para cada valor de pH. Las constantes aparentes de segundo orden (k_{app}) obtenidas del gráfico de k_{obs} versus sulfuro, fueron graficadas en función del pH. Se muestran datos de cuatro experimentos independientes realizados en diferentes días (símbolos abiertos).

Medidas del consumo de oxígeno

La oxidación del sulfuro de hidrógeno mediada por el peroxinitrito resultó estar asociada con el consumo de oxígeno, lo cual está de acuerdo con observaciones reportadas previamente para tioles de bajo peso molecular (236, 238). De acuerdo a los perfiles obtenidos, en condiciones de bajas concentraciones de sulfuro de hidrógeno (≤ 0.27 mM) se verificó una sola fase rápida de consumo de oxígeno con una duración menor a 0.5 min, en la cual el consumo total de oxígeno se incrementó al aumentar la concentración del sulfuro (Figuras 53, panel a y 54). Este consumo fue inhibido en un $\sim 50\%$ al agregar el atrapador de espín 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO, 25 mM). En cambio, cuando se realizó el ensayo con mayores concentraciones de sulfuro de hidrógeno (> 0.27 mM), el consumo de oxígeno presentó dos fases (Figura 53, panel b): una fase rápida (fase I), en la cual el consumo de oxígeno ahora disminuyó con el incremento en la concentración de sulfuro (Figura 54), seguida por la aparición de una segunda fase (fase II), cuya duración fue de varios minutos, en la que la velocidad del consumo de oxígeno se incrementó con el aumento de la concentración del sulfuro.

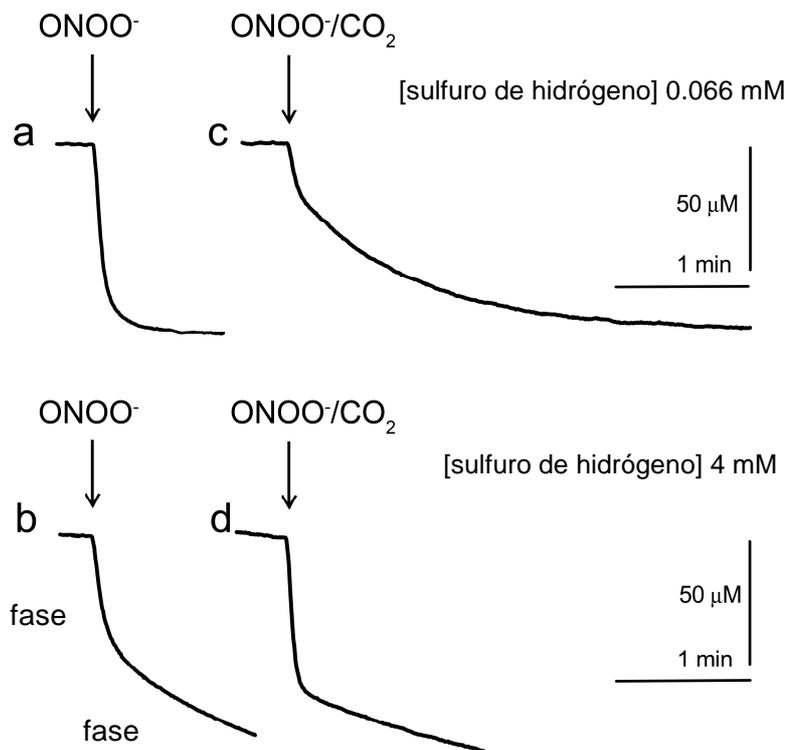


Figura 53. Perfil del consumo de oxígeno. Se monitoreó el consumo de oxígeno luego de agregar peroxinitrito (0.5 mM) a diferentes concentraciones de sulfuro de hidrógeno en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 °C. Se muestran registros representativos con concentraciones de sulfuro de 0.066 y 4 mM, en ausencia (a, b) o en presencia (c, d) de NaHCO₃ (25 mM) (concentración final de dióxido de carbono ~ 1.2 mM). Las flechas indican el momento en el cual fue añadido el peroxinitrito. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Al graficar el consumo de oxígeno inicial (fase I) en función de la concentración de sulfuro de hidrógeno, se obtuvo un perfil acampanado (Figura 54). Este patrón en el consumo de oxígeno es consistente con la coexistencia de dos vías que compiten en el mecanismo de la reacción de oxidación del sulfuro por el peroxinitrito. A bajas concentraciones de sulfuro predomina la homólisis del peroxinitrito (0.9 s^{-1} , pH 7.4, 37 °C) dando lugar a la formación de los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), que pueden reaccionar con el sulfuro de hidrógeno en un proceso de oxidación por un electrón, conduciendo a la formación del radical sulfanilo ($\text{S}^{\cdot-}$)⁴, capaz de reaccionar con el oxígeno e iniciar una cadena de reacciones radicalares oxígeno-dependientes, propagando y amplificando la vía de oxidación por un electrón. En efecto, se ha reportado que el $\cdot\text{OH}$ reacciona con el sulfuro de hidrógeno, dando lugar a la formación del radical sulfanilo con una constante de velocidad de $1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (240). En cambio, a mayores concentraciones de sulfuro, descende el consumo de oxígeno dado que predomina la reacción directa de oxidación del sulfuro de hidrógeno por el peroxinitrito en un mecanismo de oxidación por dos electrones.

⁴ A pH 7.4, el radical sulfanilo estará predominantemente en la forma aniónica $\text{S}^{\cdot-}$, de acuerdo al pK_a reportado para el HS^{\cdot} de ~ 3-4 (239) Das, T. N., Huie, R. E., Neta, P., and Padmaja, S. (1999) Reduction Potential of the Sulfhydryl Radical: Pulse Radiolysis and Laser Flash Photolysis Studies of the Formation and Reactions of $\cdot\text{SH}$ and $\text{HSSH}^{\cdot-}$ in Aqueous Solutions. *Journal of Physical Chemistry A* 103, 5221-6.

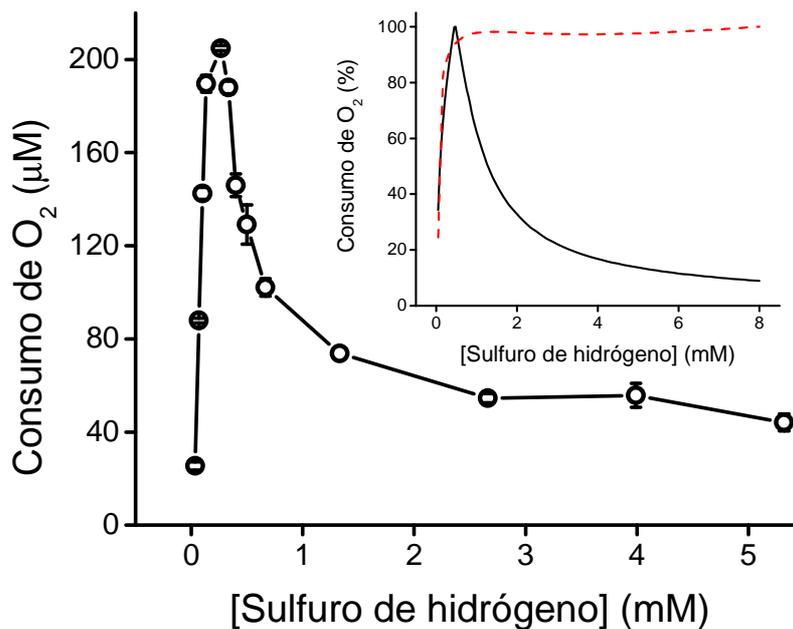


Figura 54. Consumo inicial de oxígeno (fase I) en función del sulfuro de hidrógeno. Se agregó peroxinitrito (0.5 mM) a diferentes concentraciones de sulfuro de hidrógeno (0.03-5.3 mM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 °C y se determinó la fase inicial del consumo de oxígeno. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). *Inserto.* Simulaciones. La línea continua representa el perfil obtenido de las simulaciones realizadas utilizando las reacciones listadas en la Tabla 4, donde el 100 % corresponde a 86 μ M. La línea punteada (rojo) representa el perfil simulado cuando se omitió la reacción directa entre el sulfuro de hidrógeno y el peroxinitrito, en este caso el 100 % corresponde a 197 μ M.

Para poder comprender estos resultados, justificar el comportamiento observado y confirmar los mecanismos propuestos, se realizaron simulaciones asistidas por computadora, utilizando una serie de reacciones con constantes de reacción conocidas recopiladas de la literatura (Tabla 4). Como se observa en la Figura 54, a pesar de la complejidad del modelo por la gran cantidad de reacciones involucradas en el proceso, el perfil obtenido en la simulación reproduce cualitativamente los resultados obtenidos en forma experimental. En la simulación sin embargo, el máximo de consumo de oxígeno obtenido fue menor que el determinado en forma experimental (86 versus 205 μ M), lo cual se debe probablemente a la numerosa variedad de intermediarios de naturaleza radicalar y no radicalar que pueden formarse, algunos de los cuales no pudieron ser incluidos en la simulación por la falta de constantes reportadas. De todas formas, la simulación explica el perfil obtenido en forma de campana confirmando la incidencia de la reacción directa de oxidación del sulfuro por peroxinitrito, dado que cuando esta reacción no fue incluida en la simulación, desaparece la caída en el consumo de oxígeno observada a altas concentraciones de sulfuro de hidrógeno (Figura 54, inserto, línea punteada). Otro dato interesante obtenido a partir de las simulaciones es que la reacción que contribuye en mayor medida al consumo de oxígeno es aquella entre $\text{S}^{\cdot-}$ y O_2 . De hecho, la supresión de esta reacción redujo el consumo de oxígeno en dos órdenes de magnitud, y a una concentración de 0.27 mM de sulfuro de hidrógeno, el oxígeno constituye el blanco preferente del radical sulfanilo.

Cuando la oxidación del sulfuro de hidrógeno por peroxinitrito fue estudiada en presencia de dióxido de carbono, también se observó consumo de oxígeno aunque con un perfil diferente sin la aparición de la forma acampanada (Figure 3 c, d), comportamiento que fue confirmado en las simulaciones que incluyeron al CO₂ (no se muestra). En este sentido, la rápida reacción entre el peroxinitrito y el dióxido de carbono ($4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4, 37 °C) (173) compite con la reacción directa de oxidación del sulfuro de hidrógeno, aún en presencia de altas concentraciones de sulfuro, dando lugar a la formación de $\cdot\text{NO}_2$ y radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) con un rendimiento del ~35 % (174, 175), los cuales pueden oxidar al sulfuro para formar el radical sulfanilo. De hecho, se ha reportado que el radical carbonato reacciona con el sulfuro con una constante de velocidad de $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (239).

Tabla 4. Reacciones que participan en la oxidación aeróbica del sulfuro de hidrógeno por peroxinitrito utilizadas en la simulación de la Figura 54.

Reacción ^a	constante (k)	Referencia
Reacciones involucradas en el decaimiento del peroxinitrito		
$\text{ONOOH} \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{HO}\cdot$	$0.27 \text{ s}^{-1 \text{ b}}$	(163) (163)
$\text{ONOOH} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	$0.63 \text{ s}^{-1 \text{ b}}$	(163)
$\text{HO}\cdot + \text{NO}_2^- \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{OH}^-$	$6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$2 \cdot\text{NO}_2 \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_4$	$4.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (d) }^{\text{c}}$; $6.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ (r)}$	(240)
$\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	$1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	(241)
$\cdot\text{NO}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightleftharpoons \text{O}_2\text{NOO}^-$	$4.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (d)}$; $1.1 \text{ s}^{-1} \text{ (r)}$	(242, 243)
$\text{O}_2\text{NOO}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{NO}_2^-$	1.3 s^{-1}	(242, 243)
$2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	$2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(127)
$\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{CO}_3^{\cdot-}$	$1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ d}}$	(173)
$\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{CO}_2$	$3.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ d}}$	(173)
$\text{CO}_3^{\cdot-} + \cdot\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{CO}_2$	$1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{CO}_3^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{O}_2$	$6.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
Reacciones adicionales en presencia del sulfuro de hidrógeno		
$\text{HS}^- + \text{ONOOH} \rightarrow \text{HSOH} + \text{NO}_2^-$	$4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Este trabajo
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HS}^- \rightarrow \text{HSOH} + \text{OH}^-$	$0.73 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Este trabajo

