



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Estudio de la reacción de la hemoperoxidasa híbrida tipo A de
Trypanosoma cruzi (APx-CcP) con peroxinitrito *in vitro* e *in vivo***

Vera Skafar Amen

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Universidad de la República
Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Lugar de realización:

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)

Marzo de 2022

**Estudio de la reacción de la hemoperoxidasa híbrida tipo A de
Trypanosoma cruzi (APx-CcP) con peroxinitrito *in vitro* e *in vivo***

Tribunal:

Dr. Ari Zeida

Dra. Lucía Turell

Dra. Adriana Parodi

Dra. Lucía Piacenza, Director

Dr. Rafael Radi, Director

Estudio de la reacción de la hemoperoxidasa híbrida tipo A de *Trypanosoma cruzi*
(APx-CcP) con peroxinitrito *in vitro* e *in vivo*

Vera Skafar Amen

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTORES: Dra. Lucía Piacenza y Dr. Rafael Radi

Universidad de la República

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Centro de Investigaciones Biomédicas

Reaction of a *Trypanosoma cruzi* hybrid type A heme peroxidase (APx-CcP) with
peroxynitrite *in vitro* and *in vivo*

Vera Skafar Amen

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTORS: Dr. Lucía Piacenza and Dr. Rafael Radi

Universidad de la República

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Centro de Investigaciones Biomédicas

Agradecimientos

A mis directores de tesis Rafael y Lucía, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y por la enorme oportunidad de formación en biología redox. Gracias por su apoyo constante en estos años.

En especial quiero agradecer a Lucía, porque tenerla de directora de tesis es lo mejor que me podría haber pasado. Gracias por la dedicación infinita a mi formación, por haber estado presente en el día a día y por haberme enseñado tanto de bioquímica. Mi maestría no fue fácil porque transcurrió prácticamente por completo en pandemia y pude salir adelante y llegar hasta acá gracias a ella.

A María Noel, con quien voy a estar eternamente agradecida. Gracias por siempre aconsejarme, guiarme y por tener confianza en mí. Gracias también por haberme transmitido el entusiasmo por la ciencia y por las enseñanzas sobre docencia.

A Emma Raven y Samuel Freeman, porque trabajaron en colaboración en este proyecto y aprendí mucho con ellos.

A Madia, porque contribuyó mucho al desarrollo de este trabajo con sus aportes en las reuniones de grupo.

A Alejandra, porque fue muy importante en los inicios de mi maestría y mis primeros pasos en el laboratorio.

A mis compañeros del grupo Bichos, porque son lo más. Gracias a Dami, Gabi, Caro y Clarita por la ayuda en el manejo de las infecciones y cultivos de macrófagos.

A Santi, por la ayuda con la escritura de la tesis y las discusiones científicas de todos los días.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas, porque de alguna forma u otra contribuyeron a este proyecto. Fue un placer haber compartido estos años con ellos.

Al grupo Call Center y adeptos, por los consejos experimentales y los buenos momentos en el laboratorio.

A mis amigos de la carrera, en especial gracias a Santi, Pau y Sofi.

A mis padres, por incentivar-me a intentar siempre dar lo mejor de mí.

A mis hermanos y a mis amigas de toda la vida, por el apoyo incondicional.

Finalmente agradecer a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por la Beca de Maestría, a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto de grupos dentro del que se enmarca este trabajo y a PEDECIBA Química.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito intracelular obligado capaz de invadir y proliferar en células de mamíferos. Para establecer la infección, el parásito debe sobrevivir al ataque nitro-oxidativo del macrófago en respuesta a la invasión (generación de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito ($ONOOH/ONOO^{\cdot-}$)). Dentro de las enzimas antioxidantes de *T. cruzi*, se encuentra una hemoperoxidasa (APx-CcP) que incrementa la infectividad parasitaria tanto *in vitro* como *in vivo*. Se trata de una peroxidasa híbrida, que reduce H_2O_2 utilizando ascorbato o citocromo c como sustrato reductor. Motivados por la reactividad de otras hemoperoxidasas con peroxinitrito y dado que la enzima se localiza en la membrana plasmática en las formas infectivas, nos propusimos estudiar la reacción de la APx-CcP con peroxinitrito y su rol en la detoxificación de este oxidante en la infección a macrófagos. Mediante métodos de cinética rápida y de competencia, determinamos que la enzima reacciona rápidamente con el peroxinitrito ($k = 3-4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, pH 7.4 y $25^\circ C$) mediante la formación de un compuesto tipo I ($Fe^{IV}=\text{O}, \text{Trp}^{++}$) que detectamos por análisis espectroscópico y experimentos de inmunospin trapping con DMPO. Finalmente evidenciamos que parásitos sobreexpresantes de APx-CcP son más infectivos que los WT en macrófagos inmunoestimulados (IFN- γ /LPS) y que la sobreexpresión de la enzima resulta en una menor detección del oxidante en el macrófago durante la invasión (citometría de flujo, sonda fluoresceína boronato). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la APx-CcP reacciona con el peroxinitrito protegiendo al parásito de sus efectos citotóxicos.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, hemoperoxidasa, peroxinitrito, interacción parásito-hospedero

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas Disease, is an obligate intracellular parasite belonging to the kinetoplastid family, which can invade and proliferate inside mammalian cells. To establish the infection, the parasite must survive the macrophage nitro-oxidative assault in response to invasion (generation of superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxynitrite ($ONOOH/ONOO^-$)). Among the antioxidant enzymes of *T. cruzi* there is a hybrid type-A heme-containing ascorbate-cytochrome c peroxidase (APx-CcP) which has been shown to increase *T. cruzi* infectivity both *in vitro* and *in vivo*. APx-CcP can efficiently react with H_2O_2 and is a hybrid-type peroxidase that can use both ascorbate and cytochrome c as a reducing substrate. Motivated by the reactivity of other heme peroxidases with peroxynitrite and considering that the enzyme is localized to the plasma membrane in the infective stages, we aimed to study the reaction of APx-CcP with peroxynitrite and its role in oxidant detoxification during macrophage infections. Using direct and competitive kinetics methods we were able to determine that the enzyme rapidly reacts with peroxynitrite ($k = 3-4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, pH 7.4 and 25°C) through the formation of a compound I-like intermediate ($Fe^{IV}=O, Trp^{+\cdot}$) which was detected by spectroscopic analysis and immunospin trapping experiments with DMPO. Finally, we found that APx-CcP overexpressing parasites are more infective than the WT in cytokine-activated macrophages (IFN- γ /LPS) and we have shown that the enzyme overexpression results in a lower detection of oxidant during the invasion of the macrophage (flow cytometry, fluorescein boronate probe). Our data provide evidence that the enzyme efficiently reacts with peroxynitrite protecting the parasite from its cytotoxic effects.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, hemeperoxidase, peroxynitrite, host-parasite interactions

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas.....	1
1.2 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	3
1.3 Macrófagos en la respuesta contra <i>T. cruzi</i>	5
1.3.1 Especies reactivas derivadas del macrófago	10
1.3.1.1 Radical superóxido.....	10
1.3.1.2 Peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo	12
1.3.1.3 Óxido nítrico	13
1.3.1.4 Peroxinitrito	14
1.3.1.5 Dióxido de nitrógeno.....	17
1.4 Nitración de tirosinas.....	19
1.5 Defensas antioxidantes de <i>T. cruzi</i>	21
1.6 La hemoperoxidasa de <i>T. cruzi</i> (APx-CcP).....	24
1.6.1 Función biológica.....	24
1.6.2 Estructura	27
1.6.3 Mecanismo catalítico	29
1.6.3.1 Mecanismo catalítico general de las hemoperoxidasas	29
1.6.3.2 Mecanismo catalítico de la APx-CcP	32
1.7 Reacción de hemoproteínas con peroxinitrito.....	33
1.8 El ascorbato y su biosíntesis en <i>T. cruzi</i>	36
2. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
4.1 Reactivos y soluciones.....	42
4.2 Síntesis de peroxinitrito	43
4.3 Expresión y purificación de APx-CcP WT y W233F recombinante.....	43
4.4 Ensayos de cinética rápida usando un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped flow)	44
4.5 Determinación de la constante cinética de reacción por un ensayo de competencia	44
4.6 Evaluación de la descomposición catalítica de peroxinitrito por un ensayo de competencia.....	45
4.7 Análisis de espectros de absorbancia UV-vis	46
4.8 Experimentos de inmunospin trapping con DMPO	46

4.9 Estudio de la inactivación y nitración de la enzima recombinante expuesta a peroxinitrito	47
4.10 Medidas de actividad enzimática usando ascorbato o citocromo c	47
4.11 Medidas de actividad peroxidasa usando Amplex® Red	47
4.12 Western blots	48
4.13 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	48
4.14 Parásitos sobreexpresantes de APx-CcP	49
4.15 Cultivo de macrófagos.....	49
4.16 Activación de macrófagos.....	49
4.17 Cuantificación de especies reactivas producidas por los macrófagos.....	50
4.18 Exposición a peroxinitrito y detección intraparasitaria con la sonda FL-B	50
4.19 Infectividad de <i>T. cruzi</i> en macrófagos de cultivo	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1 Expresión y purificación de la enzima APx-CcP WT y W233F recombinante en <i>Escherichia coli</i>	52
5.2 La enzima APx-CcP recombinante reacciona rápidamente con el peroxinitrito	54
5.3 Detección de la formación del intermediario enzimático compuesto tipo I (Fe ^{IV} =O, Trp233 ⁺) y tipo I “alternativo” (Fe ^{IV} =O, Cys222 [*])	58
5.4 La APx-CcP detoxifica catalíticamente el peroxinitrito usando ascorbato como sustrato reductor	63
5.5 Inactivación y nitración de la APx-CcP mediada por peroxinitrito	68
5.6 Ensayo de actividad peroxidasa para tamizaje de posibles inhibidores	74
5.7 La sobreexpresión de la APx-CcP disminuye la detección de peroxinitrito durante la invasión a macrófagos	75
5.8 Parásitos sobreexpresantes de APx-CcP son más resistentes al peroxinitrito en infecciones a macrófagos.....	83
6. CONCLUSIONES	87
7. PERSPECTIVAS	89
7.1 Profundización en el estudio del mecanismo catalítico de la enzima	89
7.2 Evaluación del ascorbato como modulador de la capacidad antioxidante de la enzima	89
7.3 Purificación del citocromo c de <i>T. cruzi</i>	90
8. REFERENCIAS	91

Lista de abreviaturas

A

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALA	Ácido γ -amino-levunílico
ALO	Arabinonolactona oxidasa
APX	Ascorbato peroxidasa
APx-CcP	Hemoperoxidasa híbrida de <i>T. cruzi</i>
Arg	Arginina
ASC	Ascorbato
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina

B

BHI	Medio de cultivo “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”
Br	Cepa Brener de <i>T. cruzi</i>

C

CBA	Ácido borónico de cumarina
Cc	Citocromo c
Cc ²⁺	Citocromo c reducido
CcP	Citocromo c peroxidasa
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₃ ⁻	Radical carbonato
COH	7-hidroxycumarina
CPO	Cloroperoxidasa
CPX	Peroxirredoxina citosólica de <i>T. cruzi</i>
Cu	Cobre
Cys	Cisteína

D

DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DHA	Dehidroascorbato
DHR	Dihidrorodamina
DiTyr	3,3'-ditirosina
DMEM	Medio de cultivo " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> "
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPA	3-hidroxitirosina (3,4-dihidroxiifenilalanina)
dPBS	Solución "Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline"

E

E°	Potencial estándar de reducción
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica

F

FAD	Flavín adenín dinucleótido
Fe	Hierro
Fe-SODA	Superóxido dismutasa mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
Fe-SODB	Superóxido dismutasa citosólica de <i>T. cruzi</i>
FL-B	Fluoresceína boronato
FMN	Flavin mononucleótido

G

G418	Geneticina
GALDH	Galactonolactona deshidrogenasa
GLO	Gulonolactona oxidasa
GPx	Glutación peroxidasa

GSH	Glutati3n
GSSG	Glutati3n disulfuro

H

H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Per3xido de hidr3geno
His	Histidina
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HO ₂ [·]	Radical perhidroxilo
HOCl	3cido hipocloroso
HPLC	Cromatograf3a l3quida de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de r3bano

I

IFN-γ	Interfer3n-γ
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1β	Interleuquina-1β
IMAC	Cromatograf3a de afinidad de metales inmovilizados
iNOS	3xido n3trico sintasa inducible
IP	Ioduro de propidio
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiran3sido
IR	Infrarrojo

L

LB	Medio de cultivo "Luria-Bertani"
LmP	Hemoperoxidasa de <i>Leishmania major</i>
L-NAME	L-arginina metil ester
LO [·]	Radical lip3dico alcoxilo
LOO [·]	Radical lip3dico peroxilo
LPO	Lactoperoxidasa
LPS	Lipopolisac3rido

M

MDHA	Radical monodehidroascorbato
Met	Metionina
MetSO	Sulfóxido de metionina
Mn	Manganeso
MnO ₂	Óxido de manganeso
MPO	Mieloperoxidasa
MPX	Peroxirredoxina mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
MSR	Metionina sulfóxido reductasa