$\text{HSOH} + \text{HS}^- \rightarrow \text{HSSH} + \text{OH}^-$	$1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ e}}$	(244)
$\cdot\text{NO}_2 + \text{HS}^- \rightarrow \text{S}^- + \text{NO}_2^- + \text{H}^+$	$1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Este trabajo
$\text{HO}\cdot + \text{H}_2\text{S}/\text{HS}^- \rightarrow \text{S}^- + \text{H}_2\text{O}$	$1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{S}/\text{HS}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{S}^-$	$200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ f}}$	(245)
$\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^- + \text{CO}_3^{\cdot-} \rightarrow \text{S}^- + \text{CO}_3^{2-}$	$2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(239)
$\text{S}^- + \text{S}^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{HSSH}$	$6.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(246)
$\text{S}^- + \text{HS}^- \rightleftharpoons \text{HSS}^{\cdot 2-}$	$5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (d);}$ $5.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ (r)}$	(246)
$\text{HSS}^{\cdot 2-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HSS}^- + \text{O}_2^{\cdot-}$	$4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(246)
$\text{HSS}^{\cdot 2-} + \text{S}^- \rightarrow \text{HSSH} + \text{HS}^-$	$9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(246)
$\text{HSS}^{\cdot 2-} + \text{HSS}^{\cdot 2-} \rightarrow \text{HSSH} + 2 \text{HS}^-$	$9.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(246)
$\text{S}^- + \text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HSOO}\cdot \rightarrow \text{H}^+ + \text{SO}_2^{\cdot-}$	$7.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(246)
$\text{SO}_2^{\cdot-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_2 + \text{O}_2^{\cdot-}$	$1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(222)
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} \rightleftharpoons 2 \text{SO}_2^{\cdot-}$	$2.5 \text{ s}^{-1} \text{ (d); } 1.8 \times 10^9$ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (r)}$	(221, 222)
$\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-} + \text{H}^+$	$3.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ (d); } 2.0 \times$ $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (r)}^{\text{ f}}$	(247)
$\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-} + \text{S}^- \rightarrow \text{SO}_3^{\cdot-} + \text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$	$4.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1 \text{ g}}$	(239)
$\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-} + \cdot\text{NO}_2 \rightarrow \text{SO}_3^{\cdot-} + \text{NO}_2^-$	$1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-} + \text{HO}\cdot \rightarrow \text{SO}_3^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}$	$5.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{SO}_3^{\cdot-} + \text{SO}_3^{\cdot-} \rightarrow \text{productos}$	$5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{SO}_3^{\cdot-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_5^{\cdot-}$	$1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{SO}_3^{\cdot-} + \text{CO}_3^{\cdot-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{CO}_2$	$5.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{SO}_5^{\cdot-} + \text{SO}_5^{\cdot-} \rightarrow \text{productos}$	$1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)
$\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-} + \text{SO}_5^{\cdot-} \rightarrow \text{SO}_3^{\cdot-} + \text{HSO}_5^-$	$6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(240)

^a Se utilizaron reacciones cuyas constantes cinéticas fueron determinadas a pH neutro y 37 °C. Cuando no se encontraron constantes reportadas en estas condiciones se utilizó el valor más cercano obtenido.

^b Calculado considerando la constante cinética para la descomposición del peroxinitrito (0.9 s^{-1} a pH 7.4) (163) y el rendimiento radicalar (30 %) (167, 168). ^c (d) y (r) representan las constantes cinéticas de las reacciones directa y reversa, respectivamente. ^d Calculado considerando la constante cinética para la reacción del ONOO⁻ con CO₂ ($k = 4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (173) y el rendimiento de radicales (34 y 66 %) (174, 175). ^e Constante de velocidad reportada para la cisteína. ^f Constante de velocidad reportada para el glutatión. ^g El valor de pK_a reportado para el sulfito de hidrógeno (HSO₃⁻) es 6.97 (247).

5.4.2. Reactividad del sulfuro de hidrógeno con dióxido de nitrógeno

La cinética de la reacción de oxidación por un electrón del sulfuro de hidrógeno por el $\cdot\text{NO}_2$ fue de estudiada por experimentos de radiólisis de pulso realizados por Madia Trujillo. Dado que las especies que participan de la reacción no pueden ser detectadas espectrofotométricamente, la reacción fue monitoreada utilizando ABTS^{2-} como molécula reportera, cuya oxidación genera un intenso cromóforo $\text{ABTS}^{\cdot-}$, seguido a 645 nm (211). De acuerdo a las reacciones (12-14) el $\text{ABTS}^{\cdot-}$ puede ser generado ya sea por la oxidación del ABTS^{2-} por el radical sulfanilo o por el dióxido de nitrógeno.



La velocidad de la reacción (11) es significativamente más lenta que la de la reacción (12) y la contribución de la reacción (13) es una constante dado que se utiliza una concentración de ABTS^{2-} fija y en exceso sobre $\cdot\text{NO}_2$, por lo que la reacción de interés (11) será en gran medida la limitante de la velocidad. En primer lugar entonces se determinó el valor de la constante de velocidad para la reacción (12) entre el radical sulfanilo y ABTS^{2-} . Mediante radiólisis de pulso y generando $\text{S}^{\cdot-}$ a partir de la oxidación del sulfuro de hidrógeno por el $\cdot\text{OH}$, se siguió la oxidación de concentraciones crecientes de ABTS^{2-} a pH 6 y 7.5. Se determinó una rápida formación de $\text{ABTS}^{\cdot-}$, seguido de un lento decaimiento. A partir del ajuste de la formación inicial de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ a una función exponencial de primer orden se obtuvieron las constantes de velocidad observadas k_{obs} que mostraron una relación lineal con concentraciones crecientes de ABTS^{2-} . De la pendiente del gráfico surge el valor de la constante de velocidad de reacción entre $\text{S}^{\cdot-}$ y ABTS^{2-} de $(1.06 \pm 0.04) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(1.2 \pm 0.9) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 6 y pH 7.5, respectivamente (Figura 55, panel A). La disminución de 8.8 veces en el valor de la constante de velocidad de reacción determinada a pH 7.5 en comparación con la de pH 6, puede ser atribuida al atrapamiento del $\text{S}^{\cdot-}$ por HS^- (reacción 14) con una constante $K = 1.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (246), reacción que predomina a pH alcalino:



Dado que HS^- se encuentra en equilibrio con H_2S , considerando el pK_a del H_2S de 7.0, se puede calcular un incremento de 8.4 veces en la fracción de HS^- a pH 7.5 respecto a pH 6, lo cual está de acuerdo con la magnitud del cambio observado en la constante de velocidad de la reacción entre $\text{S}^{\cdot-}$ y ABTS^{2-} .

A continuación, una vez obtenida la constante de velocidad para la reacción 12, se determinó el valor de la constante de reacción entre el $\cdot\text{NO}_2$ y sulfuro de hidrógeno a pH 6 y 7.5. Como se mencionó anteriormente, las k_{obs} se obtuvieron a partir de un ajuste exponencial de dos reacciones secuenciales. A su vez, la constante de primer orden k_{obs} que caracteriza la formación de $\text{ABTS}^{\cdot-}$, puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación: $k_{\text{obs}} = k_1[\text{HS}^-] + k_3[\text{ABTS}^{2-}]$. Como se espera, a una concentración constante de ABTS^{2-} , k_{obs} muestra una dependencia lineal con la concentración de sulfuro de hidrógeno, de cuya pendiente se obtienen los valores de la constante de velocidad de la reacción de $(3.0 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 6 y $(1.2 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.5 (Figura 55, panel B). La velocidad de reacción entre $\cdot\text{NO}_2$ y sulfuro de hidrógeno fue dependiente del pH, de acuerdo con que la especie que está reaccionando es HS^- . Sin embargo, el

incremento en la reactividad de 4 veces entre pH 6 y 7.5 fue menor al esperado (8.4 veces de acuerdo al $pK_a = 7.0$), probablemente debido a la reacción entre $S^{\cdot-}$ y HS^- , en lugar de reaccionar con $ABTS^{2-}$, que puede llevar a una subestimación de la constante de velocidad a pHs alcalinos, tal como fue reportado previamente para la cisteína y glutatión (210). A su vez, el valor del intercepto de las pendientes en el eje y muestra una estrecha correlación con el valor reportado de la constante de velocidad entre $ABTS^{2-}$ y $\cdot NO_2$, $k_3 = 2.2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ (Figura 55, panel B) (248).

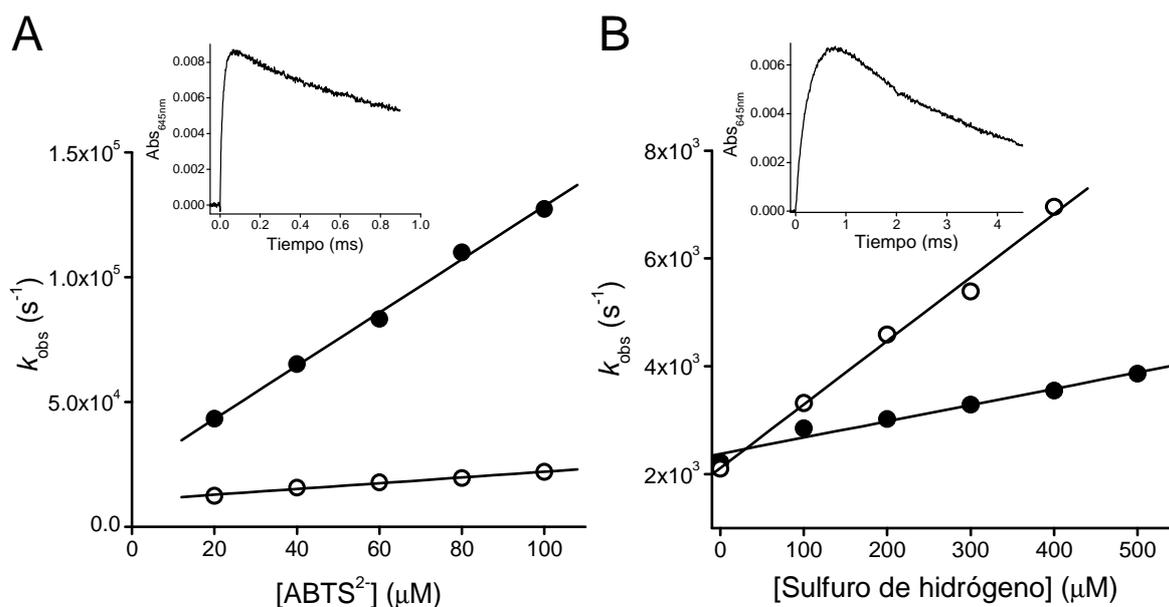


Figura 55. (A) Constante de velocidad de la reacción entre $S^{\cdot-}$ y $ABTS^{2-}$. Una solución de $ABTS^{2-}$ (20-100 μM) en amortiguador fosfato (25 mM) a pH 6 (círculos cerrados) y pH 7.5 (círculos abiertos) fue saturada con N_2O y se añadió sulfuro de hidrógeno (0.5 mM) inmediatamente antes de la radiólisis de pulso. Se generaron concentraciones submicromolares de HO^{\cdot} mediante pulsos de 0.2 μs (0.8 Gy) y se determinaron las constantes de pseudo-primer orden (k_{obs}) a partir del ajuste a la formación exponencial de $ABTS^{\cdot+}$ a 645 nm. *Inserto:* curso temporal típico de la formación de $ABTS^{\cdot+}$ a 645 nm, obtenido con $ABTS^{2-}$ (40 μM) y sulfuro de hidrógeno (0.5 mM) a pH 6. **(B) Constante de velocidad de la reacción entre $\cdot NO_2$ y sulfuro de hidrógeno.** Se monitoreó la formación de $ABTS^{\cdot+}$ a 645 nm luego de aplicar radiólisis de pulso a soluciones saturadas en N_2O conteniendo $NaNO_2$ (5 mM) y $ABTS^{2-}$ (100 μM) en amortiguador fosfato (25 mM) a pH 6 (círculos cerrados) y pH 7.5 (círculos abiertos). El sulfuro de hidrógeno (0 – 0.5 mM) fue agregado inmediatamente antes de aplicar un pulso de $\sim 0.2 \mu s$ (0.8 Gy) y se determinaron las constantes de pseudo-primer orden (k_{obs}) en función de las concentraciones de sulfuro. *Inserto:* curso temporal típico de la formación de $ABTS^{\cdot+}$ a 645 nm, obtenido con $ABTS^{2-}$ (100 μM), sulfuro de hidrógeno (0.3 mM) y $NaNO_2$ (5 mM) a pH 6.

5.4.3. Reactividad del sulfuro de hidrógeno con peróxido de hidrógeno

El valor de la constante de velocidad de reacción entre sulfuro y peróxido de hidrógeno fue determinado en condiciones de pseudo-primer orden. En presencia de un exceso de peróxido de hidrógeno, la concentración de sulfuro disminuyó siguiendo una función exponencial (Figura 56). A partir del ajuste se determinó una constante de velocidad de segundo orden de $(0.73 \pm 0.03) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C. Este valor está de acuerdo y se encuentra en el orden de valores reportados previamente para esta reacción de $\sim 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ obtenidos mediante distintos procedimientos experimentales y en diferentes condiciones de pH y temperatura (249-251).

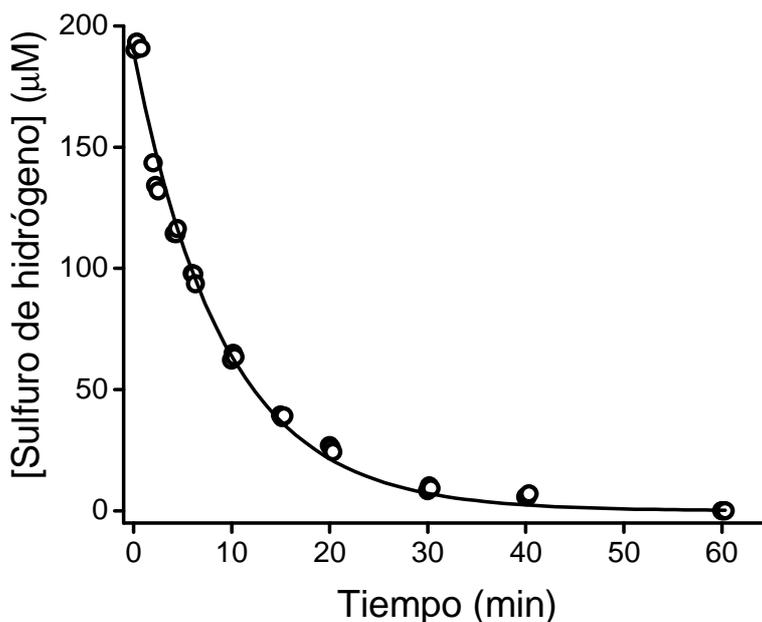


Figura 56. Constante de velocidad de la reacción entre peróxido de hidrógeno y sulfuro. Las reacciones dieron comienzo con el agregado de peróxido de hidrógeno (2.5 mM) a una solución de sulfuro de hidrógeno (190 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM) a 37 °C. Se removieron alícuotas de la reacción a diferentes tiempos, se les agregó catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno remanente y se cuantificó el sulfuro de hidrógeno por el método del azul de metileno. La constante de pseudo-primer orden se obtuvo a partir del ajuste a una función exponencial.

5.4.4. Reactividad del sulfuro de hidrógeno con hipoclorito

La reactividad del hipoclorito con tioles de bajo peso molecular se caracteriza por ser muy rápida, tanto que no puede ser estudiada directamente por técnicas de espectrofotometría de flujo detenido, excepto a pHs muy alcalinos. En nuestro caso, asumiendo que el sulfuro de hidrógeno tendría un comportamiento cinético similar, la constante de velocidad para la reacción entre el hipoclorito con sulfuro de hidrógeno a pH 7.4, fue evaluada en forma indirecta utilizando un ensayo de competencia. Estos estudios se basan en el principio de que en reacciones paralelas que comparten uno de sus reactivos, en este caso el hipoclorito, se generan productos diferentes cuya relación de concentraciones es igual a la relación entre sus constantes cinéticas. En nuestro caso utilizamos metionina como molécula competidora (reacciones 15-16), dado que reacciona con el hipoclorito con una constante de velocidad conocida de $3.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a

temperatura ambiente (252) (asumimos un valor dos veces mayor a 37 °C) y la reacción fue seguida cuantificando la concentración de sulfuro remanente por el método del azul de metileno. Las reacciones involucradas en la competencia son las siguientes:



En condiciones en las que no se utiliza un gran exceso de los reactivos que participan en la competencia, la relación entre las reactividades está dada por la siguiente ecuación (172, 253):

$$\frac{k_{\text{H}_2\text{S}}}{k_{\text{Met}}} = \frac{\ln \left\{ \frac{[\text{H}_2\text{S}]_0}{[\text{H}_2\text{S}]_0 - [\text{P}_{\text{H}_2\text{S}}]_{\infty}} \right\}}{\ln \left\{ \frac{[\text{Met}]_0}{[\text{Met}]_0 - [\text{P}_{\text{Met}}]_{\infty}} \right\}} = \frac{\ln \left\{ \frac{[\text{H}_2\text{S}]_0}{[\text{H}_2\text{S}]_0 - ([\text{H}_2\text{S}]_0 - [\text{H}_2\text{S}]_M)} \right\}}{\ln \left\{ \frac{[\text{Met}]_0}{[\text{Met}]_0 - ([\text{H}_2\text{S}]_M - [\text{H}_2\text{S}]_A)} \right\}} \quad (\text{ec. 3})$$

donde $[\text{H}_2\text{S}]_0$ representa la concentración inicial conocida de sulfuro de hidrógeno y $[\text{H}_2\text{S}]_A$ y $[\text{H}_2\text{S}]_M$ corresponden a las concentraciones finales medidas de sulfuro en ausencia y en presencia de una concentración dada de metionina, respectivamente. Como se observa en la Figura 57, la metionina compitió en la reacción, incrementando la cantidad de sulfuro de hidrógeno remanente luego del tratamiento con hipoclorito.

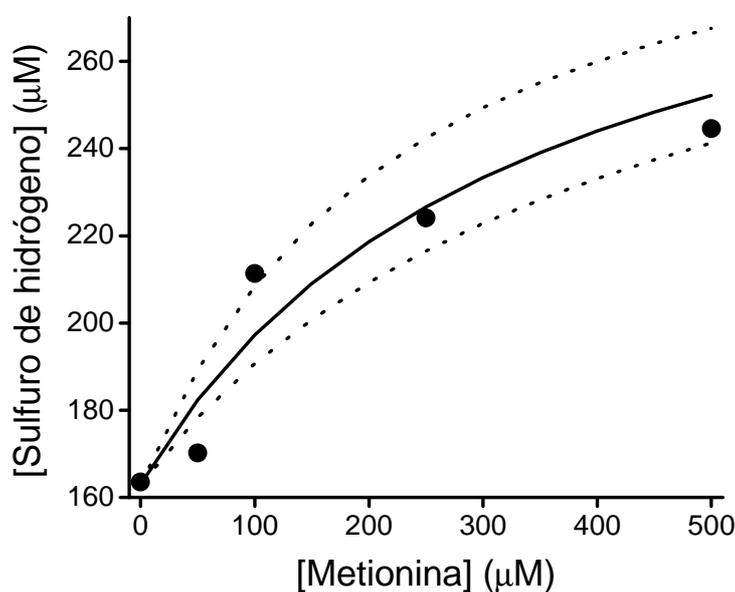


Figura 57. Competencia con metionina de la reacción de oxidación de sulfuro de hidrógeno por hipoclorito. Se incubó sulfuro de hidrógeno (316 μM) con hipoclorito (150 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4 con Chelex) a 37 °C en presencia y ausencia de metionina. Se cuantificó la concentración de sulfuro remanente (círculos) para cada concentración de metionina por el método del azul de metileno. Cada medida de sulfuro fue realizada en triplicados que difieren en menos del 5 %. Las líneas representan los valores esperados para las constantes de velocidad calculadas ($8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, continua) \pm desviación estándar (punteadas).

De acuerdo a la ecuación 3, se calculó una constante de velocidad de $(8 \pm 3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C. Este valor de la constante de velocidad es consistente y se encuentra en el orden del obtenido utilizando un electrodo de sulfuro para cuantificar el sulfuro remanente, siendo en este caso de $11 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Recientemente, en un trabajo realizado por Nagy *et al.* (254), se reportó para esta reacción un valor de constante de velocidad de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ~25 veces mayor que el nuestro, midiendo la velocidad de formación de su producto HSSH a pH alcalino ~13 y extrapolando el valor a pH 7.4. No es clara la causa de la diferencia, aunque si comparamos las constantes independientes del pH para el HOCl (2×10^8 con HS^- y $5\text{-}12 \times 10^8$ con cisteína), nos sorprendería que el HS^- reaccionara más rápido que la cisteína, tal como se desprende al analizar el trabajo de Nagy (4.8×10^9 con HS^- y $5\text{-}12 \times 10^8$ con cisteína).

5.4.5. Reactividad del sulfuro de hidrógeno con taurina cloramina

Se estudió la cinética de reacción entre el sulfuro de hidrógeno y la TauCl, seleccionada como modelo de cloraminas dado que la taurina está presente a elevadas concentraciones intracelulares en diferentes tejidos y en particular en los neutrófilos (del orden milimolar), donde es factible la formación de este oxidante como consecuencia de procesos inflamatorios (255, 256). En este caso, como procedimiento experimental se utilizó un electrodo sensor de sulfuro y se siguió directamente el consumo de sulfuro de hidrógeno en presencia de concentraciones crecientes y en exceso de TauCl. Los trazos cinéticos obtenidos mostraron desviaciones al ajuste exponencial, probablemente a causa de la formación de productos en la reacción que interfirieron con la señal detectada, por tanto, los datos fueron analizados utilizando una aproximación de velocidades iniciales (Figura 58). La constante de velocidad de segundo orden para la reacción fue determinada como $(303 \pm 27) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C, lo cual está de acuerdo con el hecho conocido que las cloraminas son varios órdenes de magnitud menos reactivas que el hipoclorito (148).

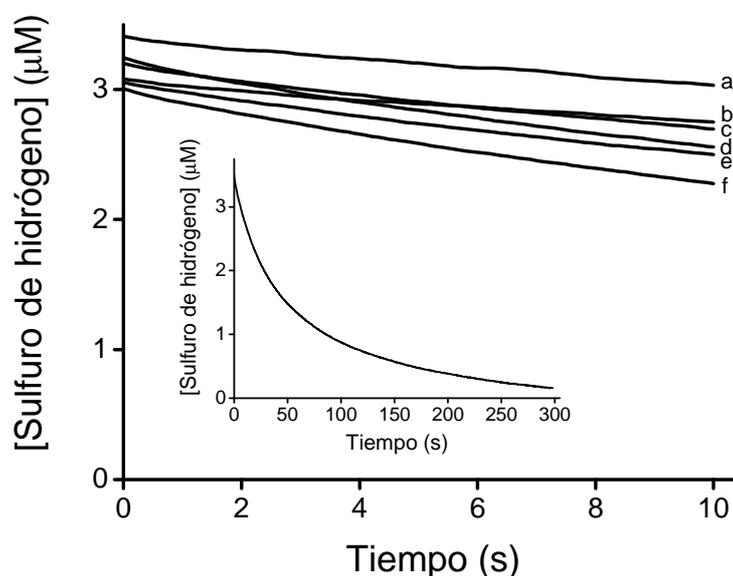


Figura 58. Constante de velocidad de la reacción del sulfuro de hidrógeno con TauCl. Se incubó sulfuro de hidrógeno ($3.5 \mu\text{M}$) con diferentes concentraciones de TauCl (a, 34.5 ; b, 46 ; c, 57.3 ; d, 79.5 ; e, 68.7 y f, $91.4 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato (0.1 M , con chelex) a pH 7.4 y 37 °C. El consumo de sulfuro fue monitoreado utilizando un sensor. Cada determinación fue realizada por triplicado que difieren en menos del 5 %. A partir de una aproximación de velocidades iniciales se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden $(303 \pm 27) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. *Inserto:* Curso temporal de la reacción entre sulfuro de hidrógeno ($3.5 \mu\text{M}$) y TauCl ($79.5 \mu\text{M}$) hasta 300 s.

5.4.6. Discusión

En esta sección del trabajo de tesis hemos caracterizado la reactividad del sulfuro de hidrógeno con diferentes oxidantes de relevancia biológica que actúan por mecanismos de oxidación por uno o dos electrones. Se determinaron las constantes de velocidad para las reacciones de oxidación del sulfuro por peroxinitrito y peróxido de hidrógeno, con valores de $(4.8 \pm 1.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(0.73 \pm 0.03) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37 °C, respectivamente. Además el sulfuro fue oxidado por el hipoclorito y TauCl con constantes de velocidad estimadas como $(8 \pm 3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(303 \pm 27) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Es interesante el hecho que las constantes de velocidad determinadas para la reacción entre el sulfuro de hidrógeno con oxidantes por dos electrones, resultan comparables a las constantes reportadas para las reacciones de oxidación de tioles de bajo peso molecular, en particular con cisteína y glutatión, tal como se ilustra en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de las constantes de velocidad para las reacciones del sulfuro de hidrógeno y los tioles de bajo peso molecular cisteína y glutatión, con oxidantes de uno y dos electrones.

	Sulfuro de hidrógeno (pK_a 7.0)	Cisteína (pK_a 8.1-8.4)	Glutatión (pK_a 8.6-9.2)
Oxidantes por dos electrones			
Peroxinitrito	$4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) Este trabajo	$4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) (257)	$1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) (163, 258)
Peróxido de hidrógeno	$0.73 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) Este trabajo	$2.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) (259)	$0.87 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) (259)
Hipoclorito	$8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) Este trabajo	$3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C) (252)	$\geq 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C) (145)
TauCl	$303 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) Este trabajo	$205 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 24 °C) (148)	$115 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 24 °C) (148)
Oxidantes por un electrón			
$\cdot\text{NO}_2$	$1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.5, 25 °C) Este trabajo	$5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0) (210)	$2.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0) (210)
$\text{HO}\cdot$	$1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 6) (240)	$3.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0) (240)	$2.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 6.8) (240)
$\text{CO}_3^{\cdot-}$	$2.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0) (239)	$4.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0) (240)	$5.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0) (240)

En el caso de la oxidación del sulfuro de hidrógeno por peroxinitrito, de acuerdo a los datos obtenidos del perfil de pH (Figura 52) y al igual que fuera propuesto para tioles de bajo peso molecular (258), el mecanismo de oxidación por dos electrones probablemente involucra el ataque nucleofílico de la forma aniónica del sulfuro (HS^-) en el átomo de oxígeno peroxídico del ácido peroxinitroso, conduciendo a la formación de nitrito y el disulfuro de hidrógeno, presumiblemente con la formación de ácido sulfénico (HSOH) como intermediario, tal como se indica en las siguientes reacciones:



Este mecanismo propuesto es consistente además con el hecho que la estequiometría de la reacción fue de 1.87 mol de sulfuro de hidrógeno oxidado por mol de peroxinitrito. Para la reacción del sulfuro con peróxido de hidrógeno, también se ha sugerido un mecanismo de oxidación análogo que implica la formación de ácido sulfénico (249, 260).