N

N ₂	Nitrógeno molecular
N ₂ O ₃	Óxido de nitrógeno (III)
N ₂ O ₄	Óxido de nitrógeno (IV)
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaNO ₂	Nitrito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NEM	N-etilmaleimida
NMR	Resonancia magnética nuclear
·NO	Óxido nítrico
·NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₂ ⁺	Nitronio
NO ₂ Tyr	3-nitro-tirosina
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOC-18	2,2'-(hidroxinitrosohidrazino) bis-etanamina
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS-2	Óxido nítrico sintasa inducible
NOX	NADPH oxidasa
NOX-2	NADPH oxidasa-2

O

O_2	Oxígeno molecular
$O_2^{\cdot-}$	Anión radical superóxido
$\cdot OH$	Radical hidroxilo
OH^-	Ion hidroxilo
$ONOO^-$	Peroxinitrito anión
$ONOOCO_2^-$	Aducto nitrosoperoxocarboxilato
$ONOOH$	Ácido peroxinitroso

P

P	Porfirina
PBS	Amortiguador fosfato salino
PGHS-1	Prostaglandina G/H sintasa-1
P_m	Coefficiente de permeabilidad
Prx	Peroxirredoxina

R

$-RNH_2$	Guanidinio de la arginina
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
$-RS^-$	Tiolato
$-RS^{\cdot}$	Radical tiílo
$-RSH$	Sulfhidrilo o tiol
$-RSOH$	Ácido sulfénico

S

SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SHF	Suero humano fresco

SIN-1	3-morfolinosidnonimina
SOD	Superóxido dismutasa

T

T(SH) ₂	Tripanotiona reducida
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TR	Tripanotiona reductasa
Trp	Triptofano
TS	Tripanotiona sintetasa
TS ₂	Tripanotiona oxidada
TXN	Triparredoxina
Tyr	Tirosina
Tyr [•]	Radical tirosilo

U

UA	Ácido úrico
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia

W

WT	<i>Wild type</i> (salvaje)
----	----------------------------

X

X	Xantina
XO	Xantina oxidasa

Z

Zn	Zinc
----	------

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito intracelular obligado perteneciente a la familia de kinetoplastídeos (figura 1 panel A), capaz de invadir y proliferar en células de mamíferos¹.

La enfermedad humana causada por este parásito fue descubierta en 1909 por el médico e investigador brasileño Carlos Chagas, quien fue el primero en identificar en el intestino de un insecto conocido como “*barbeiros*” o “*kissing bugs*” unos parásitos flagelados que en su momento nombró como *Trypanosoma cruzi*, en honor a su tutor Oswaldo Cruz. Chagas en búsqueda de posibles hospederos vertebrados para este parásito, se encontró con Berenice, una niña de dos años de edad que se registró como el primer caso de infección aguda por *T. cruzi* en humanos. Desde entonces, esfuerzos importantes se han hecho para entender mejor el complejo ciclo de vida de este parásito y su interacción con el hospedero vertebrado e invertebrado².

Esta enfermedad, también denominada como Tripanosomiasis americana, ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de las enfermedades olvidadas. Sin embargo, constituye un importante problema de salud pública con un estimado de 6-7 millones de personas infectadas en América Latina y 28 millones en riesgo de contraer la enfermedad (OMS-2021³). A su vez, la enfermedad se encuentra en un proceso de diseminación global como resultado de la migración (personas y vectores), co-infección con HIV y trasplante de órganos. Pertenece al grupo de enfermedades transmitidas por vectores, en este caso es un insecto hematófago del género *Triatoma* (figura 1.1 panel B). En Uruguay, el principal vector transmisor (*Triatoma infestans*) ha sido erradicado, sin embargo, la presencia del vector en países limítrofes y la existencia de reservorios silvestres no eliminan el riesgo de contraer la enfermedad⁴.

La transmisión de la enfermedad es vectorial, transfusional, oral, sexual^{5,6} y congénita⁷. Mientras que la fase aguda de la enfermedad es usualmente

asintomática, *T. cruzi* establece infección crónica, caracterizada por daños en tejidos vitales presentando principalmente complicaciones asociadas a problemas cardíacos (cardiomiopatía chagásica) y gastrointestinales (megaesófago y megacolon)⁷.

Han pasado más de 100 años desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas y aún no se cuenta con un tratamiento efectivo, sobre todo para la fase crónica de la enfermedad². El tratamiento de la infección por *T. cruzi* depende de dos fármacos introducidos por primera vez en los años 70 que son el nifurtimox y el benznidazol. Estos dos compuestos nitroheterocíclicos presentan eficacia limitada (particularmente en adultos) y se asocian con efectos secundarios adversos. El benznidazol presenta mayor eficacia y es más seguro por lo que es utilizado en los tratamientos de primera línea. Es efectivo en la fase aguda de la enfermedad eliminando la parasitemia y reduciendo la duración y la magnitud de los síntomas. Sin embargo, en la fase crónica de la enfermedad existe controversia acerca de su eficacia y la severidad de los efectos secundarios^{8,9}.

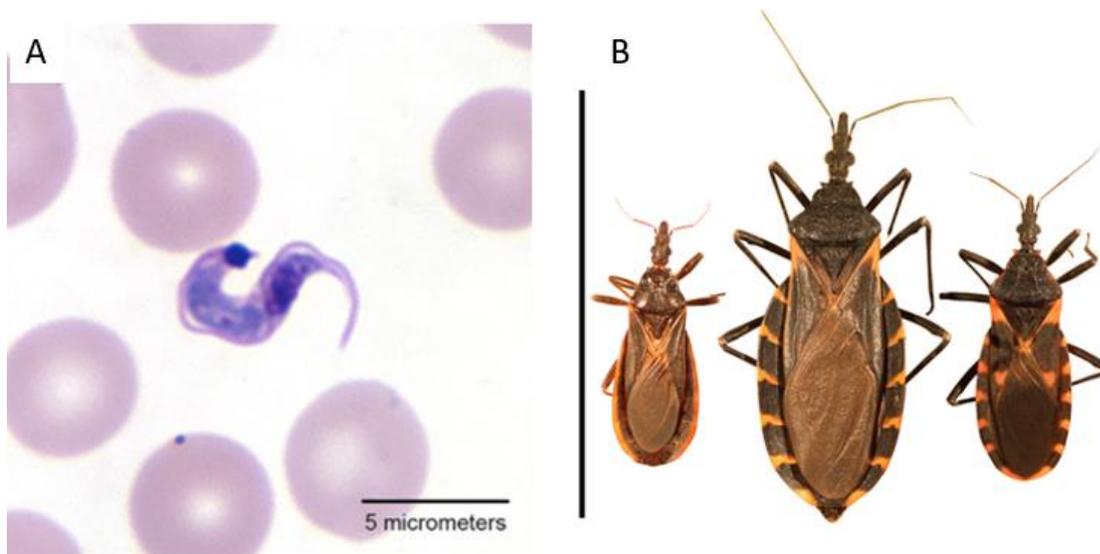


Figura 1.1. A. *T. cruzi* en la forma infectiva (trypomastigota sanguíneo) en un frotis de sangre de un paciente cursando la fase aguda de la enfermedad de Chagas. La barra representa 5 μm ¹⁰. **B.** Tres especies del género *Triatoma*, de izquierda a derecha: *Triatoma protracta*, *Triatoma gerstaeckeri* y *Triatoma sanguisuga*. La barra representa 25 mm¹¹.

1.2 Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida del parásito es complejo, caracterizado por distintos estadios de desarrollo e involucra un hospedero invertebrado y uno vertebrado (figura 1.2).

Los trabajos pioneros en dilucidar el ciclo de vida del parásito fueron llevados a cabo por los grupos de Kofoid (1937) y Meyer (Romaña and Meyer, 1942; Meyer y Xavier de Olivera, 1948) que mostraron que era posible reproducir el ciclo del vida del parásito *in vitro* en cultivos celulares¹².

El ciclo biológico del parasito comienza cuando el hospedero invertebrado (insecto del género *Triatoma*) se alimenta por succión de sangre de un hospedero vertebrado infectado. Algunos de los posibles hospederos invertebrados son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Panstrongylus megistus*.

Cuando el insecto succiona la sangre, los parásitos en la forma de tripomastigotas sanguíneos (forma infectiva y no replicativa) son ingeridos por el insecto. Una vez en el estómago, muchos de los tripomastigotas sanguíneos son lisados, pero los que sobreviven se transforman en la forma de epimastigotas (forma no infectiva y replicativa). En el intestino estos epimastigotas se replican por fisión binaria y se pueden adherir a las células intestinales, paso de adhesión que se ha planteado que podría ser importante para el posterior proceso de diferenciación en la forma infectiva¹³.

En el sector terminal del intestino y en el recto del insecto los epimastigotas no infectivos se replican y diferencian en la forma de tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva y no replicativa). Durante este proceso de diferenciación (metaciclogénesis), el parásito experimenta complejos cambios morfológicos y bioquímicos que le permitirán efectivamente infectar y sobrevivir en el ambiente hostil del hospedero vertebrado¹⁴⁻¹⁶.

Los tripomastigotas metacíclicos son expulsados en las heces del insecto luego de picar al hospedero vertebrado. El hospedero vertebrado comprende varias especies de mamíferos, incluyendo el humano. Los parásitos invaden al hospedero vía mucosas y/o heridas en la piel donde infectan diferentes tipos celulares (incluyendo

macrófagos, fibras musculares y fibroblastos, entre otros), proliferando en el citosol bajo la forma de amastigotas (forma infectiva y replicativa). Luego de varios ciclos replicativos, los amastigotas se diferencian en tripomastigotas sanguíneos los cuales salen de la célula, pudiendo alcanzar el torrente sanguíneo y diseminar la infección hacia otros tejidos y órganos. Así, los tripomastigotas sanguíneos pueden alcanzar e infectar distintos tejidos, siendo los más vulnerables corazón, tracto digestivo y sistema nervioso¹⁴⁻¹⁶.

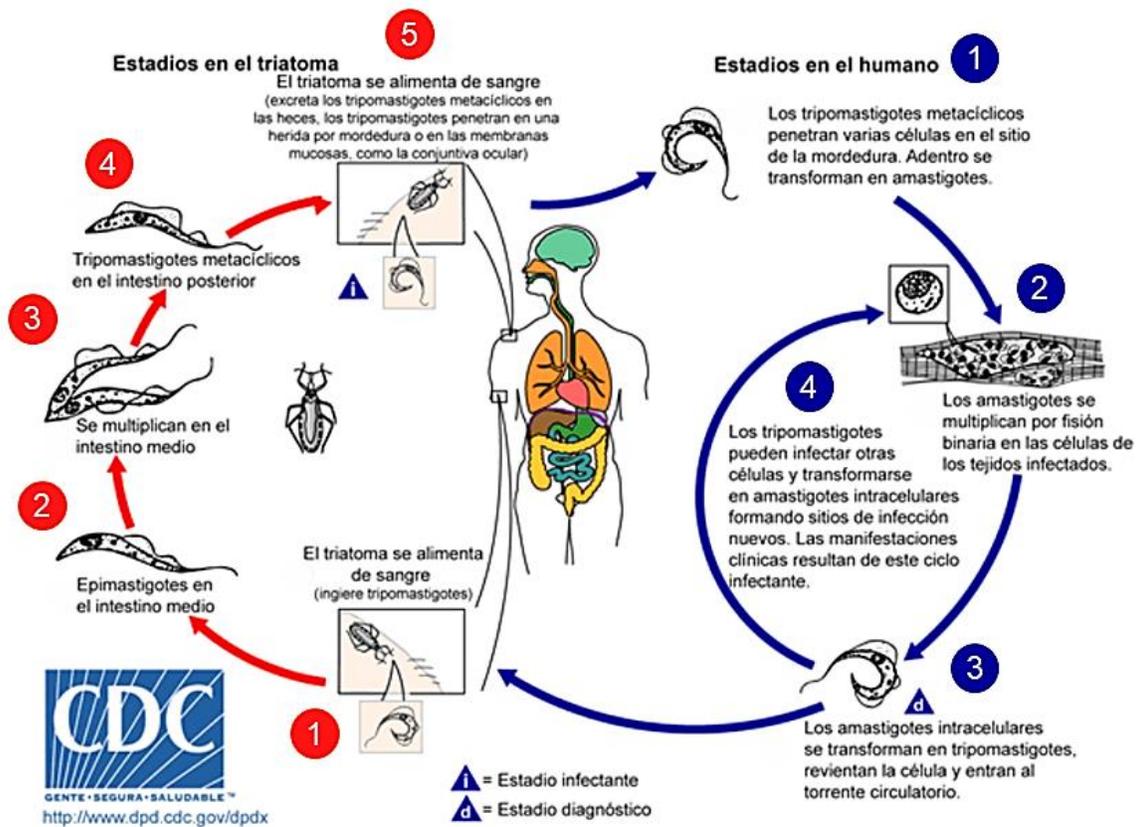


Figura 1.2. Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention, CDC*.