El valor de la constante de velocidad independiente del pH calculado a partir del valor obtenido a pH 7.4 para la reacción entre HS^- con el ácido peroxinitroso es de $3.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y para el peróxido de hidrógeno de $1.02 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El hecho que el peroxinitrito reaccione varios órdenes de magnitud más rápido que el peróxido de hidrógeno, significa que sigue la tendencia de dependencia de la reactividad con la acidez del grupo saliente (HNO_2 , $\text{p}K_a = 3.15$ versus H_2O , $\text{p}K_a = 15.7$) (172, 261, 262). Además las constantes de reacción independientes del pH calculadas a partir de los datos de la Tabla 5, muestran una menor reactividad intrínseca del HS^- con los diferentes oxidantes en comparación a la cisteína, por ejemplo la reactividad disminuye 1/6 con el ácido peroxinitroso, 1/25 con el peróxido de hidrógeno, 1/3 con el hipoclorito y 1/4 con la TauCl . La disminución en la reactividad es aún más acentuada cuando la comparación se realiza con el glutatión en lugar de la cisteína.

Aún teniendo en cuenta que la comparación fue realizada con datos obtenidos de orígenes diferentes, es claro que cualitativamente la tendencia del HS^- de reaccionar más lentamente que la cisteína y el glutatión se mantiene válida para otros oxidantes. En este sentido, hay dos aspectos que ayudan a comprender estos datos. En primer lugar, en el HS^- está ausente el efecto del campo inductivo de un sustituyente contiguo, como el metileno presente en los tioles alifáticos. En segundo lugar, la nucleofilicidad se correlaciona con la basicidad de Brønsted y el HS^- , con un $\text{p}K_a$ de 7.0, es menos básico que la cisteína y el glutatión. En la Figura 59, se observa que la reactividad de los tioles alifáticos hacia el peroxinitrito aumenta al aumentar el $\text{p}K_a$ (172, 263). El HS^- sigue esta tendencia e incluso reacciona más lentamente.

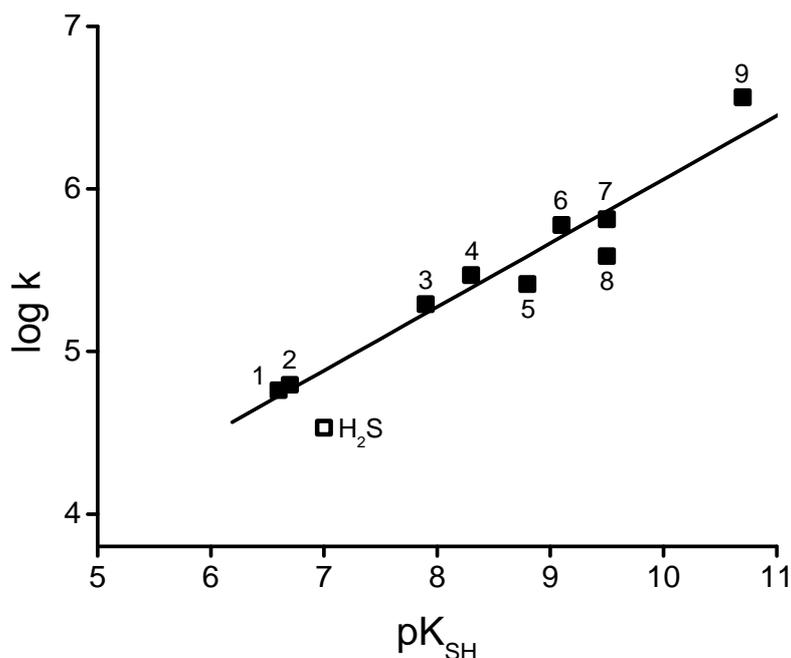


Figura 59. Comparación de la reactividad del sulfuro de hidrógeno y tioles de bajo peso molecular con el peroxinitrito.

Se grafican las reactividades intrínsecas de tiolatos (log de la constante de segundo orden independiente del pH) versus pK_a . Para tioles de bajo peso molecular se observa una correlación positiva de Brønsted, como se indica por la línea. 1, Cisteína etil éster; 2, cisteína metil éster; 3, penicilamina; 4, cisteína; 5, glutatión; 6, mercapto etilguanidina; 7, homocisteína; 8, N-acetil cisteína; 9, ácido dihidrolipoico. Adaptado de (172) y (263).

El sulfuro de hidrógeno puede también ser sujeto de oxidaciones por un electrón, en este caso en reacciones mediadas por radicales derivados del peroxinitrito tanto en ausencia como en presencia de dióxido de carbono (HO^\bullet , $^\bullet NO_2$, $CO_3^{\bullet-}$). Los valores reportados para las constantes de velocidad del sulfuro con el HO^\bullet y $CO_3^{\bullet-}$, así como el valor determinado en este trabajo para la reacción con $^\bullet NO_2$ ($1.2 \pm 0.1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ (pH 7.5, 25 °C)), también se encuentran dentro del rango de los reportados para tioles de bajo peso molecular (Tabla 5).

El mecanismo de oxidación por un electrón de tioles (RSH) da lugar a la formación del radical tiilo (RS^\bullet), que puede tener varios destinos. Por un lado puede reaccionar con oxígeno generando radicales secundarios, entre ellos radicales tílperóxilos ($RSOO^\bullet$). Alternativamente, el RS^\bullet puede combinarse con otro RS^\bullet para formar el disulfuro correspondiente, o reaccionar con el tiolato formando el radical anión disulfuro ($RSSR^{\bullet-}$), capaz de reaccionar con oxígeno y formar superóxido, el cual a su vez puede reaccionar oxidando otros tioles e iniciando una cadena de reacciones radicalares dependientes del oxígeno.

En forma análoga al comportamiento descrito para los tioles podemos extrapolar este complejo mecanismo de reacción al sulfuro de hidrógeno, cuya oxidación por un electrón conduce a la formación del radical sulfanilo, $S^{\bullet-}$. Dependiendo de las condiciones en las cuales se lleva a cabo la reacción (presencia de oxígeno, concentración de sulfuro de hidrógeno, pH), el $S^{\bullet-}$ puede participar de tres rutas que compiten entre sí: dimerizar con otro $S^{\bullet-}$ para formar el dihidrógeno disulfuro (HSSH); reaccionar con oxígeno dando lugar al reductor altamente reactivo radical anión dióxido de azufre ($SO_2^{\bullet-}$, dioxidosulfato($\bullet 1-$)), que a su vez puede ser un intermediario en la generación de superóxido; o reaccionar con HS^- para formar el radical anión disulfanilo ($HSS^{\bullet 2-}$) (Figura 60).

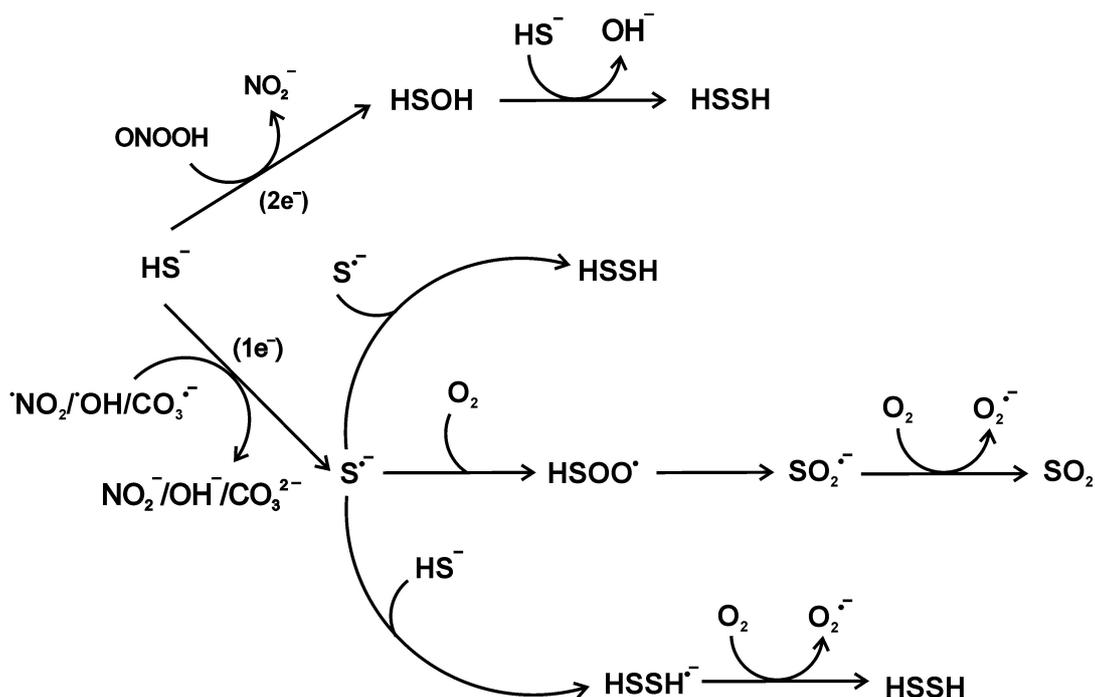


Figura 60. Mecanismo de oxidación del sulfuro de hidrógeno por peroxinitrito. En la vía de oxidación por dos electrones, el peroxinitrito reacciona con el sulfuro de hidrógeno, probablemente dando lugar a la formación de un intermediario de tipo sulfénico que reacciona con otra molécula de sulfuro para dar el disulfuro correspondiente. La vía de oxidación por un electrón implica la reacción de radicales derivados del peroxinitrito con sulfuro de hidrógeno, formando el radical sulfúrico, el cual como posibles destinos puede dimerizar formando el disulfuro, o reaccionar con oxígeno para producir el radical peroxilo, o con otro sulfuro formando el radical anión disulfuro.

Es importante tener en cuenta que la oxidación aeróbica del sulfuro de hidrógeno presenta niveles adicionales de complejidad, dado que pueden producirse una amplia gama de productos e intermediarios inestables, entre los que se incluyen los listados en la Tabla 5, y otros cuyas constantes de velocidad no han sido determinadas y por tanto no fueron incluidos, tales como el sulfuro elemental (S_8), polisulfuros (S_n^{2-} , $n = 2-9$), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulfato de hidrógeno (HSO_3^-) y sulfato (SO_4^{2-}) (249, 260, 264, 265). En cuanto a los intermediarios radicalares, además de $\text{S}^{\cdot-}$ y $\text{HSS}^{\cdot-}$, se pueden formar una gran variedad de radicales secundarios $\{\text{S}_x\text{O}_y\}^\cdot$ que participan en la cadena de reacciones radicalares dependientes del oxígeno. Hay estudios reportados en los que mediante resonancia de espín electrónico (ESR) se ha determinado la formación de $\text{S}^{\cdot-}$ y en presencia de oxígeno se detectó $\text{SO}_2^{\cdot-}$, probablemente generado vía el rearrreglo del radical anión peroxilo SOO^\cdot (239, 246, 266). Además, recientemente se ha reportado la detección de $\text{S}^{\cdot-}$ y del radical anión sulfito ($\text{SO}_3^{\cdot-}$, trióxidosulfato($\bullet 1-$)) utilizando el atrapador de espín DMPO (267). En el contexto celular, el glutatión y el ascorbato son también blancos probables para el $\text{S}^{\cdot-}$ (268). Intentamos detectar el radical sulfanilo como producto de la reacción de oxidación del sulfuro de hidrógeno por peroxinitrito, mediante EPR utilizando DMPO, sin embargo, se obtuvo señal aún en ausencia de peroxinitrito.

En conjunto, creemos que los estudios cinéticos sobre las reacciones del sulfuro de hidrógeno con diferentes oxidantes en diferentes tejidos y su compartimentación.

La concentración del sulfuro de hidrógeno en tejidos ha sido inicialmente reportada con valores en el rango micromolar, por ejemplo en el cerebro y el sistema periférico (113, 269-271). Sin embargo, los números en la literatura son variados y tienden a disminuir con el paso del tiempo. En este sentido, recientemente se han publicado valores de sulfuro significativamente menores, en el rango nanomolar, en homogenados de hígado y de cerebro de ratón (272). Además, la cantidad de sulfuro unido en el suero humano que es detectado como sulfuro libre, previa reducción con ditioneitol, fue estimada como ~1-2 μM (98, 273).