Los tripomastigotas presentan alta motilidad debido a la actividad de un flagelo ondulante adherido al cuerpo del parásito. Esta motilidad, que se puede observar en la sangre periférica durante la fase de infección aguda, continúa por algunos minutos luego de la invasión a la célula del hospedero. En particular, luego de encontrarse con una célula hospedera, la motilidad parece ser importante para que el parásito acceda al ambiente intracelular. Sin embargo, una motilidad sostenida en el medio intracelular de la célula hospedera podría llevar a consecuencias

desastrosas, como llevar a la muerte de la célula hospedera por la interrupción de la membrana plasmática².

En los primeros cultivos celulares infectados con *T. cruzi*, los investigadores confirmaron que una vez que los tripomastigotas entran en la célula, estos mantienen su motilidad por un cierto período de tiempo, para luego progresivamente volverse a una forma más redondeada donde se acorta el flagelo (amastigota)¹⁶. En esta forma amastigota el parásito se replica en el citosol por varias generaciones para después sufrir una rápida re-diferenciación en la forma altamente móvil tripomastigota. Este evento tiene de hecho dramáticas consecuencias para el hospedero, llevando a la ruptura de la membrana celular permitiendo a los parásitos acceder al medio extracelular y así poder infectar otras células (o ser ingerido por el vector invertebrado). Los mecanismos que activamente reprimen o contienen la movilidad del parásito en su ciclo intracelular parecen ser esenciales para proteger la frágil membrana de la célula hospedera, que debe de mantenerse intacta durante el ciclo del desarrollo del parásito².

1.3 Macrófagos en la respuesta contra *T. cruzi*

Los macrófagos son células versátiles del sistema inmune capaces de responder a distintos estímulos y adaptar su función a las necesidades de un contexto inmunológico particular. Además de ser importantes para la fagocitosis de microorganismos y/o elementos particulados y para la presentación de antígeno a linfocitos, los macrófagos son esenciales en el control de la respuesta inflamatoria y en la reparación de tejidos dañados mediante la liberación de distintos mediadores.

Los macrófagos, junto a los neutrófilos y otras células que puedan ser reclutadas al sitio de invasión son la primera línea de defensa contra el parásito. La internalización del parásito por los macrófagos ocurre principalmente a través de un proceso fagocítico que puede ser visualizado a través de microscopía electrónica, donde la célula extiende pseudópodos bilaterales con la participación de filamentos de actina. Esta expansión de la membrana plasmática del macrófago rodea al parásito y deriva en la formación de la “vacuola parasitófora”, que tiene un rol fundamental tanto para

el macrófago como para el parásito. *T. cruzi* depende del desarrollo de la vacuola parasitófora para persistir en la célula del hospedero, que se cree que es una adaptación evolutiva de los parásitos intracelulares¹⁷. Posteriormente se da el reclutamiento de lisosomas y endosomas que se fusionan con la vacuola parasitófora incorporando su contenido^{1,13,15}.

En 1932 aparece el primer reporte por Baldrige y Gerard de que el proceso de fagocitosis se acompaña de un dramático incremento transitorio del consumo de oxígeno, suceso que se conoce como “estallido respiratorio”¹⁸. Unas décadas más tarde en 1963 Iyer y Quastel identificaron que la enzima NADPH oxidasa (NOX, EC 1.6.3.1)¹⁹ es la responsable de este fenómeno. La enzima NOX es un complejo multienzimático que cataliza la reducción por NADPH del O₂ llevando a la generación del radical superóxido (O₂⁻)²⁰.

Hoy en día está bien establecido que la enzima NOX presente en los fagocitos (NOX-2) se encuentra inactiva en ausencia de estímulo, pero que luego de la estimulación del macrófago el complejo se ensambla y se activa en la membrana plasmática. La formación de O₂⁻ puede también derivar en la generación de otras especies derivadas que son conocidas globalmente como especies reactivas del oxígeno (del inglés: reactive oxygen species, ROS), en las cuales profundizaremos más adelante. La producción de las ROS durante el estallido respiratorio en las células fagocíticas fue propuesto como un mecanismo para combatir patógenos por primera vez en 1968²¹. Rápidamente poco tiempo después, el estallido respiratorio se convirtió en una estrategia bien establecida para la eliminación de patógenos, aunque siempre existió cierta evidencia contradictoria²²⁻²⁵.

Por otro lado, más adelante a finales de la década de los 80 y en los años 90 se realizaron importantes observaciones que llevaron a la conclusión de que los macrófagos tienen mayor actividad citotóxica contra patógenos cuando son estimulados por citoquinas proinflamatorias, como el interferón γ (IFN- γ)^{22,26-32}. Estas citoquinas son secretadas en primera instancia por las células Natural Killer, y luego por células T CD4+ (Th1) cuando una respuesta inmune específica contra un patógeno es establecida. Hoy se sabe que la activación de los macrófagos por

citoquinas proinflamatorias lleva a la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que cataliza la reacción de formación de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$)³³.

Finalmente en 1992, Ischiropoulos y colaboradores evidenciaron que en los macrófagos activados la generación simultánea de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ lleva a la formación de una molécula con una acción microbicida más potente que es el peroxinitrito³⁴. Si bien el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$ por sí solos han mostrado ser moderadamente citotóxicos³⁵⁻³⁸, la formación concomitante de los dos radicales con la formación de peroxinitrito es lo que explicaría una citotoxicidad potenciada de los macrófagos activados.

En *T. cruzi* se ha estudiado extensamente la formación de estas especies durante la infección. La sola exposición de los macrófagos al parásito es capaz de inducir el estallido respiratorio con el ensamblaje y la activación del complejo multienzimático NOX-2 en la membrana de la vacuola parasitófora. Esto lleva a la producción de altas cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ hacia el parásito que es internalizado por al menos 90 minutos³⁹.

A su vez, también se ha planteado un papel activo del $\cdot\text{NO}$ en el control de la parasitemia, aunque existe cierta discrepancia en la literatura. Se ha evidenciado que los macrófagos inmunoestimulados tienen mayor citotoxicidad contra *T. cruzi* debido a la reacción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ con el $\cdot\text{NO}$ derivado de la iNOS para formar peroxinitrito ($k \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁴⁰. El peroxinitrito es una especie reactiva con un potente efecto citotóxico contra *T. cruzi*³⁹. Como profundizaremos más adelante, el peroxinitrito ejerce sus acciones citotóxicas por su reacción directa con blancos celulares y/o por generación de especies derivadas (radicales: dióxido de nitrógeno, $\cdot\text{NO}_2$; hidroxilo, $\cdot\text{OH}$ y carbonato, $\text{CO}_3^{\cdot-}$). Se ha demostrado que el control de la supervivencia del parásito dentro del fagosoma, antes de que los amastigotas alcancen el citoplasma, depende en gran medida de la producción de peroxinitrito por el macrófago^{39,41-43}.

En suma, para establecer la infección *T. cruzi* tiene que sobrevivir a la actividad microbicida de los fagocitos profesionales presentes en el sitio de invasión. La citotoxicidad contra *T. cruzi* de estas células fagocíticas se debe fundamentalmente a su capacidad para producir especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (figura 1.3). Las especies globalmente denominadas como ROS más relevantes en este

trabajo son el $O_2^{\cdot-}$, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el $\cdot OH$ y el $CO_3^{\cdot-}$. Las especies reactivas del nitrógeno (del inglés: reactive nitrogen species, RNS) más relevantes en el contexto de esta tesis son el $\cdot NO$, el peroxinitrito y el $\cdot NO_2^{44}$.

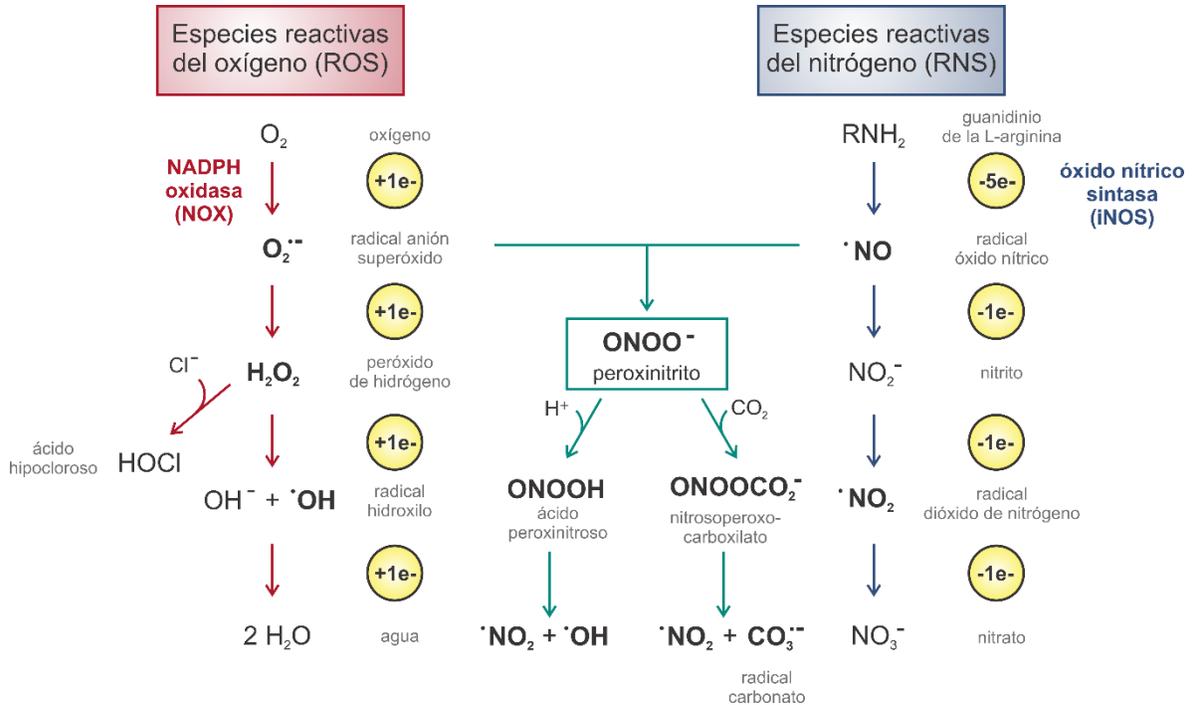


Figura 1.3. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Adaptado de Fang 2004⁴⁴.

Estas especies reactivas derivadas del macrófago contribuyen a eliminar el parásito dentro del fagosoma (figura 1.4). Dado que el espacio existente entre la membrana del fagosoma y la del parásito es casi nulo en la primera hora durante la invasión⁴², es de esperar que la concentración de estas especies sea extremadamente alta y tóxica para el parásito en este compartimento.

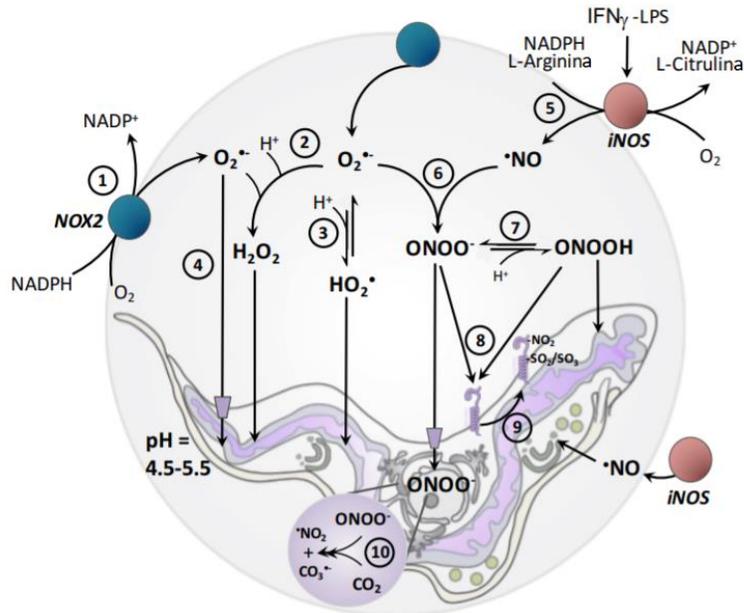


Figura 1.4. Especies reactivas presentes en el fagosoma del macrófago. La activación de la NOX-2 lleva a la generación de $O_2^{\cdot-}$ hacia la vacuola parasitófora (1). El $O_2^{\cdot-}$ dismuta a H_2O_2 (2), se protona para generar HO_2^{\cdot} (3) o podría alcanzar el interior del parásito a través de canales aniónicos (4). En macrófagos inmunoestimulados (IFN- γ /LPS) se induce la expresión de la iNOS que produce $\cdot NO$ (5). El $\cdot NO$ puede difundir hacia el fagosoma reaccionando rápidamente con el $O_2^{\cdot-}$ llevando a la generación de peroxinitrito anión ($ONOO^{\cdot}$) (6) el cual se encuentra en equilibrio con la forma neutra ácido peroxinitroso ($ONOOH$) (7). Tanto el $ONOO^{\cdot}$ como el $ONOOH$ pueden alcanzar el parásito (8) promoviendo reacciones de oxidación y nitración de proteínas y lípidos de membrana (9). Alternativamente el $ONOO^{\cdot}$ puede reaccionar con CO_2 rindiendo $\cdot NO_2$ y $CO_3^{\cdot-}$ (10). Adaptado de Piacenza *et al.* 2019³³.