Para que una molécula pueda ser considerada como un antioxidante eficiente, capaz de atenuar el daño producido por diferentes oxidantes, debería encontrarse en una concentración suficiente y ser capaz de reaccionar rápidamente. Por lo tanto, considerando las bajas concentraciones que puede alcanzar el sulfuro en diferentes tejidos de mamíferos y de acuerdo a las relativamente bajas constantes de velocidad determinadas en este estudio, podemos concluir que las reacciones directas del sulfuro de hidrógeno, en particular con el peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno, no son lo suficientemente rápidas como para dar cuenta de los efectos protectores reportados en condiciones de estrés oxidativo, a menos que el sulfuro pueda ser administrado exógenamente como agente terapéutico o se pueda acumular localmente a altas concentraciones. El sulfuro en estado protonado podría atravesar libremente las membranas sin utilizar transportadores específicos (274), por lo que si pudiera concentrarse en compartimentos hidrofóbicos, un aspecto a considerar es su posible participación modulando reacciones oxidativas en fases lipídicas como en biomembranas y lipoproteínas donde los tioles de bajo peso molecular son escasos. Sin embargo, no hay datos publicados respecto a las propiedades de partición del sulfuro de hidrógeno en fases hidrofóbicas. Debe además ser tenido en cuenta que el mecanismo de oxidación por un electrón del sulfuro puede disparar una cadena de reacciones radicalares dependientes de oxígeno con el potencial de amplificar el daño oxidativo.

En suma, creemos que este trabajo proporciona nuevos elementos y consideraciones cinéticas acerca de la reactividad del sulfuro de hidrógeno con oxidantes por uno y dos electrones. Los resultados sugieren que el sulfuro de hidrógeno no sería un blanco preferente del peroxinitrito u otros oxidantes *in vivo*, por lo que descartamos un posible rol antioxidante, a menos que pueda ser administrado en forma exógena o que se pueda acumular localmente a altas concentraciones.

6. CONCLUSIONES

Nuestro trabajo se centró en la caracterización bioquímica de la cistationina β -sintasa, enzima clave en el metabolismo de aminoácidos azufrados. En particular nos centramos en el estudio de las propiedades redox de su inusual cofactor hemo-tiolato, con el fin de aportar al conocimiento sobre su posible rol en la enzima. A su vez, extendimos el estudio hacia el sulfuro de hidrógeno, producto secundario de la CBS y relevante gasotransmisor de creciente interés biomédico, determinando su reactividad con diferentes oxidantes. A continuación se resumen algunas de las conclusiones que hemos extraído a lo largo del trabajo de tesis.

En primer lugar se logró expresar y purificar la CBS recombinante humana en su variante trunca dimérica, realizando una exhaustiva caracterización de las propiedades bioquímicas del preparado enzimático. Se destaca la optimización del trabajo en condiciones anaeróbicas para obtener la enzima reducida mediante el uso de reductores químicos.

En segundo lugar determinamos el potencial de reducción del hemo como -291 ± 5 mV, valor en el rango del observado para otras hemoproteínas con un tiolato como ligando. Además se caracterizó la reactividad del oxígeno con el hemo reducido, determinando una constante de velocidad de $(1.11 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C. Comprobamos que la reacción de reoxidación procedió sin la formación de intermediarios detectables y sin revelar una cinética de saturación, por lo cual sugerimos un mecanismo de esfera externa. Como producto de reacción detectamos la formación de radical anión superóxido, lo cual resultó ser particularmente significativo dado que de existir el hemo reducido de la CBS *in vivo*, su reacción con oxígeno podría representar un nuevo mecanismo de formación de especies reactivas a nivel citosólico a partir de las vías del metabolismo de la homocisteína.

En tercer lugar, se analizó la posible reducción del hemo en sistemas biológicos, para lo cual se utilizaron dos aproximaciones experimentales. Por un lado se expuso la CBS a fracciones subcelulares y por otro lado se utilizaron flavoproteínas citosólicas purificadas. En los ensayos en los que se utilizó metionina sintasa reductasa en presencia de CO, constatamos la formación del producto Fe(II)CO, evidencia que sugiere la reducción del hemo de la CBS y constituye un punto de crucial importancia para seguir explorando en futuras determinaciones.

Por último, abordamos el estudio de la reactividad del sulfuro de hidrógeno con diferentes oxidantes de interés biológico. Los resultados experimentales fueron complementados con estudios de simulaciones asistidas por computadora y comparados con los de tioles de bajo peso molecular. Estos estudios muestran la relevancia de los abordajes cinéticos, para definir si moléculas con acción antioxidante *in vitro* pueden ejercer acciones antioxidantes *in vivo* y dar consistencia a interpretaciones sobre los mecanismos de acción fisiológico y farmacológico de moléculas con actividad redox.

De los resultados y observaciones experimentales realizadas en el transcurso del trabajo de Doctorado surgieron los siguientes artículos publicados en revistas arbitradas:

1. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxyxynitrite and other oxidants of biological interest. (2011) Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta E., Bartesaghi, S., Möller, MN., Folkes, LK., García-Bereguiaín, MA., Gutiérrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi R., Alvarez, B. *Free Radic Biol Med.* 50(1):196-205. Epub 2010 Oct 26.
2. Inactivation of cystathionine beta-synthase with peroxyxynitrite. (2009) Celano, L., Gil, M., Carballal, S., Durán R., Denicola, A., Banerjee R. and Alvarez, B. *Arch Biochem Biophys.* 491(1-2): 96-105.
3. Dioxygen reactivity and heme redox potential of truncated human cystathionine beta-synthase. (2008) Carballal, S., Madzellan, P., Zinola, F., Graña, M., Radi, R., Banerjee, R. and Alvarez, B. *Biochemistry*, 47(10): 3194-201.

Otras publicaciones en las cuales se participó durante este período:

1. *Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin* (2010). Alvarez, B., Carballal, S., Turell, L. and Radi, R. *Methods in Enzymology.* 473:117-36. *Review.*
2. *Sulfenic acid - A key intermediate in albumin thiol oxidation.* (2009) Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R. and Alvarez, B. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877(28):3384-92. *Review.*
3. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. (2009) Turell, L., Carballal, S., Botti, H., Radi, R. and Alvarez, B. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(4): 305-11. *Review.*
4. *Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin.* (2008) Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Freeman, B. A., Radi, R. and Alvarez, B. *Biochemistry*, 47(1): 358-67.
5. *Sulfenic acid in human serum albumin.* (2007) Carballal, S., Alvarez, B., Turell, L., Botti, H., Freeman, B. A. and Radi, R. *Amino Acids*, 32(4): 543-551. *Review.*

A continuación se destacan las tesinas co-dirigidas vinculadas a la temática:

1. Reducción de la cistationina β -sintasa por sistemas bioquímicos. Inés Marmisolle (Trabajo especial de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias). En curso.
2. Interacciones entre la cistationina β -sintasa y el sulfuro de hidrógeno. Ernesto Cuevasanta (Trabajo especial de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias). Culminado en 2008.

AGRADECIMIENTOS

A Beatriz por su excelente orientación durante estos años de formación. Por su generosidad, apoyo y dedicación constante durante la realización de la tesis y por todas las charlas y consejos siempre con una mirada crítica, positiva y alentadora. Por la generación junto a Ana, Leonor y Gerardo de un ambiente de trabajo muy agradable y estimulante, brindando la posibilidad de crecimiento y aprendizaje.

A Rafael por su apoyo constante, sus valiosas discusiones y sugerencias que ayudaron a mi formación y enriquecieron este trabajo. Por estar al frente de un grupo sólido y productivo del cual es un orgullo formar parte.

Al Proda, con quien realicé mis primeros experimentos de mesada, por darme la oportunidad de integrarme a su trabajo, transmitiendo sus conocimientos con generosidad y dedicación.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios de Facultad de Ciencias y Facultad de Medicina por todos los consejos, aportes, discusiones y buena onda dentro y fuera del laboratorio.

En lo que se refiere a este trabajo:

A Laura Celano, Inés Marmisolle y Ernesto Cuevasanta por el trabajo compartido en algunas purificaciones y ensayos con la CBS y el sulfuro de hidrógeno.

A Madia Trujillo por su colaboración en los ensayos con el sulfuro y su generoso y sólido aporte en numerosos consejos cinéticos.

A Matías Möller por su ayuda con el sensor de sulfuro y en el montaje del dispositivo para lograr anaerobiosis.

A Adriana Cassina y Valeria Valez por la gran mano en la purificación de las fracciones subcelulares.

A Verónica Demicheli por la síntesis del peroxinitrito y por tantos momentos compartidos desde nuestro ingreso al grupo.

A los integrantes de los laboratorios de Electroquímica y Química Orgánica de Facultad de Ciencias por la asistencia técnica en los experimentos electroquímicos.

A la Dra. Ruma Banerjee y los integrantes de su laboratorio por la colaboración y el apoyo brindado durante la realización de dos pasantías, en Lincoln y Ann Arbor, instancias en las que aprendí mucho y significaron un aporte bien importante para este trabajo. En el marco de estas pasantías quiero también agradecer Steve Ragsdale por la buena disposición para el uso de sus cámaras anaerobias y tanques de monóxido de carbono y a David Ballou por su asistencia técnica con su espectrofotómetro de flujo detenido y los tonómetros.

Al PEDECIBA Química y CSIC por el apoyo brindado para asistir a congresos y pasantías.

A la ANII por la beca de Doctorado otorgada que me ayudó a realizar este trabajo.

A Ruma Banerjee, María Torre y Madia Trujillo por aceptar formar parte del tribunal y su gran disposición para evaluar este trabajo.

A Matías Carbballal que me ayudó con la ilustración de la portada.

A mi familia por el apoyo continuo y por estar siempre y a los amigos.

REFERENCIAS

- (1) Raphael, A. L., and Gray, H. B. (1991) Semisynthesis of axial-ligand (position 80) mutants of cytochrome c. *J Am Chem Soc* 113, 1038-40.
- (2) Presta, A., Weber-Main, A. M., Stankovich, M. T., and Stuehr, D. J. (1998) Comparative effects of substrates and pterin cofactor on the heme midpoint potential in inducible and neuronal nitric oxide synthases. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9460-5.
- (3) Huang, Y. Y., Hara, T., Sligar, S., Coon, M. J., and Kimura, T. (1986) Thermodynamic properties of oxidation-reduction reactions of bacterial, microsomal, and mitochondrial cytochromes P-450: an entropy-enthalpy compensation effect. *Biochemistry* 25, 1390-4.
- (4) Makino, R., Chiang, R., and Hager, L. P. (1976) Oxidation-reduction potential measurements on chloroperoxidase and its complexes. *Biochemistry* 15, 4748-54.
- (5) Reijerse, E. J., Sommerhalter, M., Hellwig, P., Quentmeier, A., Rother, D., Laurich, C., Bothe, E., Lubitz, W., and Friedrich, C. G. (2007) The unusual redox centers of SoxXA, a novel c-type heme-enzyme essential for chemotrophic sulfur-oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. *Biochemistry* 46, 7804-10.
- (6) Nakajima, H., Honma, Y., Tawara, T., Kato, T., Park, S. Y., Miyatake, H., Shiro, Y., and Aono, S. (2001) Redox properties and coordination structure of the heme in the co-sensing transcriptional activator *CooA*. *J Biol Chem* 276, 7055-61.
- (7) Alric, J., Tsukatani, Y., Yoshida, M., Matsuura, K., Shimada, K., Hienerwadel, R., Schoepp-Cothenet, B., Nitschke, W., Nagashima, K. V., and Vermeiglio, A. (2004) Structural and functional characterization of the unusual triheme cytochrome bound to the reaction center of *Rhodovulum sulfidophilum*. *J Biol Chem* 279, 26090-7.
- (8) Kirilovsky, D., Roncel, M., Boussac, A., Wilson, A., Zurita, J. L., Ducruet, J. M., Bottin, H., Sugiura, M., Ortega, J. M., and Rutherford, A. W. (2004) Cytochrome c550 in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*: study of redox mutants. *J Biol Chem* 279, 52869-80.
- (9) Mosharov, E., Cranford, M. R., and Banerjee, R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 39, 13005-11.
- (10) Stipanuk, M. *Biochemical, Physiological, Molecular Aspects of Human Nutrition. Chap 14 Amino Acid Metabolism*, Second Ed. Saunders Elsevier.
- (11) Stipanuk, M. H. (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 24, 539-77.
- (12) Stipanuk, M. H., Dominy, J. E., Jr., Lee, J. I., and Coloso, R. M. (2006) Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr* 136, 1652S-1659S.
- (13) Finkelstein, J. D., and Martin, J. J. (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 259, 9508-13.
- (14) Olteanu, H., and Banerjee, R. (2001) Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 276, 35558-63.
- (15) Mudd, S. H., Finkelstein, J. D., Irreverre, F., and Laster, L. (1965) Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway. *J Biol Chem* 240, 4382-92.
- (16) Quere, I., Paul, V., Rouillac, C., Janbon, C., London, J., Demaille, J., Kamoun, P., Dufier, J. L., Abitbol, M., and Chasse, J. F. (1999) Spatial and temporal expression