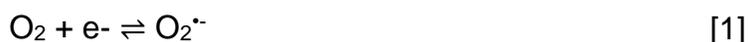
Finalmente, aquellos parásitos que logran sobrevivir al ataque nitro-oxidativo del macrófago son capaces de desintegrar gradualmente la membrana de la vacuola parasitófora, “escapar” y replicarse en el citosol. Se cree que *T. cruzi* participa activamente en la disrupción de la membrana de la vacuola mediante la liberación de enzimas que generan poros en la membrana llevando a su fragmentación. Es interesante la observación de que la acidificación de la vacuola es un paso esencial en este proceso, dado que un aumento del pH entorpece la fragmentación de la membrana¹³. En simultáneo a esta disrupción de la membrana, ocurre la diferenciación de los tripomastigotas a amastigotas que al ingresar al citosol comienzan a proliferar. Una vez en el citosol se van a replicar por varias generaciones, hasta que finalmente van a sufrir el ya mencionado proceso de

diferenciación a tripomastigotas sanguíneos, suceso que lleva a la lisis de la célula del hospedero y la diseminación de la infección.

1.3.1 Especies reactivas derivadas del macrófago

1.3.1.1 Radical superóxido

El radical anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ se forma por la reducción univalente del O_2 (ecuación [1])⁴⁵.

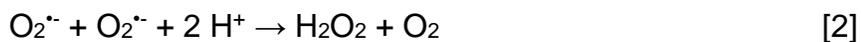


El $O_2^{\cdot-}$ puede ser considerado como un paso inicial para la formación de las demás ROS, que se encuentra directa o indirectamente relacionada con la producción previa de $O_2^{\cdot-}$.

En comparación con otros oxidantes y radicales libres, el $O_2^{\cdot-}$ tiene una reactividad moderada actuando como reductor ($E^{\circ'} O_2/O_2^{\cdot-} = -0.16 \text{ V}$) o como oxidante univalente ($E^{\circ'} O_2^{\cdot-}, 2H^+/H_2O_2 = +0.94 \text{ V}$)^{46,47}.

In vivo las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$ son las reacciones catalizadas por las enzimas xantina oxidasa (XO, EC 1.17.3.2) y las distintas isoformas de la NOX y mediante “fuga” de electrones hacia el oxígeno por ejemplo en la cadena mitocondrial de transporte de electrones^{48–50}.

En los medios biológicos, el $O_2^{\cdot-}$ dismuta espontáneamente a O_2 y H_2O_2 con una constante cinética de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 (ecuación [2])⁵¹.



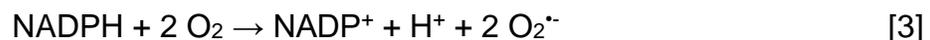
Además esta reacción puede ser catalizada por una serie de metaloenzimas denominadas superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1), las cuales aceleran la reacción más de 1000 veces. Estas enzimas, que fueron identificadas por primera vez por McCord y Fridovich en 1969⁵², se encuentran presentes en prácticamente todos los órdenes de la vida. Todas las SODs estudiadas hasta el momento catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ con constantes cinéticas en el entorno de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, disminuyendo la concentración de $O_2^{\cdot-}$ de estado estacionario⁴⁰. Pocos blancos del $O_2^{\cdot-}$ son capaces de competirle a estas enzimas, entre los que se encuentran

los clústers hierro-sulfurados (Fe-S) presentes en proteínas y otras especies radicalares como el $\cdot\text{NO}$ ⁴⁶. En el caso de la reacción con el $\cdot\text{NO}$, como ya se mencionó, lleva a la producción de peroxinitrito. Es interesante mencionar que la concentración local de las SODs es un determinante clave en la cantidad de peroxinitrito que se va a formar en un determinado compartimento celular.

Al tratarse de una especie cargada en condiciones fisiológicas, el $\text{O}_2\cdot^-$ presenta baja permeabilidad de membrana ($P_m = 2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$)⁵³. Esto indicaría que su presencia se limita principalmente a su sitio de producción. Sin embargo, existen reportes de que podría atravesar membranas a través de canales aniónicos, lo que abre la posibilidad de que la permeabilidad de membrana podría estar determinada por la abundancia de estos canales⁵⁴.

Como ya se mencionó, en los macrófagos tras la activación, por ejemplo en la fagocitosis de patógenos invasores (bacterias, parásitos intracelulares), se ensambla y activa el complejo multienzimático NOX-2 en la membrana plasmática. La activación de la NOX-2 conduce a un incremento en la producción de $\text{O}_2\cdot^-$ alcanzando concentraciones de estado estacionario altas y potencialmente tóxicas para los patógenos.

La enzima NOX es un complejo multienzimático formado por dos proteínas de membrana gp91^{phox} y p22^{phox} (el término *phox* refiere en inglés a "*phagocyte oxidase*") y cuatro proteínas citosólicas: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y una GTPasa (Rac1 o Rac2). El complejo extrae dos electrones del NADPH, que se genera en la ruta de las pentosas fosfato, para reducir dos moléculas de O_2 a $\text{O}_2\cdot^-$ (ecuación [3])^{55,56}.



Es importante recordar que en el caso de *T. cruzi*, la sola interacción del parásito con el macrófago es capaz de ensamblar y activar a la NOX-2³⁹.

El $\text{O}_2\cdot^-$ es una base débil (pK_a 4.69-4.88) que se protona para formar el radical perhidroxilo ($\text{HO}_2\cdot$). Es interesante mencionar que aunque el $\text{O}_2\cdot^-$ presenta baja permeabilidad de membrana, el pH bajo del fagosoma del macrófago (pH 5-6) y la alta concentración del $\text{O}_2\cdot^-$ que deriva de la NOX-2 (en el rango de micromolar)

favorecen la formación del HO₂[•] en ese compartimento. El HO₂[•] es una especie neutra que puede permear fácilmente a través de las membranas y es un oxidante más potente que el O₂^{•-} (E° HO₂[•]/H₂O₂ = 1.42 V)⁵¹.

1.3.1.2 Peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo

El H₂O₂ es una ROS de pequeño tamaño, no radicalar y mayoritariamente neutra a pH fisiológico. Una de las principales fuentes de esta especie es la reacción de dismutación del O₂^{•-}, ya sea espontánea o catalizada por las SODs. Se trata de una especie oxidante fuerte por dos electrones (E° H₂O₂/H₂O = 1.32 V). Sin embargo, su reacción con la mayoría de las biomoléculas es muy lenta debido a que presentan altas energías de activación. Algunas excepciones constituyen las reacciones rápidas del H₂O₂ con centros de metales de transición y con el tiolato de la cisteína peroxidática de las peroxiredoxinas⁵⁷.

El H₂O₂ tiene un pK_a de 11.6, por lo que se encuentra mayoritariamente sin carga a pH fisiológico⁵⁷, pudiendo difundir a través de las membranas biológicas (P_m ~ 10⁻³-10⁻⁴ cm/s). Además ciertas isoformas de acuaporinas (denominadas peroxiporinas) podrían facilitar su transporte^{58,59}.

La toxicidad del H₂O₂ contra *T. cruzi* ha sido estudiada *in vitro*⁶⁰, y como veremos más adelante el parásito posee mecanismos intracelulares de detoxificación de este oxidante³³.

Un fenómeno a destacar es que tanto el O₂^{•-} como el H₂O₂ pueden liberar el átomo de hierro (Fe) de los clústers Fe-S de ciertas proteínas⁶¹ que lleva a la generación del radical [•]OH por las llamadas reacciones de tipo Fenton (ecuación [4])⁶².



El [•]OH es uno de los oxidantes más fuertes que se conocen (E° [•]OH/H₂O = 2.31 V). Reacciona de forma inespecífica y a velocidades controladas por difusión con moléculas de relevancia biológica ($k = 10^9$ - 10^{10} M⁻¹ s⁻¹). Dada su alta reactividad, presenta una vida media extremadamente corta (~10⁻⁹ s) y muy limitada capacidad de difusión. Notoriamente, la generación sitio específica del [•]OH se ha propuesto

como un mecanismo responsable de daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) con generación de mutaciones y alteraciones en la transcripción⁵⁷.

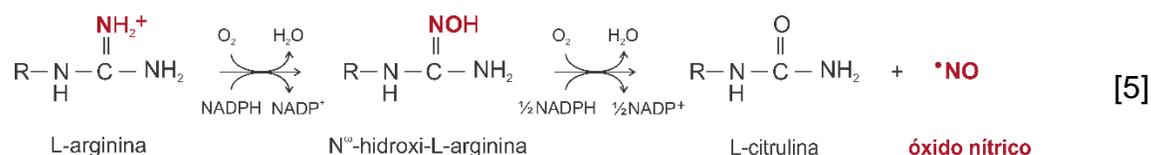
En vista de su alta reactividad y poca especificidad, se cree que el $\cdot\text{OH}$ que pueda ser generado en el fagosoma de los macrófagos es poco probable que genere un daño selectivo al patógeno que se encuentra internalizado³³.

1.3.1.3 Óxido nítrico

El $\cdot\text{NO}$ fue descubierto por sus efectos y finalmente identificado a finales de los años 80^{63,64}. Es un radical libre relativamente estable y un oxidante por un electrón pobre ($E^\circ \cdot\text{NO}, \text{H}^+/\text{HNO} = -0.8 \text{ V}$)⁶⁵. Se trata de una molécula pequeña, sin carga y relativamente apolar que puede difundir a través de las membranas biológicas. Aunque es un oxidante pobre, el $\cdot\text{NO}$ puede reaccionar con radicales de relevancia biológica a velocidades controladas por difusión (por ejemplo con los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{NO}_2$, tiólo, peroxilo y tirosilo)^{40,66-69}.

Como el $\cdot\text{NO}$ posee una alta permeabilidad de membrana ($P_m = 18 \text{ cm/s}$, 20°C), similar a la del O_2 ($P_m = 32 \text{ cm/s}$, 20°C), es capaz de atravesar fácilmente las membranas y difundir entre compartimentos celulares⁷⁰.

Como ya se mencionó, es sintetizado *in vivo* principalmente por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS, EC 1.14.13.39) que catalizan la síntesis de $\cdot\text{NO}$ a partir de L-arginina y O_2 en presencia de NADPH por una reacción de óxido-reducción compleja (ecuación [5])⁷¹. Esta reacción se encuentra cuidadosamente regulada dadas las funciones del $\cdot\text{NO}$ en la vasodilatación, la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la respuesta inmunitaria⁷².



En los macrófagos frente a un estímulo por mediadores del sistema inmune (como las citoquinas proinflamatorias $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$) o derivados de patógenos (como el LPS bacteriano) se induce la transcripción del gen de la enzima iNOS. La iNOS junto con otras enzimas relacionadas y transportadores aseguran una

producción potente (rango de concentración en micromolar) y sostenida (horas) de $\cdot\text{NO}$ ³³.

La mayoría de los trabajos en iNOS se han realizado en macrófagos murinos, debido a la dificultad en la obtención y activación apropiada *in vitro* de macrófagos humanos³³. En los macrófagos murinos, la máxima expresión de la enzima se alcanza a las 4-5 horas luego de la estimulación con IFN- γ y LPS, con flujos de $\cdot\text{NO}$ sostenidos por ~24 horas⁴². Finalmente mencionar que el parásito *T. cruzi* por sí solo en ausencia de co-estimulación no induce de forma significativa la expresión de la iNOS²².

1.3.1.4 Peroxinitrito

En el área de la bioquímica el término “peroxinitrito” hace referencia a la suma de dos especies muy relacionadas: el peroxinitrito anión (ONOO^-) y su ácido conjugado el ácido peroxinitroso (ONOOH). Considerando que el pK_a para el peroxinitrito es de 6.8, ambas especies coexisten a pH fisiológico (ecuación [7]). Esta es una consideración importante, dado que el ONOO^- y el ONOOH presentan diferente reactividad⁴⁰.

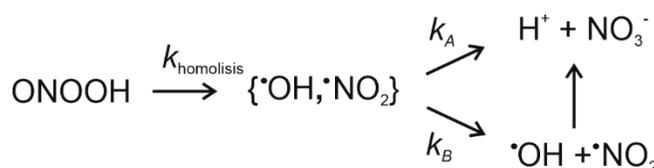
El peroxinitrito es una especie de vida media corta (~1-20 ms) que en los sistemas biológicos se produce principalmente por la reacción controlada por difusión entre los radicales $\cdot\text{NO}$ y O_2^- (ecuación [6]). Como ya se mencionó, esta reacción se encuentra cinéticamente muy favorecida con una constante de velocidad en el orden de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



La formación del peroxinitrito en sistemas biológicos y su potencial efecto citotóxico fue originalmente postulado por Beckman y col.⁷³ y luego expandido y racionalizado por Radi y col.^{74,75} y por Ischiropoulos y col.^{34,76}. Tanto el ONOO^- como el ONOOH pueden participar directamente en oxidaciones por uno o dos electrones de biomoléculas, pudiendo causar daño en el ADN, peroxidación lipídica y diversas

modificaciones en proteínas como oxidación de residuos de cisteína y nitración de residuos de tirosina y triptofano⁷⁷.