- of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 127-37.
- (17) Vitvitsky, V., Thomas, M., Ghorpade, A., Gendelman, H. E., and Banerjee, R. (2006) A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* 281, 35785-93.
 - (18) Andersson, A., Isaksson, A., Brattstrom, L., and Hultberg, B. (1993) Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol- specific postcolumn derivatization. *Clin Chem* 39, 1590-7.
 - (19) Araki, A., and Sako, Y. (1987) Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422, 43-52.
 - (20) Turell, L., Carballal, S., Botti, H., Radi, R., and Alvarez, B. (2009) Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz J Med Biol Res* 42, 305-11.
 - (21) Ueland, P. M., Mansoor, M. A., Guttormsen, A. B., Muller, F., Aukrust, P., Refsum, H., and Svardal, A. M. (1996) Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status--a possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J Nutr* 126, 1281S-4S.
 - (22) McCully, K. S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56, 111-28.
 - (23) Perry, I. J., Refsum, H., Morris, R. W., Ebrahim, S. B., Ueland, P. M., and Shaper, A. G. (1995) Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 346, 1395-8.
 - (24) Zou, C. G., and Banerjee, R. (2005) Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 7, 547-59.
 - (25) Humphrey, L. L., Fu, R., Rogers, K., Freeman, M., and Helfand, M. (2008) Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 83, 1203-12.
 - (26) Clarke, R., Smith, A. D., Jobst, K. A., Refsum, H., Sutton, L., and Ueland, P. M. (1998) Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55, 1449-55.
 - (27) Mills, J. L., McPartlin, J. M., Kirke, P. N., Lee, Y. J., Conley, M. R., Weir, D. G., and Scott, J. M. (1995) Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345, 149-51.
 - (28) Refsum, H., Ueland, P. M., Nygard, O., and Vollset, S. E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 49, 31-62.
 - (29) Steegers-Theunissen, R. P., Boers, G. H., Trijbels, F. J., Finkelstein, J. D., Blom, H. J., Thomas, C. M., Borm, G. F., Wouters, M. G., and Eskes, T. K. (1994) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 43, 1475-80.
 - (30) Lee, M. E., and Wang, H. (1999) Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 9, 49-54.
 - (31) Liu, C. C., Ho, W. Y., Leu, K. L., Tsai, H. M., and Yang, T. H. (2009) Effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. *J Biochem Mol Toxicol* 23, 349-56.
 - (32) Chwatko, G., Boers, G. H., Strauss, K. A., Shih, D. M., and Jakubowski, H. (2007) Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *Faseb J* 21, 1707-13.
 - (33) Glushchenko, A. V., and Jacobsen, D. W. (2007) Molecular targeting of proteins by L-homocysteine: mechanistic implications for vascular disease. *Antioxid Redox Signal* 9, 1883-98.
 - (34) Jakubowski, H. (2008) The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 9, 155-67.

- (35) Lentz, S. R. (2005) Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3, 1646-54.
- (36) Heinecke, J. W., Rosen, H., Suzuki, L. A., and Chait, A. (1987) The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 262, 10098-103.
- (37) Heydrick, S. J., Weiss, N., Thomas, S. R., Cap, A. P., Pimentel, D. R., Loscalzo, J., and Keaney, J. F., Jr. (2004) L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 36, 632-40.
- (38) Loscalzo, J. (1996) The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 98, 5-7.
- (39) Stamler, J. S., Osborne, J. A., Jaraki, O., Rabbani, L. E., Mullins, M., Singel, D., and Loscalzo, J. (1993) Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 91, 308-18.
- (40) Bamford, V. A., Bruno, S., Rasmussen, T., Appia-Ayme, C., Cheesman, M. R., Berks, B. C., and Hemmings, A. M. (2002) Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. *Embo J* 21, 5599-610.
- (41) Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77, 669-700.
- (42) Hildebrandt, T. M., and Grieshaber, M. K. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *Febs J* 275, 3352-61.
- (43) Kraus, J. P., Janosik, M., Kozich, V., Mandell, R., Shih, V., Sperandio, M. P., Sebastio, G., de Franchis, R., Andria, G., Kluijtmans, L. A., Blom, H., Boers, G. H., Gordon, R. B., Kamoun, P., Tsai, M. Y., Kruger, W. D., Koch, H. G., Ohura, T., and Gaustadnes, M. (1999) Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* 13, 362-75.
- (44) Kraus, J. P., Oliveriusova, J., Sokolova, J., Kraus, E., Vlcek, C., de Franchis, R., Maclean, K. N., Bao, L., Bukovsk, Patterson, D., Paces, V., Ansorge, W., and Kozich, V. (1998) The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. *Genomics* 52, 312-24.
- (45) Agrawal, N., and Banerjee, R. (2008) Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine beta-synthase sumoylation. *PLoS One* 3, e4032.
- (46) Kabil, O., Zhou, Y., and Banerjee, R. (2006) Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry* 45, 13528-36.
- (47) Kery, V., Poneleit, L., and Kraus, J. P. (1998) Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch Biochem Biophys* 355, 222-32.
- (48) Taoka, S., Widjaja, L., and Banerjee, R. (1999) Assignment of enzymatic functions to specific regions of the PLP-dependent heme protein cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* 38, 13155-61.
- (49) Alexander, F. W., Sandmeier, E., Mehta, P. K., and Christen, P. (1994) Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families. *Eur J Biochem* 219, 953-60.
- (50) Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J. P., and Burkhard, P. (2001) Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *Embo J* 20, 3910-6.
- (51) Taoka, S., Lepore, B. W., Kabil, O., Ojha, S., Ringe, D., and Banerjee, R. (2002) Human cystathionine beta-synthase is a heme sensor protein. Evidence that the redox sensor is heme and not the vicinal cysteines in the CXXC motif seen in the crystal structure of the truncated enzyme. *Biochemistry* 41, 10454-61.

- (52) Jhee, K. H., McPhie, P., and Miles, E. W. (2000) Yeast cystathionine beta-synthase is a pyridoxal phosphate enzyme but, unlike the human enzyme, is not a heme protein. *J Biol Chem* 275, 11541-4.
- (53) Kery, V., Bukovska, G., and Kraus, J. P. (1994) Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein. *J Biol Chem* 269, 25283-8.
- (54) Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M., and Kruger, W. D. (2001) Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *J Biol Chem* 276, 6516-23.
- (55) Finkelstein, J. D., Kyle, W. E., Martin, J. L., and Pick, A. M. (1975) Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 66, 81-7.
- (56) Bateman, A. (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 22, 12-3.
- (57) Sen, S., Yu, J., Yamanishi, M., Schellhorn, D., and Banerjee, R. (2005) Mapping peptides correlated with transmission of intrasteric inhibition and allosteric activation in human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* 44, 14210-6.
- (58) Prudova, A., Bauman, Z., Braun, A., Vitvitsky, V., Lu, S. C., and Banerjee, R. (2006) S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6489-94.
- (59) Zou, C. G., and Banerjee, R. (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem* 278, 16802-8.
- (60) Janosik, M., Meier, M., Kery, V., Oliveriusova, J., Burkhard, P., and Kraus, J. P. (2001) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the active core of human recombinant cystathionine beta-synthase: an enzyme involved in vascular disease. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 289-91.
- (61) DeLano, W. L. (2002) in *DeLano Scientific*, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
- (62) Jhee, K. H., McPhie, P., and Miles, E. W. (2000) Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine beta-synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *Biochemistry* 39, 10548-56.
- (63) Aitken, S. M., and Kirsch, J. F. (2003) Kinetics of the yeast cystathionine beta-synthase forward and reverse reactions: continuous assays and the equilibrium constant for the reaction. *Biochemistry* 42, 571-8.
- (64) Taoka, S., and Banerjee, R. (2002) Stopped-flow kinetic analysis of the reaction catalyzed by the full-length yeast cystathionine beta-synthase. *J Biol Chem* 277, 22421-5.
- (65) Weeks, C. L., Singh, S., Madzellan, P., Banerjee, R., and Spiro, T. G. (2009) Heme regulation of human cystathionine beta-synthase activity: insights from fluorescence and Raman spectroscopy. *J Am Chem Soc* 131, 12809-16.
- (66) Chen, X., Jhee, K. H., and Kruger, W. D. (2004) Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* 279, 52082-6.
- (67) Banerjee, R., and Zou, C. G. (2005) Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch Biochem Biophys* 433, 144-56.
- (68) Taoka, S., Ohja, S., Shan, X., Kruger, W. D., and Banerjee, R. (1998) Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* 273, 25179-84.
- (69) Green, E. L., Taoka, S., Banerjee, R., and Loehr, T. M. (2001) Resonance Raman characterization of the heme cofactor in cystathionine beta-synthase. Identification

- of the Fe-S(Cys) vibration in the six-coordinate low-spin heme. *Biochemistry* 40, 459-63.
- (70) Ojha, S., Hwang, J., Kabil, O., Penner-Hahn, J. E., and Banerjee, R. (2000) Characterization of the heme in human cystathionine beta-synthase by X-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies. *Biochemistry* 39, 10542-7.
- (71) de Rosny, E., de Groot, A., Jullian-Binard, C., Gaillard, J., Borel, F., Pebay-Peyroula, E., Fontecilla-Camps, J. C., and Jouve, H. M. (2006) Drosophila nuclear receptor E75 is a thiolate hemoprotein. *Biochemistry* 45, 9727-34.
- (72) Igarashi, J., Sato, A., Kitagawa, T., Yoshimura, T., Yamauchi, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004) Activation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase by nitric oxide is induced by the formation of a five-coordinate NO-heme complex: optical absorption, electron spin resonance, and resonance raman spectral studies. *J Biol Chem* 279, 15752-62.
- (73) Kim, I. C., and Deal, W. C., Jr. (1976) Isolation and properties of a new, soluble, hemoprotein (H-450) from pig liver. *Biochemistry* 15, 4925-30.
- (74) Omura, T., Sadano, H., Hasegawa, T., Yoshida, Y., and Kominami, S. (1984) Hemoprotein H-450 identified as a form of cytochrome P-450 having an endogenous ligand at the 6th coordination position of the heme. *J Biochem* 96, 1491-500.
- (75) Svastits, E. W., Alberta, J. A., Kim, I. C., and Dawson, J. H. (1989) Magnetic circular dichroism studies of the active site structure of hemoprotein H-450: comparison to cytochrome P-450 and sensitivity to pH effects. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 1170-6.
- (76) Taoka, S., West, M., and Banerjee, R. (1999) Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine beta-synthase reveals nonequivalent active sites. *Biochemistry* 38, 2738.
- (77) Celano, L., Gil, M., Carballal, S., Duran, R., Denicola, A., Banerjee, R., and Alvarez, B. (2009) Inactivation of cystathionine beta-synthase with peroxyntirite. *Arch Biochem Biophys* 491, 96-105.
- (78) Taoka, S., Green, E. L., Loehr, T. M., and Banerjee, R. (2001) Mercuric chloride-induced spin or ligation state changes in ferric or ferrous human cystathionine beta-synthase inhibit enzyme activity. *J Inorg Biochem* 87, 253-9.
- (79) Taoka, S., and Banerjee, R. (2001) Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *J Inorg Biochem* 87, 245-51.
- (80) Puranik, M., Weeks, C. L., Lahaye, D., Kabil, O., Taoka, S., Nielsen, S. B., Groves, J. T., Banerjee, R., and Spiro, T. G. (2006) Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase. *J Biol Chem* 281, 13433-8.
- (81) Carraway, M. S., Ghio, A. J., Carter, J. D., and Piantadosi, C. A. (2000) Expression of heme oxygenase-1 in the lung in chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L806-12.
- (82) Ingi, T., Chiang, G., and Ronnett, G. V. (1996) The regulation of heme turnover and carbon monoxide biosynthesis in cultured primary rat olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 16, 5621-8.
- (83) Singh, S., Madzellan, P., and Banerjee, R. (2007) Properties of an unusual heme cofactor in PLP-dependent cystathionine beta-synthase. *Nat Prod Rep* 24, 631-9.
- (84) Vadon-Le Goff, S., Delaforge, M., Boucher, J. L., Janosik, M., Kraus, J. P., and Mansuy, D. (2001) Coordination chemistry of the heme in cystathionine beta-synthase: formation of iron(II)-isonitrile complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 487-92.
- (85) Berzofsky, J. A., Peisach, J., and Blumberg, W. E. (1971) Sulfheme proteins. I. Optical and magnetic properties of sulfmyoglobin and its derivatives. *J Biol Chem* 246, 3367-77.

- (86) Cuevasanta, E. (2008) in *Trabajo especial de la Licenciatura en Bioquímica.*, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- (87) Kabil, O., Toaka, S., LoBrutto, R., Shoemaker, R., and Banerjee, R. (2001) Pyridoxal phosphate binding sites are similar in human heme-dependent and yeast heme-independent cystathionine beta-synthases. Evidence from ³¹P NMR and pulsed EPR spectroscopy that heme and PLP cofactors are not proximal in the human enzyme. *J Biol Chem* 276, 19350-5.
- (88) Bruno, S., Schiaretti, F., Burkhard, P., Kraus, J. P., Janosik, M., and Mozzarelli, A. (2001) Functional properties of the active core of human cystathionine beta-synthase crystals. *J Biol Chem* 276, 16-9.
- (89) Katsushima, F., Oliveriusova, J., Sakamoto, O., Ohura, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Kraus, E., Stouracova, R., and Kraus, J. P. (2006) Expression study of mutant cystathionine beta-synthase found in Japanese patients with homocystinuria. *Mol Genet Metab* 87, 323-8.
- (90) Yamanishi, M., Kabil, O., Sen, S., and Banerjee, R. (2006) Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathionine-beta-synthase. *J Inorg Biochem* 100, 1988-95.
- (91) Ojha, S., Wu, J., LoBrutto, R., and Banerjee, R. (2002) Effects of heme ligand mutations including a pathogenic variant, H65R, on the properties of human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* 41, 4649-54.
- (92) Evande, R., Ojha, S., and Banerjee, R. (2004) Visualization of PLP-bound intermediates in hemeless variants of human cystathionine beta-synthase: evidence that lysine 119 is a general base. *Arch Biochem Biophys* 427, 188-96.
- (93) Cherney, M. M., Pazicni, S., Frank, N., Marvin, K. A., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2007) Ferrous human cystathionine beta-synthase loses activity during enzyme assay due to a ligand switch process. *Biochemistry* 46, 13199-210.
- (94) Pazicni, S., Cherney, M. M., Lukat-Rodgers, G. S., Oliveriusova, J., Rodgers, K. R., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2005) The heme of cystathionine beta-synthase likely undergoes a thermally induced redox-mediated ligand switch. *Biochemistry* 44, 16785-95.
- (95) Singh, S., Madzellan, P., Stasser, J., Weeks, C. L., Becker, D., Spiro, T. G., Penner-Hahn, J., and Banerjee, R. (2009) Modulation of the heme electronic structure and cystathionine beta-synthase activity by second coordination sphere ligands: The role of heme ligand switching in redox regulation. *J Inorg Biochem* 103, 689-97.
- (96) Cotton, F., and Wilkinson, G. (1988) *Advanced Inorganic Chemistry*, New York.
- (97) Siegel, L. M. (1965) A Microdetermination for Sulfide. *Analytical Biochemistry* 11, 126-32.
- (98) Ubuka, T. (2002) Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781, 227-49.
- (99) Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., and Kimura, H. (2009) 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid. Redox. Signal.* 11, 703-14.
- (100) Stipanuk, M. H., and Beck, P. W. (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206, 267-77.
- (101) Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., Darley-Usmar, V. M., Doeller, J. E., and Kraus, D. W. (2007) Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17977-82.
- (102) Singh, S., Padovani, D., Leslie, R. A., Chiku, T., and Banerjee, R. (2009) Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J Biol Chem* 284, 22457-66.
- (103) Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V., and Banerjee, R. (2009) H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 284, 11601-12.

- (104) Ubuka, T., Umemura, S., Yuasa, S., Kinuta, M., and Watanabe, K. (1978) Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiol Chem Phys* 10, 483-500.
- (105) Kabil, O., and Banerjee, R. (2010) Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* 285, 21903-7.
- (106) Bartholomew, T. C., Powell, G. M., Dodgson, K. S., and Curtis, C. G. (1980) Oxidation of sodium sulphide by rat liver, lungs and kidney. *Biochem Pharmacol* 29, 2431-7.
- (107) Whitfield, N. L., Kreimier, E. L., Verdial, F. C., Skovgaard, N., and Olson, K. R. (2008) Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R1930-7.
- (108) Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E., and Levitt, M. D. (2001) Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem Pharmacol* 62, 255-9.
- (109) Giulivi, C., and Cadenas, E. (1994) Ferrylmyoglobin: formation and chemical reactivity toward electron-donating compounds. *Methods Enzymol* 233, 189-202.
- (110) Pietri, R., Lewis, A., Leon, R. G., Casabona, G., Kiger, L., Yeh, S. R., Fernandez-Alberti, S., Marden, M. C., Cadilla, C. L., and Lopez-Garriga, J. (2009) Factors controlling the reactivity of hydrogen sulfide with heme proteins. *Biochemistry* 48, 4881-94.
- (111) Szabo, C. (2007) Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6, 917-35.
- (112) Abe, K., and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16, 1066-71.
- (113) Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *Embo J* 20, 6008-16.
- (114) Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., and Wang, R. (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322, 587-90.
- (115) Hill, B. C., Woon, T. C., Nicholls, P., Peterson, J., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1984) Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. *Biochem J* 224, 591-600.
- (116) Blackstone, E., Morrison, M., and Roth, M. B. (2005) H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 308, 518.
- (117) Jha, S., Calvert, J. W., Duranski, M. R., Ramachandran, A., and Lefer, D. J. (2008) Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H801-6.
- (118) Sivarajah, A., Collino, M., Yasin, M., Benetti, E., Gallicchio, M., Mazzon, E., Cuzzocrea, S., Fantozzi, R., and Thiemermann, C. (2009) Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* 31, 267-74.
- (119) Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C. W., and Lefer, D. J. (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15560-5.
- (120) Fu, Z., Liu, X., Geng, B., Fang, L., and Tang, C. (2008) Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci* 82, 1196-202.
- (121) Kimura, Y., and Kimura, H. (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *Faseb J* 18, 1165-7.
- (122) Yonezawa, D., Sekiguchi, F., Miyamoto, M., Taniguchi, E., Honjo, M., Masuko, T., Nishikawa, H., and Kawabata, A. (2007) A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium. *Toxicology* 241, 11-8.

- (123) Laggner, H., Muellner, M. K., Schreier, S., Sturm, B., Hermann, M., Exner, M., Gmeiner, B. M., and Kapiotis, S. (2007) Hydrogen sulphide: a novel physiological inhibitor of LDL atherogenic modification by HOCl. *Free Radic Res* 41, 741-7.
- (124) Whiteman, M., Armstrong, J. S., Chu, S. H., Jia-Ling, S., Wong, B. S., Cheung, N. S., Halliwell, B., and Moore, P. K. (2004) The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 90, 765-8.
- (125) Whiteman, M., Cheung, N. S., Zhu, Y. Z., Chu, S. H., Siau, J. L., Wong, B. S., Armstrong, J. S., and Moore, P. K. (2005) Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 326, 794-8.
- (126) Fridovich, I. (1984) Overview: biological sources of O₂. *Methods Enzymol* 105, 59-61.
- (127) Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264, 7761-4.
- (128) Klug, D., Rabani, J., and Fridovich, I. (1972) A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 247, 4839-42.
- (129) Wood, P. (1987) The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *Trends Biochem. Sci.* 12, 250-251.
- (130) Koppenol, W. H. (1985) The reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide: evidence against hydroxyl radical formation. *J Free Radic Biol Med* 1, 281-5.
- (131) Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112.
- (132) Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B., and White, C. W. (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 270, 13399-405.
- (133) Takahashi, M. A., and Asada, K. (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 226, 558-66.
- (134) Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-30.
- (135) Pryor, W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48, 657-67.
- (136) Buettner, G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300, 535-43.
- (137) Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984) Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol* 105, 47-56.
- (138) Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383, 347-64.
- (139) Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40.
- (140) Halliwell, B., Clement, M. V., and Long, L. H. (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486, 10-3.
- (141) Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85.
- (142) Harrison, J. E., and Schultz, J. (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 251, 1371-4.
- (143) Winterbourn, C. C., and Kettle, A. J. (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 29, 403-9.
- (144) Morris, J. C. (1966) The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35°. *The Journal of Physical Chemistry* 70, 3798-3805.
- (145) Folkes, L. K., Candeias, L. P., and Wardman, P. (1995) Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch Biochem Biophys* 323, 120-6.

- (146) Prutz, W. A. (1996) Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys* 332, 110-20.
- (147) Winterbourn, C. C. (1985) Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochim Biophys Acta* 840, 204-10.
- (148) Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2001) Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med* 30, 572-9.
- (149) Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2006) Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med* 40, 45-53.
- (150) Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., and Darley-Usmar, V. M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1411, 385-400.
- (151) Wink, D. A., and Mitchell, J. B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25, 434-56.
- (152) Marletta, M. A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78, 927-30.
- (153) Stuehr, D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411, 217-30.
- (154) Murad, F. (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 26, 19-33.
- (155) Zhao, Y., Brandish, P. E., Ballou, D. P., and Marletta, M. A. (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14753-8.
- (156) Baker, P. R., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M., Branchaud, B. P., Chen, Y. E., and Freeman, B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 280, 42464-75.
- (157) Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 269, 26066-75.
- (158) Beckman, J. S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 1620-1624.
- (159) Goldstein, S., and Czapski, G. (1995) The reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 19, 505-10.
- (160) Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993) The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18, 195-9.
- (161) Kissner, R., Nausner, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol* 10, 1285-92.
- (162) Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Rubbo, H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite., in *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L., Ed.) pp 57-82, Academic Press, San Diego, CA.
- (163) Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5, 834-42.

- (164) Merenyi, G., and Lind, J. (1997) Thermodynamics of peroxyxynitrite and its CO₂ adduct. *Chem Res Toxicol* 10, 1216-20.
- (165) Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (1998) Slowing of peroxyxynitrite decomposition in the presence of mannitol and ethanol. *Free Radic Biol Med* 24, 1331-7.
- (166) Merenyi, G., Lind, J., Goldstein, S., and Czapski, G. (1998) Peroxyxynitrous acid homolyzes into *OH and *NO₂ radicals. *Chem Res Toxicol* 11, 712-3.
- (167) Gerasimov, O. V., and Lymar, S. V. (1999) The yield of hydroxyl radical from the decomposition of peroxyxynitrous acid. *Inorg. Chem.* 38, 4317-4321.
- (168) Goldstein, S., and Czapski, G. (1995) Direct and indirect oxidations by peroxyxynitrite. *Inorg. Chem.* 34, 4041-48.
- (169) Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxyxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 4, 161-77.
- (170) Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W. H., Rees, J. F., and Knoops, B. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxyxynitrite reductase. *FEBS Lett* 571, 161-5.
- (171) Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxyxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch Biochem Biophys* 484, 146-54.
- (172) Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch Biochem Biophys* 467, 95-106.
- (173) Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxyxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 333, 49-58.
- (174) Goldstein, S., and Czapski, G. (1998) Formation of Peroxyxynitrate from the Reaction of Peroxyxynitrite with CO₂: Evidence for Carbonate Radical Production. *J Am Chem Soc* 120, 3458-63.
- (175) Lymar, S. V., Hurst, J.K. (1998) CO₂-Catalyzed one-electron oxidations by peroxyxynitrite: properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.* 37, 294-301.
- (176) Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., and Augusto, O. (2007) The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life* 59, 255-62.
- (177) Bonini, M. G., and Augusto, O. (2001) Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfanyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxyxynitrite. *J Biol Chem* 276, 9749-54.
- (178) Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 32, 841-59.
- (179) Shan, X., and Kruger, W. D. (1998) Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nat Genet* 19, 91-3.
- (180) 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.
- (181) Berry, E. A., and Trumpower, B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* 161, 1-15.
- (182) Ellman, G., and Lysko, H. (1979) A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem* 93, 98-102.
- (183) Kashiwamata, S., and Greenberg, D. M. (1970) Studies on cystathionine synthase of rat liver. Properties of the highly purified enzyme. *Biochim Biophys Acta* 212, 488-500.
- (184) Kraus, J., Packman, S., Fowler, B., and Rosenberg, L. E. (1978) Purification and properties of cystathionine beta-synthase from human liver. Evidence for identical subunits. *J Biol Chem* 253, 6523-8.