En ausencia de blancos, el ácido peroxinitroso decae espontáneamente a pH neutro o ácido y más lentamente en medio alcalino por ruptura homolítica del enlace O-O generando $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (esquema 1) en un rendimiento del ~30%, decayendo el 70% restante a nitrato (NO_3^-). Luego de varios años de intenso debate, la vía de decaimiento del peroxinitrito por homólisis/isomerización, terminó siendo considerada una vía minoritaria de consumo del peroxinitrito en un contexto biológico dado que es más lenta (0.26 s^{-1} en amortiguador pH 7.4 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$) que otras reacciones directas del peroxinitrito con otros blancos celulares⁴⁰.



Esquema 1. Homólisis del ácido peroxinitroso⁴⁰.

El peroxinitrito que se forma en los distintos compartimentos celulares desaparece ya sea por consumo en reacciones químicas con distintos blancos celulares o por difusión a través de las membranas. La forma neutra del peroxinitrito ONOOH puede difundir de forma pasiva a través de las membranas ($P_m \sim 1 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$), mientras que el transporte de la forma aniónica ONOO^- puede estar facilitada por canales aniónicos⁷⁸⁻⁸⁰.

La química del consumo del peroxinitrito puede ser entendida como la suma de numerosas reacciones que ocurren en paralelo, cada una de las cuales contribuye a la velocidad global de consumo acorde con la ecuación [8].

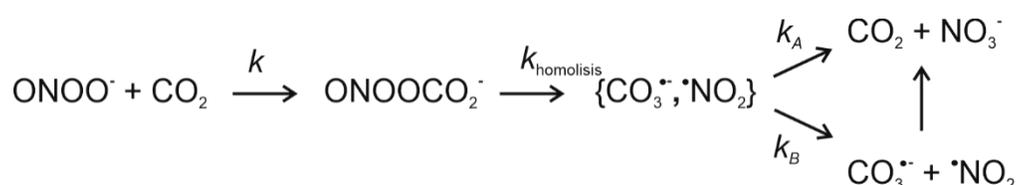
$$-\frac{d[\text{ONOO}^-]}{dt} = [\text{ONOO}^-]_{ss} \sum k_n^{app} [T_n] \quad [8]$$

Donde $[T_n]$ representa la concentración de la molécula blanco que reacciona con el peroxinitrito con una constante aparente de segundo orden k_n^{app} .

Actualmente se considera que unos pocos blancos celulares son los responsables de la mayor parte del consumo del peroxinitrito por reacciones químicas. Estos son

el dióxido de carbono (CO₂), las peroxidasas (ya sea dependientes de tioles/selenoles o del grupo hemo) y unas pocas metaloproteínas.

Una reacción relevante en los sistemas biológicos es la que ocurre entre el peroxinitrito anión (ONOO⁻) y el CO₂ (esquema 2). Esta reacción fue insinuada por primera vez en 1969 por Keith y Powell⁸¹, y luego sugerida por Radi *et al.* en 1993 en el estudio de reacciones mediadas por peroxinitrito usando el amortiguador bicarbonato⁸². En la reacción del peroxinitrito con CO₂ se forma primero el aducto nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO₂⁻) con una constante en el orden de ~10⁴ M⁻¹ s⁻¹. Este aducto es extremadamente lábil y decae por homólisis a CO₃^{-•} y •NO₂. A su vez estos radicales pueden recombinar rindiendo CO₂ y NO₃⁻.



Esquema 2. Secuencia de reacciones entre el ONOO⁻ y el CO₂. El cociente k_A/k_B es de 2⁴⁰.

A pesar de que la reacción del peroxinitrito con el CO₂ es más lenta que con otros blancos celulares, como por ejemplo la reacción del peroxinitrito con las peroxidasas ($k \sim 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), el CO₂ es ubicuo y se encuentra en un rango de concentraciones de milimolar en los sistemas biológicos (usualmente 1-2 mM). Por este motivo, el término $k_n^{app} [T_n]$ es relativamente alto y esta reacción constituye una de las vías principales del consumo del peroxinitrito *in vivo*.

El radical CO₃^{-•}, aunque menos reactivo que el radical •OH, es un potente oxidante por un electrón capaz de reaccionar con biomoléculas. Por ejemplo, puede oxidar residuos aminoacídicos como tirosinas y triptofanos con constantes rápidas en el orden de 10⁷-10⁸ M⁻¹ s⁻¹. Entre otras reacciones, el CO₃^{-•} es capaz de oxidar residuos de tirosina a radical tirosilo. Como veremos en la sección 1.4 que sigue, este es un paso necesario para la nitración de tirosinas.

En la figura 1.5 que sigue se resumen las principales vías de reacción del peroxinitrito en sistemas biológicos que ya fueron mencionadas. Más adelante en la sección 1.7 del apartado de Introducción profundizaremos en la reacción del

peroxinitrito con las hemoproteínas, que son de particular interés en este trabajo de tesis.

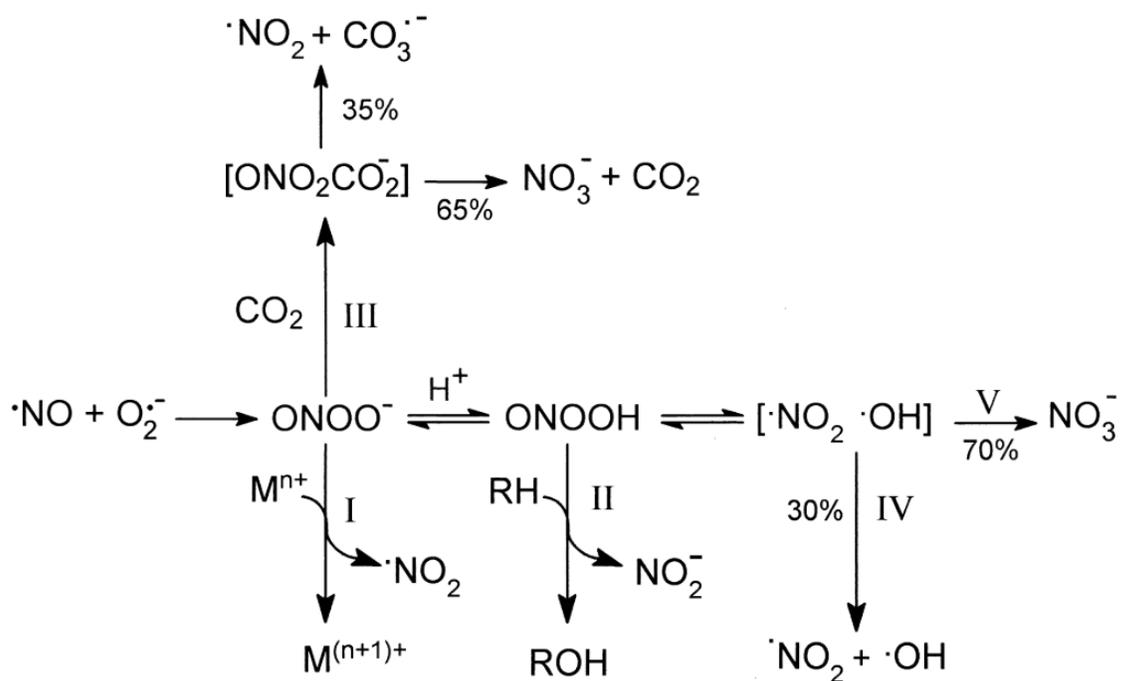


Figura 1.5. Principales vías de reacción del peroxinitrito en sistemas biológicos. Los números I al V indican los posibles destinos del peroxinitrito: oxidación por un electrón de centros de metales de transición (Fe, Mn, Cu) (I), oxidación por dos electrones de un sustrato blanco (RH) (II), reacción directa del ONOO⁻ con el CO₂ para formar el aducto nitrosoperoxocarboxilato que rápidamente se descompone en radicales secundarios ([•]NO₂ y CO₃^{•-}) con un rendimiento del 35% (III) y el ácido peroxinitroso sufre decaimiento por homólisis rindiendo radicales ([•]NO₂ y [•]OH) en un 30% (IV) e isomerizando el 70% restante a NO₃⁻ (V). Figura tomada de Radi *et al.* 2001⁸³.

1.3.1.5 Dióxido de nitrógeno

El radical libre [•]NO₂ también es una molécula oxidante ($E^0 \cdot\text{NO}_2/\text{NO}_2^- = 0.9 \text{ V}$) de relevancia en biología y es producido por diversos procesos biológicos⁸⁴. Por mucho tiempo ha sido reconocido por ser un importante contaminante del aire y ha sido estudiado extensamente en el área de la química ambiental.

A nivel celular, el [•]NO₂ puede ser formado por distintos mecanismos que se esquematizan en la figura 1.6. Se puede producir por (I) la descomposición por homólisis del peroxinitrito (ya sea mediante su protonación y alternativamente tras la reacción con metales de transición o con CO₂), (II) por la autooxidación del [•]NO (una reacción que se encuentra significativamente favorecida en ambientes

lipídicos) y (III) mediante la oxidación del NO_2^- catalizada por diversas hemoperoxidasas (por ejemplo por la mieloperoxidasa (MPO, EC 1.11.2.2))⁸⁵.

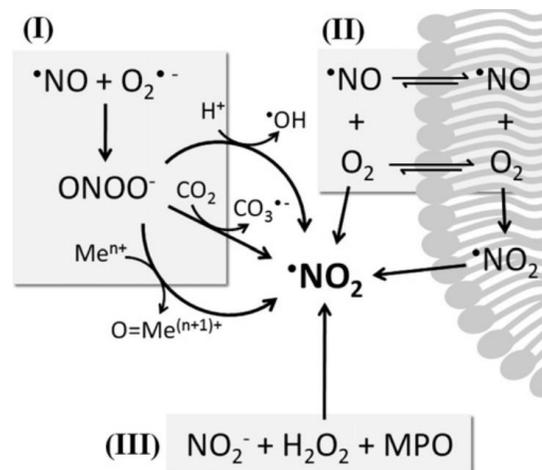


Figura 1.6. Principales fuentes de NO_2 en biología. Figura tomada de Signorelli *et al.* 2011⁸⁵.

El NO_2 presenta baja solubilidad en medios acuosos y alta permeabilidad a través de membranas ($P_m = 5 \text{ cm/s}$)⁸⁵. En solución acuosa se encuentra en equilibrio con su forma dimérica N_2O_4 ($k = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) que se hidroliza a NO_2^- y NO_3^- ($k = 1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$)⁸⁴. Sin embargo, considerando las bajas concentraciones del NO_2 *in vivo* ($<0.1 \mu\text{M}$), es esperable que el NO_2 se encuentre en los sistemas biológicos mayoritariamente en la forma monomérica ($>99.7\%$)⁸⁵.

El NO_2 es una especie oxidante que reacciona mayoritariamente con antioxidantes de bajo peso molecular, proteínas y lípidos poliinsaturados⁴⁰. Las reacciones de recombinación del NO_2 con un gran número de radicales libres se dan a velocidades limitadas por difusión ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), siendo de particular relevancia las reacciones de recombinación del NO_2 con radicales lipídicos y proteicos para producir lípidos y proteínas nitradas. Como se profundizará en la sección que sigue, el NO_2 es capaz de reaccionar con la tirosina para formar el radical tirosilo ($k = 3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁴⁰). El NO_2 puede a su vez recombinar con el radical tirosilo a una velocidad limitada por difusión para formar 3-nitro-tirosina. Por otro lado, la reacción del NO_2 con lípidos poliinsaturados lleva a la formación de nitrolípidos, los cuales han sido en los últimos años objeto de creciente atención en biología. La nitración de proteínas y lípidos puede tener consecuencias biológicas importantes^{84,85}.

1.4 Nitración de tirosinas

La nitración de tirosinas es una modificación post-traducciona que se ha estudiado extensamente en el área de la bioquímica y la biomedicina. Esta modificación puede implicar cambios en la estructura y la función de las proteínas y se ha correlacionado con numerosas patologías, especialmente en aquellas relacionadas con condiciones inflamatorias o degenerativas⁴⁰.

La nitración de tirosina se define como el reemplazo de un hidrógeno por un grupo nitro en la posición 3 del anillo fenólico de la tirosina (NO₂Tyr). El concepto de nitración de residuos de tirosinas en proteínas mediado por componentes endógenos en sistemas biológicos fue introducido por primera vez en el área en el año 1992 en una serie de cuatro artículos publicados por Ischiropoulos, Beckman y colaboradores de la Universidad de Alabama en Birmingham^{34,76,86,87}.

Como se puede apreciar en la figura 1.7, el proceso de nitración de tirosinas inicia con la oxidación por un electrón del anillo fenólico de la tirosina (Tyr) para producir el radical tirosilo (Tyr[•]). Luego en un segundo paso, el radical Tyr[•] reacciona con el [•]NO₂ en una reacción de acoplamiento radical-radical para formar el producto no radicalar 3-nitro-tirosina.