- (185) Kraus, J. P. (1987) Cystathionine beta-synthase (human). *Methods Enzymol* 143, 388-94.
- (186) Holmgren, A., and Bjornstedt, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252, 199-208.
- (187) Patil, P. V., and Ballou, D. P. (2000) The use of protocatechuate dioxygenase for maintaining anaerobic conditions in biochemical experiments. *Anal Biochem* 286, 187-92.
- (188) Schellenberg, K. A., and Hellerman, L. (1958) Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 231, 547-56.
- (189) Balahura, R. J., and Johnson, M. D. (1987) Outer-sphere dithionite reductions of metal complexes. *Inorganic Chemistry* 26, 3860-3.
- (190) Seefeldt, L. C., and Ensign, S. A. (1994) A continuous, spectrophotometric activity assay for nitrogenase using the reductant titanium(III) citrate. *Anal Biochem* 221, 379-86.
- (191) Dutton, P. L. (1978) Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. *Methods Enzymol* 54, 411-35.
- (192) Fultz, M. L., and Durst, R. A. (1982) Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. *Analytica Chimica Acta* 140, 1-18.
- (193) Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. (1986) *Data for biochemical research*, Third edition ed., Walton Street, Oxford, New York.
- (194) Castle, J. D. (2004) *Purification of Organelles from Mammalian Cells*, John Wiley & Sons Inc.
- (195) Armstrong, J. M. (1964) The Molar Extinction Coefficient of 2,6-Dichlorophenol Indophenol. *Biochim Biophys Acta* 86, 194-7.
- (196) Finn, R. D., Basran, J., Roitel, O., Wolf, C. R., Munro, A. W., Paine, M. J., and Scrutton, N. S. (2003) Determination of the redox potentials and electron transfer properties of the FAD- and FMN-binding domains of the human oxidoreductase NR1. *Eur J Biochem* 270, 1164-75.
- (197) Saha, A., Goldstein, S., Cabelli, D., and Czapski, G. (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxyxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic Biol Med* 24, 653-9.
- (198) Hughes, M. N., Nicklin, H.G. (1968) The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J. Chem. Soc. A*, 450-456.
- (199) Claiborne, A. (1985) Catalase activity, in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* pp 283-284, CRC Press. Inc., Boca Raton.
- (200) Carrel Morris, J. (1966) The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *The Journal of Physical Chemistry* 70, 3798-3805.
- (201) Thomas, E. L., Grisham, M. B., and Jefferson, M. M. (1986) Preparation and characterization of chloramines. *Methods Enzymol* 132, 569-85.
- (202) Awtrey, A. D., Connick, R. E. (1951) The Absorption Spectra of I_2 , I_3^- , I^- , IO_3^- , $S_4O_6^{2-}$ and $S_2O_3^{2-}$. Heat of the Reaction $I_3^- = I_2 + I^-$. *Journal of the American Chemical Society* 73, 1842-3.
- (203) Massey, V. (1959) The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 34, 255-6.
- (204) Tarpey, M. M., and Fridovich, I. (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite. *Circ Res* 89, 224-36.
- (205) McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-55.
- (206) Misra, H. P., and Fridovich, I. (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J Biol Chem* 246, 6886-90.
- (207) Pazicni, S., Lukat-Rodgers, G. S., Oliveriusova, J., Rees, K. A., Parks, R. B., Clark, R. W., Rodgers, K. R., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2004) The redox

- behavior of the heme in cystathionine beta-synthase is sensitive to pH. *Biochemistry* 43, 14684-95.
- (208) Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., and Eaton, A. D. (1998) Standard Methods for the Examination of Water and
- (209) Fogo, J. K., Popowsky, M. (1949) Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide. *Analytical Chemistry* 21, 732-4.
- (210) Ford, E., Hughes, M. N., and Wardman, P. (2002) Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radic Biol Med* 32, 1314-23.
- (211) Childs, R. E., and Bardsley, W. G. (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145, 93-103.
- (212) Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem Sci* 22, 361-3.
- (213) Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10037-41.
- (214) Bukovska, G., Kery, V., and Kraus, J. P. (1994) Expression of human cystathionine beta-synthase in Escherichia coli: purification and characterization. *Protein Expr Purif* 5, 442-8.
- (215) Marmisolle, I. (2011) in *Trabajo especial de la Licenciatura en Bioquímica.*, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- (216) Frank, N., Kery, V., Maclean, K. N., and Kraus, J. P. (2006) Solvent-accessible cysteines in human cystathionine beta-synthase: crucial role of cysteine 431 in S-adenosyl-L-methionine binding. *Biochemistry* 45, 11021-9.
- (217) Aslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizuete, A., Pueyo, C., and Holmgren, A. (1994) Two additional glutaredoxins exist in Escherichia coli: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9813-7.
- (218) Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264, 13963-6.
- (219) Dawson, J. H. (1988) Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* 240, 433-9.
- (220) Poulos, T. L. (1996) The role of the proximal ligand in heme enzymes. *J Biol Inorg Chem* 1, 356-9.
- (221) Lambeth, D. O., and Palmer, G. (1973) The kinetics and mechanism of reduction of electron transfer proteins and other compounds of biological interest by dithionite. *J Biol Chem* 248, 6095-103.
- (222) Creutz, C., and Sutin, N. (1974) Kinetics of the reactions of sodium dithionite with dioxygen and hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry* 13, 2041-3.
- (223) Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44, 276-87.
- (224) Heacock, R. A. (1959) The chemistry of adrenochrome and related compounds. *Chem. Rev.* 59, 181-237.
- (225) Heacock, R. A., and Scott, B. D. (1959) The reduction of adrenochrome with thiols. *Can J Biochem Physiol* 37, 1087-8.
- (226) Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A., Rybak-Akimova, E. V., Buchalova, M., and Busch, D. H. (1998) Mechanisms of autoxidation of the oxygen sensor FixL and Aplysia myoglobin: implications for oxygen-binding heme proteins. *Biochemistry* 37, 10188-94.
- (227) Butler, J., Koppenol, W. H., and Margoliash, E. (1982) Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome c by the superoxide anion. *J Biol Chem* 257, 10747-50.

- (228) Chu, M. M., Castro, C. E., and Hathaway, G. M. (1978) Oxidation of low-spin iron(II) porphyrins by molecular oxygen. An outer sphere mechanism. *Biochemistry* 17, 481-6.
- (229) Isogai, Y., Iizuka, T., Makino, R., Iyanagi, T., and Orii, Y. (1993) Superoxide-producing cytochrome b. Enzymatic and electron paramagnetic resonance properties of cytochrome b558 purified from neutrophils. *J Biol Chem* 268, 4025-31.
- (230) Vermilion, J. L., and Coon, M. J. (1978) Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* 253, 8812-9.
- (231) Sled, V. D., Rudnitzky, N. I., Hatefi, Y., and Ohnishi, T. (1994) Thermodynamic analysis of flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* 33, 10069-75.
- (232) Wolthers, K. R., Basran, J., Munro, A. W., and Scrutton, N. S. (2003) Molecular dissection of human methionine synthase reductase: determination of the flavin redox potentials in full-length enzyme and isolated flavin-binding domains. *Biochemistry* 42, 3911-20.
- (233) Harris, C. M., Sanders, S. A., and Massey, V. (1999) Role of the flavin midpoint potential and NAD binding in determining NAD versus oxygen reactivity of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 274, 4561-9.
- (234) Porter, T. D., and Kasper, C. B. (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* 25, 1682-7.
- (235) Paine, M. J., Garner, A. P., Powell, D., Sibbald, J., Sales, M., Pratt, N., Smith, T., Tew, D. G., and Wolf, C. R. (2000) Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *J Biol Chem* 275, 1471-8.
- (236) Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J* 322, 167-73.
- (237) Alvarez, B., and Radi, R. (2001) Peroxynitrite decay in the presence of hydrogen peroxide, mannitol and ethanol: a reappraisal. *Free Radic Res* 34, 467-75.
- (238) Karoui, H., Hogg, N., Frejaville, C., Tordo, P., and Kalyanaraman, B. (1996) Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem* 271, 6000-9.
- (239) Das, T. N., Huie, R. E., Neta, P., and Padmaja, S. (1999) Reduction Potential of the Sulfhydryl Radical: Pulse Radiolysis and Laser Flash Photolysis Studies of the Formation and Reactions of $\cdot\text{SH}$ and $\text{HSSH}^{\cdot-}$ in Aqueous Solutions. *Journal of Physical Chemistry A* 103, 5221-6.
- (240) Ross, A. B., Mallard, W. G., Helman, W. P., Buxton, G. V., Huie, R. E., and Neta, P. (1998) NDRL-NIST Solution Kinetics Database - Ver. 3. Notre Dame, IN and NIST Standard Reference Data, Radiation Laboratory, Gaithersburg, MD.
- (241) Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J., and Merenyi, G. (2000) Tyrosine nitration by simultaneous generation of $(\cdot)\text{NO}$ and $\text{O}(^2)$ under physiological conditions. How the radicals do the job. *J Biol Chem* 275, 3031-6.
- (242) Goldstein, S., and Czapski, G. (1997) Reactivity of peroxynitric acid: a pulse radiolysis study. *Inorg Chem* 36, 4156-4162.
- (243) Logager, T., and Sehested, K. (1993) Formation and decay of peroxynitric acid: a pulse radiolysis study. *J Phys Chem* 97, 10047-10052.
- (244) Ashby, M. T., and Nagy, P. (2006) On the kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J Pharm Sci* 95, 15-8.
- (245) Jones, C. M., Lawrence, A., Wardman, P., and Burkitt, M. J. (2002) Electron paramagnetic resonance spin trapping investigation into the kinetics of glutathione oxidation by the superoxide radical: re-evaluation of the rate constant. *Free Radic Biol Med* 32, 982-90.

- (246) Mills, G., Schmidt, K. H., Matheson, M. S., and Meisel, D. (1987) Thermal and photochemical reactions of sulfhydryl radicals. Implications for colloid photocorrosion. *Journal of Physical Chemistry* 91, 1590-6.
- (247) Schwartz, S. E., and Freiberg, J. E. (1981) Mass-transport limitation to the rate of reaction of gases in liquid droplets: application to oxidation of SO₂ in aqueous solutions. *Atmos. Environ.* 15, 1129-1144.
- (248) Wolfenden, B. S., and Willson, R. L. (1982) Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society [Perkin Transactions 2]*, 805-12.
- (249) Hoffmann, M. R. (1977) Kinetics and mechanism of oxidation of hydrogen sulfide by hydrogen peroxide in acidic solution. *Environ Sci Technol* 11, 61-6.
- (250) Millero, F. J., LeFerriere, A., Fernandez, M., Hubinger, S., and Hershey, J. P. (1989) Oxidation of hydrogen sulfide with hydrogen peroxide in natural waters. *Environ Sci Technol* 23, 209-13.
- (251) Resch, P., Field, R. J., Schneider, F. W., and Burger, M. (1989) Reduction of methylene blue by sulfide ion in the presence and absence of oxygen: simulation of the methylene blue-O₂-HS- CSTR oscillations. *Journal of Physical Chemistry* 93, 8181-6.
- (252) Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol* 14, 1453-64.
- (253) Espenson, J. H. (1995) *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, 2nd Ed., McGraw-Hill, Inc., New York.
- (254) Nagy, P., and Winterbourn, C. C. Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chem Res Toxicol*.
- (255) Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (2006) The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 136, 1636S-1640S.
- (256) Learn, D. B., Fried, V. A., and Thomas, E. L. (1990) Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J Leukoc Biol* 48, 174-82.
- (257) Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266, 4244-50.
- (258) Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic Acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch Biochem Biophys* 397, 91-8.
- (259) Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 27, 322-8.
- (260) Rábai, G., Orbán, M., and Epstein, I. R. (1992) A model of pH-regulated oscillatory reaction between hydrogen peroxide and sulfide ion. *J Phys Chem* 96, 5414-5419.
- (261) Edwards, J. O. (1962) *Nucleophilic displacement on oxygen in peroxides*, Wiley Interscience, New York.
- (262) Trindade, D. F., Cerchiaro, G., and Augusto, O. (2006) A role for peroxymonocarbonate in the stimulation of biothiol peroxidation by the bicarbonate/carbon dioxide pair. *Chem Res Toxicol* 19, 1475-82.
- (263) Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J. M., Romero, N., Castro, L., Thomson, L., and Radi, R. (2010) *Mechanisms and biological consequences of peroxynitrite-dependent protein oxidation and nitration* Academic Press, San Diego.
- (264) Chen, K. Y., and Carrel Morris, J. (1972) Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ. Sci. Technol.* 6.
- (265) O'Brien, D. J., and Birkner, F. B. (1977) Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 11, 1114-1120.

- (266) Zhu, J., Petit, K., Colson, A. O., DeBolt, S., and Sevilla, M. D. (1991) Reactions of sulfhydryl and sulfide radicals with oxygen, hydrogen sulfide, hydrosulfide, and sulfide: formation of SO_2^- , HSSH^- , HSS^{2-} and HSS^- *Journal of Physical Chemistry* 95, 3676-81.
- (267) Stasko, A., Brezova, V., Zalibera, M., Biskupic, S., and Ondrias, K. (2009) Electron transfer: a primary step in the reactions of sodium hydrosulphide, an $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}(-)$ donor. *Free Radic Res* 43, 581-93.
- (268) Wardman, P., and von Sonntag, C. (1995) Kinetic factors that control the fate of thyl radicals in cells. *Methods Enzymol* 251, 31-45.
- (269) Goodwin, L. R., Francom, D., Dieken, F. P., Taylor, J. D., Warenycia, M. W., Reiffenstein, R. J., and Dowling, G. (1989) Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol* 13, 105-9.
- (270) Mitchell, T. W., Savage, J. C., and Gould, D. H. (1993) High-performance liquid chromatography detection of sulfide in tissues from sulfide-treated mice. *J Appl Toxicol* 13, 389-94.
- (271) Savage, J. C., and Gould, D. H. (1990) Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 526, 540-5.
- (272) Furne, J., Saeed, A., and Levitt, M. D. (2008) Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1479-85.
- (273) Ogasawara, Y., Ishii, K., Togawa, T., and Tanabe, S. (1993) Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 215, 73-81.
- (274) Mathai, J. C., Missner, A., Kugler, P., Saparov, S. M., Zeidel, M. L., Lee, J. K., and Pohl, P. (2009) No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16633-8.