Dada la necesidad de la presencia de especies reactivas para la formación de la NO₂Tyr, la detección de esta modificación se considera una forma de evidenciar el estrés nitro-oxidativo en células y tejidos. Se cree que la principal especie nitrante *in vivo* es el peroxinitrito. El peroxinitrito no reacciona directamente con la tirosina, pero muchos de sus radicales derivados pueden mediar la oxidación de la Tyr a Tyr[•].

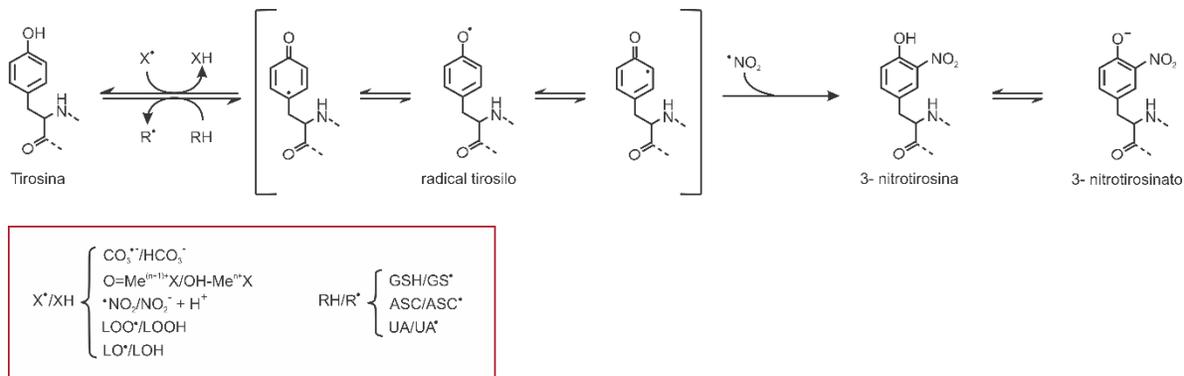


Figura 1.7. Reacciones radicalares de oxidación y nitración de tirosinas. La tirosina (Tyr) puede ser oxidada por distintos oxidantes de un electrón (X^{\cdot}) a radical tirosilo, que luego reacciona con el $\cdot\text{NO}_2$ produciendo 3-nitro-tirosina (NO_2Tyr). Debido a que la NO_2Tyr presenta un pK_a más bajo que la Tyr, se disocia parcialmente al respectivo fenolato a pH fisiológico. Agentes reductores (RH) como el glutatión (GSH), el ascorbato (ASC) y el ácido úrico (UA) pueden reducir el radical tirosilo a tirosina previniendo la formación de productos de oxidación y nitración. Esquema adaptado de Ferrer *et al.* 2018⁴⁰.

Rendimientos altos de NO_2Tyr pueden ser producidos cuando los oxidantes de un electrón y el $\cdot\text{NO}_2$ surgen de la reacción directa entre el peroxinitrito y metales de transición (libres o unidos a proteínas). La reducción por un electrón del peroxinitrito por complejos de metales de transición forman $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$ y $\cdot\text{NO}_2$ que incrementan el rendimiento de la nitración de tirosinas. Este proceso incluso puede ser catalítico para el caso de varias metaloproteínas, incluidas las hemoperoxidasas^{88–91}.

Siendo el peroxinitrito una especie de vida media corta, la detección de tirosinas nitradas ha sido la “huella” o *footprint* de la formación de peroxinitrito más relevante *in vivo*. Se ha detectado por inmunohistoquímica y métodos analíticos en distintas células y tejidos, y bajo distintas condiciones fisiopatológicas^{92–94}.

Es interesante mencionar que, a pesar de ser una modificación no enzimática, la nitración de tirosinas ha mostrado ser un proceso relativamente selectivo. No todas las proteínas son nitradas *in vivo*, y las que sí lo hacen tienen uno o dos residuos de tirosina que son preferencialmente modificados⁴⁰.

Como la nitración de tirosinas es mediada por reacciones de radicales libres, varios productos secundarios pueden surgir en el proceso. Algunos de estos son la 3,3'-ditirosina (DiTyr), que se genera en la reacción radical-radical de dos moléculas de Tyr \cdot y la 3-hidroxitirosina (DOPA), que se produce principalmente por la adición

del $\cdot\text{OH}$ a la tirosina rindiendo una especie radicalar que posteriormente pierde un electr3n formando DOPA.

In vivo, existen muchas reacciones que van a competir con la reacci3n de oxidaci3n por un electr3n de la tirosina, inhibiendo as3 su posterior nitraci3n. Adem3s algunos reductores biol3gicos como el glutati3n (GSH), el 3cido 3rico (UA) y el ascorbato (ASC) pueden mediar reacciones de reparaci3n, reduciendo el radical Tyr \cdot nuevamente a Tyr y previniendo as3 la adici3n del $\cdot\text{NO}_2$.

1.5 Defensas antioxidantes de *T. cruzi*

T. cruzi posee una amplio y complejo sistema antioxidante que le permite defenderse del ataque nitro-oxidativo en el fagosoma, proliferar y establecer la infecci3n⁴¹. Este sistema incluye la mol3cula tripanotiona o N1,N8-bis(glutationil)espermidina (T(SH)₂/TS₂, en las formas reducida y oxidada, respectivamente), principal tiol de bajo peso molecular de tripanosom3tidos⁹⁵, as3 como enzimas antioxidantes que se encuentran localizadas en diferentes compartimentos celulares.

La tripanotiona consiste en dos mol3culas de glutati3n conjugadas a una mol3cula de espermidina (figura 1.8) y es sintetizada por la enzima tripanotiona sintetasa (TS) en dos pasos dependientes de ATP⁹⁶. La TS₂ es reducida a T(SH)₂ por la flavoenzima tripanotiona reductasa (TR) a expensas de NADPH. La T(SH)₂ dirige los equivalentes de reducci3n a distintos blancos celulares como las mol3culas glutati3n disulfuro (GSSG), dehidroascorbato (DHA) y la prote3na diti3lica triparredoxina (TXN).

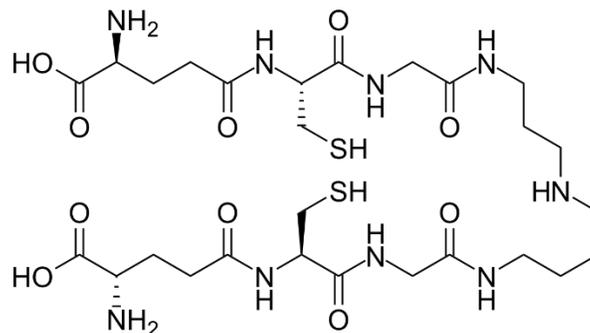


Figura 1.8. Mol3cula de tripanotiona⁹⁶.

La TXN pertenece a la superfamilia de las tioredoxinas y existe en dos isoformas, una citosólica (TXN-I) y otra transmembrana (TXN-II) anclada al retículo endoplásmico y a la mitocondria⁹⁷.

T. cruzi contiene enzimas antioxidantes capaces de detoxificar la mayoría de las especies reactivas producidas por el macrófago (figura 1.9)³³.

En contraste con la mayoría de los eucariotas, no contiene catalasa ni glutatión peroxidasa dependientes de selenio, enzimas que rápidamente metabolizan altos niveles de H₂O₂.

Posee dos peroxirredoxinas 2-Cys típicas denominadas CPX y MPX (formas citosólica y mitocondrial, respectivamente) las cuales reducen de forma eficiente H₂O₂, peroxinitrito^{98,99} e hidroperóxidos orgánicos¹⁰⁰. Además existen evidencias de que estas enzimas son capaces de actuar como chaperonas moleculares, asistiendo el plegamiento de proteínas de manera independiente de ATP (actividad holdasa). Así, estas enzimas serían capaces de contribuir al mantenimiento de la homeostasis proteica previniendo la agregación de proteínas que puede surgir en distintas condiciones de estrés, como puede ser la exposición del parásito al ambiente nitro-oxidativo en el fagosoma del macrófago^{101,102}.

Además contiene a las enzimas glutatión peroxidasa I y II (GPx-I y GPx-II), eficientes en descomponer peróxidos orgánicos pero no reducen H₂O₂. La isoforma GPx-I se localiza en el citosol y en el glicosoma mientras que la GPx-II se localiza en el retículo endoplasmático en el estadio no infectivo epimastigota. Aunque las GPxs pueden utilizar GSH como reductor, son más eficientes utilizando el sistema T(SH₂)/TXN^{103,104}.

Un tercer tipo de peroxidasa es la APx-CcP, relacionada a las hemoperoxidasas de plantas dependientes de ascorbato¹⁰⁵, enzima que reduce H₂O₂ pero no peróxidos orgánicos y puede utilizar tanto ascorbato como citocromo c (Cc²⁺) como sustrato reductor^{106,107}.

T. cruzi presenta varias isoformas de SODs que son dependientes de Fe (Fe-SODs). Contiene cuatro Fe-SODs que se encuentran en distintos

compartimentos celulares, Fe-SODA y SODC localizadas en la matriz mitocondrial, Fe-SODB1 en el citosol y Fe-SODB2 en el glicosoma^{108,109}.

Finalmente mencionar que en *T. cruzi* se ha identificado la presencia de las enzimas metionina sulfóxido reductasas (MSRs), las cuales participan en la defensa del daño oxidativo mediante la reparación de proteínas oxidadas. Estas enzimas catalizan la reacción de reducción de la metionina oxidada (sulfóxido de metionina, MetSO) nuevamente a metionina (Met). El parásito contiene dos clases de MSRs, la MSRA localizada en el citosol y la MSRB localizada tanto en el citosol como en la mitocondria^{110,111}. La enzima MSRA reduce con alta especificidad el isómero S de la MetSO (libre o formando parte de proteínas) mientras que la MSRB reduce el isómero R de la MetSO (principalmente formando parte de proteínas). Se cree que la actividad de ambas enzimas depende de los equivalentes de reducción del sistema T(SH)₂/TXN/NADPH.

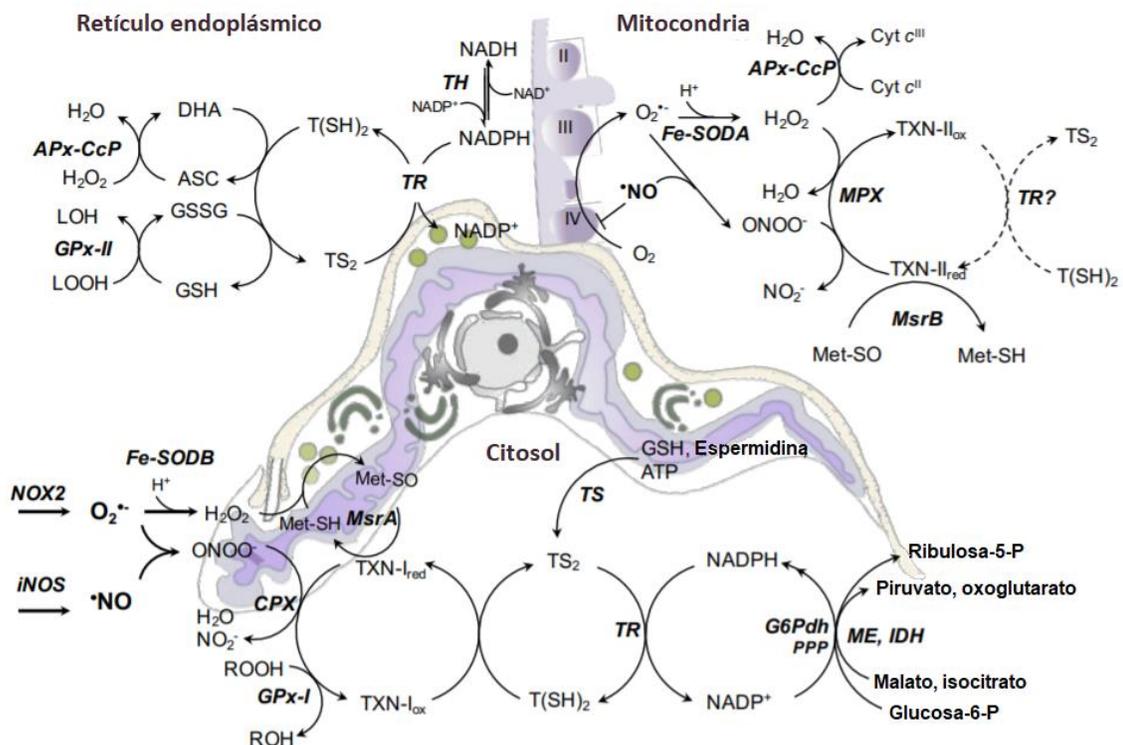


Figura 1.9. Distribución subcelular del sistema enzimático antioxidante de *T. cruzi*. Figura tomada de Piacenza et al. 2013¹¹².

Se ha reportado un incremento en los niveles de enzimas antioxidantes (CPX, MPX, TS, Fe-SODs) en la forma infectiva tripomastigota en comparación con la forma no

infectiva epimastigota, reforzando el concepto de que el proceso de diferenciación le permite al parásito pre-adaptarse al ambiente nitro-oxidativo del hospedero vertebrado. Además, la infección exitosa depende de los niveles de expresión y actividad de estas enzimas. Se encontró una asociación positiva entre la virulencia de las cepas de *T. cruzi* y los niveles de enzimas antioxidantes: cepas con mayor contenido de enzimas se correlacionan con una mayor virulencia y carga parasitaria en el modelo agudo de infección a ratones¹¹³.

Dadas las características únicas del sistema antioxidante parasitario anteriormente detallado en comparación con el hospedero vertebrado, es valorado como un buen blanco quimioterapéutico.

1.6 La hemoperoxidasa de *T. cruzi* (APx-CcP)

1.6.1 Función biológica

La hemoperoxidasa de *T. cruzi* fue inicialmente identificada en el año 2002 por Shane Wilkinson y colaboradores que la definieron como una peroxidasa dependiente de ascorbato, molécula que llamativamente puede ser sintetizada por el propio parásito¹⁰⁵. Determinaron que la enzima está relacionada a las peroxidasas dependiente de ascorbato de plantas (APX) y que cataliza la reducción de H₂O₂ usando el ascorbato como sustrato reductor. Además evidenciaron que la sobreexpresión de la enzima le confiere al parásito resistencia frente al H₂O₂ añadido de forma exógena.

La enzima pertenece a las peroxidasas de clase I. Estudios filogenéticos indican que está relacionada a las hemoperoxidasas de plantas dependientes de ascorbato y que es miembro de las hemoperoxidasas híbridas de tipo A.

Aunque inicialmente Wilkinson y col. describieron a la enzima como una APX, años más tarde en Hugo *et al.*¹⁰⁷ se la renombró como una APx-CcP, dado que se encontró que se trata de una peroxidasa híbrida que puede utilizar tanto ascorbato como Cc²⁺ como sustrato reductor (figura 1.10). De hecho, la enzima presenta una constante de especificidad (k_{cat}/K_M) para el Cc²⁺ ($K_M = 29 \mu M$, $k_{cat}/K_M = 2.1 \times 10^5 M^{-1}$

s^{-1} , pH 7.4) un orden de magnitud mayor que con ascorbato ($K_M = 190 \mu M$, $k_{cat}/K_M = 3.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, pH 7.4)^{106,107}.

Un suceso similar sucedió con la hemoperoxidasa mitocondrial de *Leishmania major*, enzima que fue descubierta en 2005 por Adak *et al*¹¹⁴. Inicialmente fue descrita como una peroxidasa dependiente de ascorbato, pero al final el grupo de Poulos en 2012 la terminó renombrando como una citocromo c peroxidasa (CcP), dado que demostraron que tiene mucha más actividad con el citocromo de *Leishmania major* que con ascorbato¹¹⁵. Una contribución importante de este grupo fue que pudieron purificar de forma recombinante el Cc de *Leishmania major* y verificar que la enzima presenta dos veces mayor actividad con el sustrato de su especie. A pesar de algunos intentos, el Cc de *T. cruzi*, aún no se ha podido purificar de forma recombinante.

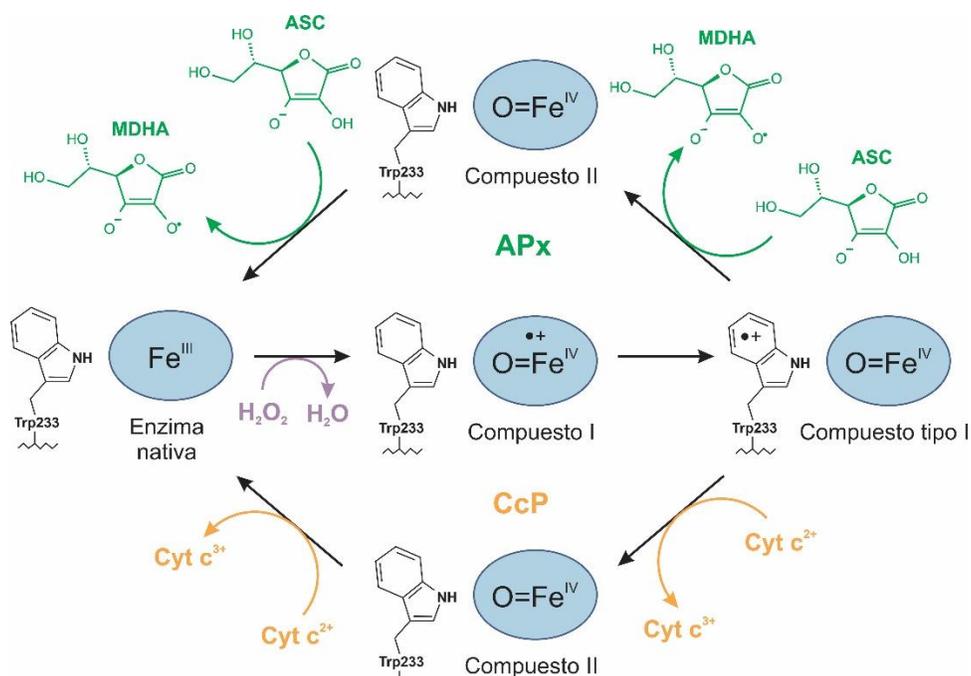


Figura 1.10. Ciclo catalítico de la enzima híbrida (APx-CcP) que puede utilizar tanto ascorbato (actividad APx) como citocromo c (actividad CcP) como sustrato reductor. Dos equivalentes de ascorbato (ASC) o de citocromo c (Cyt en la figura) regeneran la enzima en su estado basal con el hierro en la forma de férrico (Fe^{III}). Inicialmente una molécula de ASC cede un electrón a la enzima quedando en la forma oxidada por un electrón radical monodehidroascorbato (MDHA) y formando el compuesto II. Finalmente otra molécula de ASC le transfiere un electrón al compuesto II regenerando la enzima en su estado basal (Fe^{III}). También se muestra la regeneración de la enzima nativa por dos equivalentes de $Cyt\ c^{2+}$.

La APx-CcP tiene un K_M bajo para el H_2O_2 ($3 \mu M$)¹⁰⁵, más bajo que el de otras enzimas que metabolizan el H_2O_2 como la catalasa, lo que podría reflejar diferencias en su función biológica.

La enzima cataliza la rápida reducción de H_2O_2 con una constante cinética de segundo orden de $3 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ (pH 7.4 y $25^\circ C$)¹⁰⁷. Con fines comparativos, el valor de la constante cinética con H_2O_2 se encuentra en el mismo orden de magnitud que lo reportado para otras peroxidases como las peroxirredoxinas de *T. cruzi* CPX y MPX ($k = 3 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ y $k = 6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, respectivamente) y la hemoperoxidasa de *Leishmania major* (LmP, $k = 6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$)^{116,117}.

La APx-CcP tiene 24 aminoácidos de carácter hidrofóbico en su extremo N-terminal que se cree que es el dominio transmembrana. Inicialmente se la localizó en el retículo endoplasmático, compartimento en el que se han reportado concentraciones de ascorbato en el rango de milimolar. Junto con la peroxidasa dependiente de glutatión (GPx-II) serían las enzimas responsables de la reducción de peróxidos en este compartimento. Aunque estas enzimas tienen distinta especificidad de sustrato, siendo la actividad de la GPx-II restringida a hidroperóxidos lipídicos¹⁰⁵.

También en Hugo *et al*¹⁰⁷ se encontró que la APx-CcP se localiza en el retículo endoplasmático y en la mitocondria en todas las formas del parásito. Llamativamente, en los estadios infectivos del parásito (tripomastigota y amastigota), la enzima tiene un cambio de localización encontrándose también en la membrana plasmática. De esta forma, se ha hipotetizado que la APx-CcP localizada en la membrana plasmática en los estadios infectivos del parásito, en contacto estrecho con el hospedero, podría ser importante en la detoxificación de peróxidos en la interfaz parásito-hospedero durante la fagocitosis.

La APx-CcP constituye un interesante ejemplo de re-localización subcelular en el ciclo de vida de *T. cruzi*. Otro ejemplo es la proteasa cruzipaína, que se encuentra restringida a vesículas en el sistema endosomal/lisosomal en el estadio epimastigota, pero que es re-localizada en la superficie del parásito en el estadio intracelular amastigota. Se ha sugerido que una extensión en el extremo C-terminal

podría participar en esta re-localización. En la APx-CcP todavía no se ha identificado una secuencia que podría estar involucrada en el cambio de localización.

Un importante antecedente de este trabajo establece que la APx-CcP no es esencial para el establecimiento de la infección *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (ratones)¹¹⁸. En este trabajo se observó que los parásitos de la cepa *knockout* para APx-CcP mostraron menores niveles de infección *in vitro* en cultivos celulares, pero fueron capaces de establecer la infección aguda en el modelo murino de la enfermedad. Además la cepa *knockout* no mostró diferencias con la cepa WT en la diseminación de la infección y en la persistencia en el nicho gastrointestinal en la fase crónica de la enfermedad.

Aunque la APx-CcP no es esencial para el establecimiento de la infección, la cepa *knockout* para la enzima mostró una sensibilidad incrementada frente a la exposición a H₂O₂¹¹⁸, en concordancia con lo observado previamente por Wilkinson y col.¹⁰⁵ Además los resultados obtenidos recientemente por Hugo *et. al*¹⁰⁷ sostienen que la enzima es importante para la detoxificación del H₂O₂, dado que los parásitos sobreexpresantes de la APx-CcP mostraron ser más infectivos que la cepa salvaje tanto *in vitro* (cultivo de macrófagos y cardiomiocitos) como *in vivo* (modelo murino de la enfermedad).

1.6.2 Estructura

La APx-CcP contiene el grupo prostético hemo B (figura 1.11), donde tenemos el ion de hierro ligado a una porfirina que tiene dos grupos propionato, dos grupos vinil y cuatro grupos metil. En la APx-CcP el hemo se encuentra coordinado a un residuo de histidina y a una molécula de agua. Como en todas las hemoperoxidasas estudiadas hasta el momento, en el estado basal de la APx-CcP el hierro se encuentra en la forma de férrico (Fe^{III}).

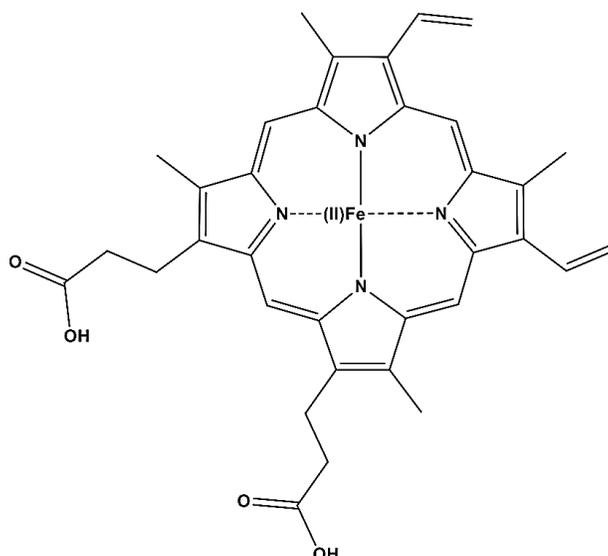


Figura 1.11. Estructura del grupo hemo B libre sin ligandos axiales unidos.

Recientemente, el grupo de la Dra. Emma Raven, que trabajó en colaboración con este proyecto, resolvió la estructura cristalográfica de la APx-CcP WT y de la enzima mutante en el residuo triptofano 233 (W233F), lo que constituye un avance importante en la racionalización de la especificidad de sustrato y el mecanismo catalítico de esta enzima (figura 1.12)¹¹⁹.

La APx-CcP es muy similar en su estructura a la hemoperoxidasa muy relacionada de *Leishmania major* (LmP), con la cual comparte 57% de identidad de secuencia. El sitio activo de la APx-CcP está constituido por los residuos distales Trp92, His93 y Arg89. En el lado proximal tenemos la típica tríada His217-Asp278-Trp233, que también se observa en las hemoperoxidasas APX y CcP. Además cerca del hemo se encuentra otro residuo clave que es la Cys222, que al igual que en LmP, ha sido implicado en la estabilización de un radical catión que se forma en el residuo Trp233 en el ciclo catalítico¹¹⁷.

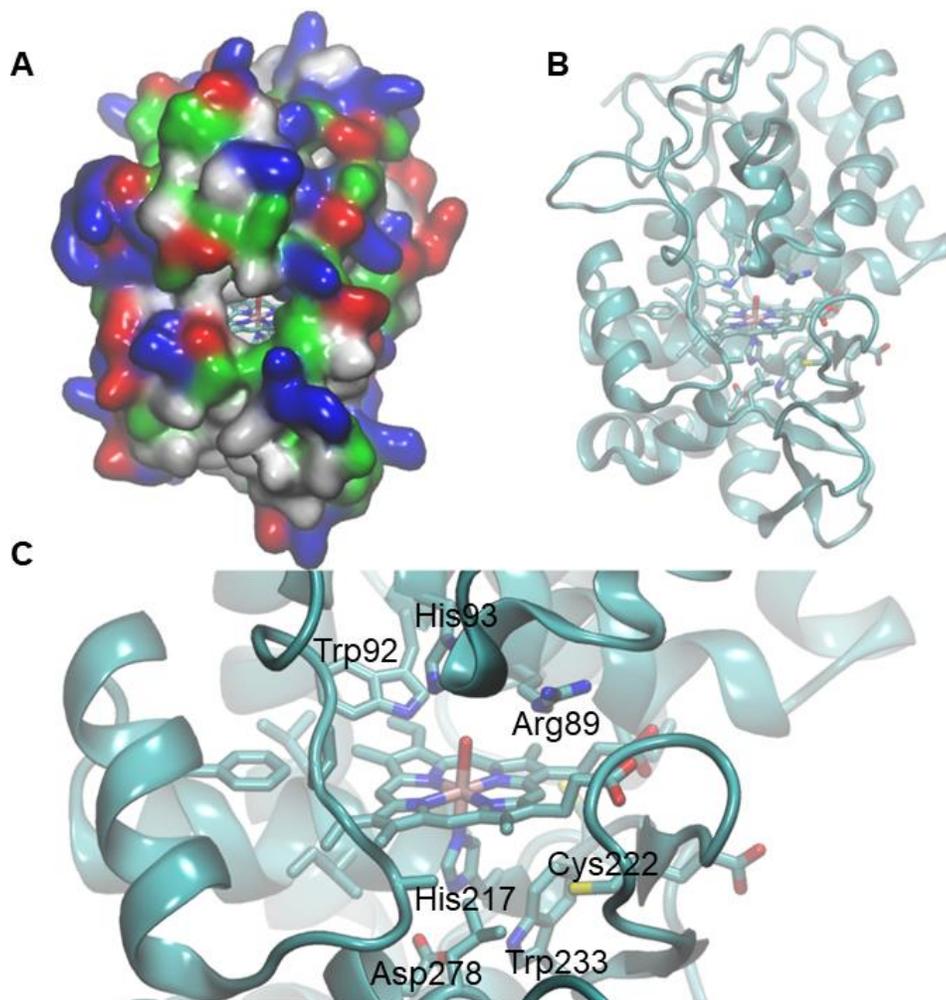


Figura 1.12. Estructura cristalográfica de la hemoperoxidasa de *T. cruzi* (APx-CcP) A. Se muestra el canal de entrada del sustrato al sitio activo de la enzima. B. Estructura secundaria y terciaria de la APx-CcP. C. Sitio activo de la enzima. PDB ID: 7OPT (TcAPx-CcP)¹¹⁹.

1.6.3 Mecanismo catalítico

1.6.3.1 Mecanismo catalítico general de las hemoperoxidasas

El hierro localizado en el centro del cofactor puede adquirir distintos estados redox, lo que es de particular importancia en la química de las hemoperoxidasas donde el hierro pierde y gana electrones en el transcurso de su ciclo catalítico.

Las hemoperoxidasas se encuentran en su estado basal con el hierro en la forma de férrico (Fe^{III}) y cuando reaccionan con el peróxido pasan a tener un estado de oxidación de cuatro, forma comúnmente denominada como ferril (Fe^{IV})¹²⁰.

El ciclo catalítico general para las hemoperoxidasas se esquematiza en la figura 1.13. Cuando estas enzimas reducen al peróxido por dos electrones, uno de estos electrones los cede el hierro, quedando en la forma de ferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). El otro electrón lo cede el anillo de la porfirina, que queda en la forma de catión radical ($\text{P}^{\bullet+}$). Este intermediario enzimático, donde el hemo se encuentra globalmente oxidado por dos electrones, se denomina compuesto I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{P}^{\bullet+}$). Para algunas hemoperoxidasas, entre las que se encuentran la CcP de levaduras y la LmP, este compuesto I no es estable, sino que rápidamente un residuo aminoacídico (triptófano, Trp) localizado cerca del hemo reduce a la porfirina, formando el intermediario que comúnmente se conoce como compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{\bullet+}$). Ya sea que se forme el compuesto I o el compuesto tipo I, estos son reducidos por un electrón por una molécula de sustrato reductor generando la forma que se conoce como compuesto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), el que es secuencialmente reducido por otra molécula de sustrato regenerando la forma basal de la enzima (Fe^{III})¹²⁰.

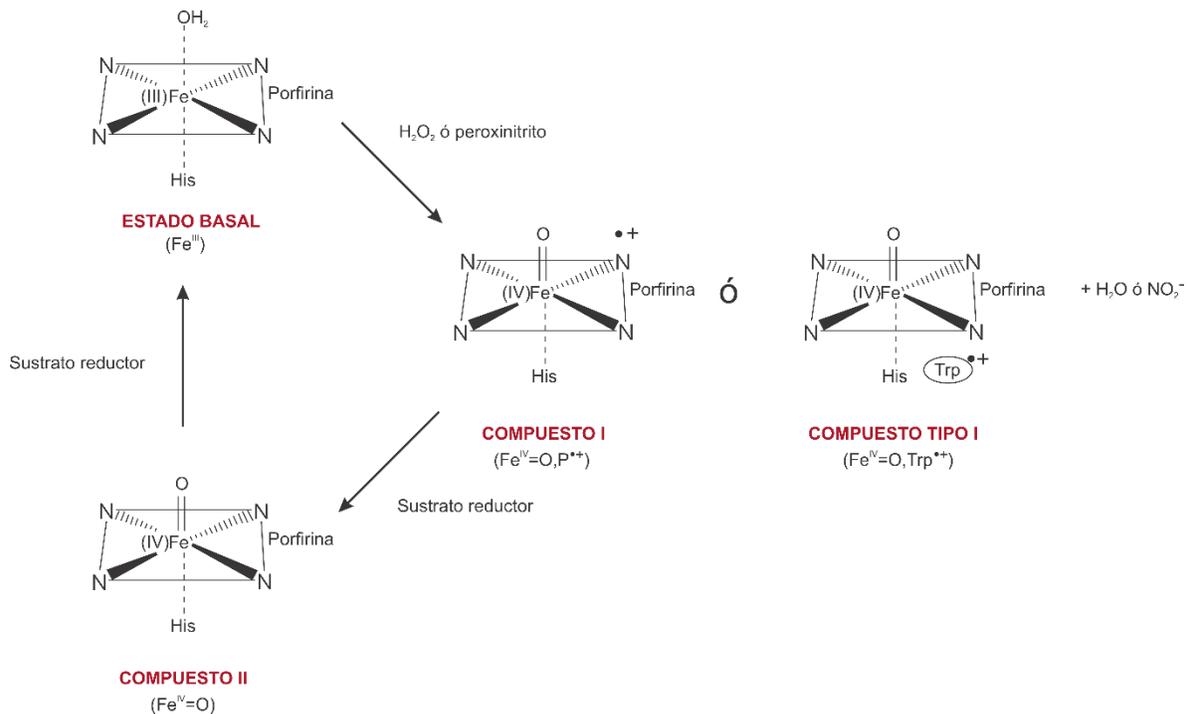


Figura 1.13. Ciclo catalítico general de las hemoperoxidasas.

En la figura 1.14 panel A se ilustra de forma esquemática el compuesto I que se forma en las hemoperoxidasas que más se han estudiado hasta el momento que

son la peroxidasa de rábano (HRP), la citocromo c peroxidasa de hongos (CcP) y la ascorbato peroxidasa de plantas (APX)¹²⁰.

Los distintos intermediarios enzimáticos que se forman en el ciclo catalítico de las hemoperoxidasas han sido tradicionalmente identificados por análisis de los cambios en el espectro de absorción UV-vis y por resonancia paramagnética electrónica (EPR). En la figura 1.14 panel B se esquematizan los espectros de absorción UV-vis característicos de los compuestos I, tipo I y II. La formación del compuesto I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{P}^{+\bullet}$) se puede identificar por una disminución en la intensidad de la banda de absorción de Soret. Los espectros de absorción UV-vis de los compuestos tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{+\bullet}$) y compuesto II (Fe^{IV}) presentan la misma forma. Se puede identificar la formación de estos intermediarios porque se da un corrimiento de la banda de Soret hacia el rojo.

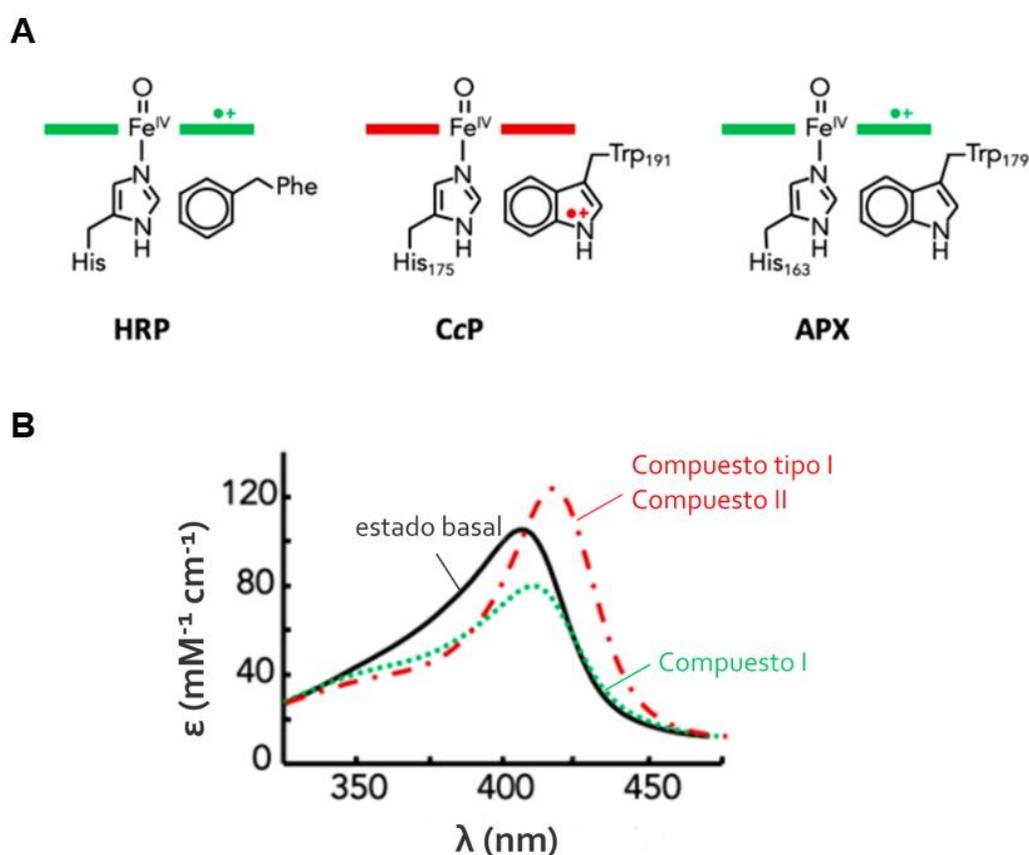


Figura 1.14. Intermediarios que se forman en el ciclo catalítico de las hemoperoxidasas. A. Ilustración esquemática del compuesto I formado en las hemoperoxidasas HRP, CcP y APX. El compuesto I formado en las enzimas HRP y APX es de color verde, el hierro del hemo se encuentra en la forma de ferril y presenta un radical catión centrado en la porfirina. El compuesto tipo I formado en la CcP es de color rojo/marrón, el hierro

del hemo se encuentra en la forma de ferril y se caracteriza por la formación de un radical catión en un residuo de triptófano del sitio activo. **B.** Esquematización de los espectros UV-vis del compuesto I (línea en verde) y de los compuesto tipo I y compuesto II cuyos espectros presentan la misma forma (línea en rojo). Figura adaptada de Moody y Raven 2018¹²⁰.

1.6.3.2 Mecanismo catalítico de la APx-CcP

El mecanismo de reacción de la APx-CcP con H₂O₂ ya se ha estudiado previamente de forma extensa en el grupo de investigación^{106,107,121}.

El ciclo catalítico comienza con la formación del compuesto I, que corresponde a la reducción por dos electrones del H₂O₂ a expensas de la formación de ferril (Fe^{IV}=O) y un radical catiónico centrado en la porfirina (P^{•+}) de la enzima. La presencia de un Trp localizado en las cercanías del hemo (Trp233) rápidamente reduce el radical catión P^{•+} generando un radical catiónico en el aminoácido triptofano 233 (Trp233^{•+}) llevando a la formación de compuesto tipo I. Finalmente, utilizando tanto ascorbato como Cc²⁺ como sustrato reductor se recupera la enzima en su estado basal con el hierro del hemo en la forma férrico (Fe^{III}).

Se ha planteado para la APx-CcP que el compuesto I que inicialmente se genera no es estable y rápidamente forma el compuesto tipo I con el catión radical en el Trp233^{106,121}. La proteína mutante en este Trp (W233F) presenta diez veces menos actividad como ascorbato peroxidasa en comparación con la enzima WT y no presenta actividad detectable citocromo c peroxidasa (CcP). El análisis de la reacción entre la enzima W233F y H₂O₂ llevó al descubrimiento de un compuesto tipo I “alternativo”, donde otro aminoácido además del Trp es capaz de reducir al compuesto I (figura 1.15). Se postuló que en la APx-CcP el residuo Cys222 cercano al hemo sería capaz de reducir al compuesto I llevando a la formación de un radical tiílo (Cys222[•])^{106,121}.

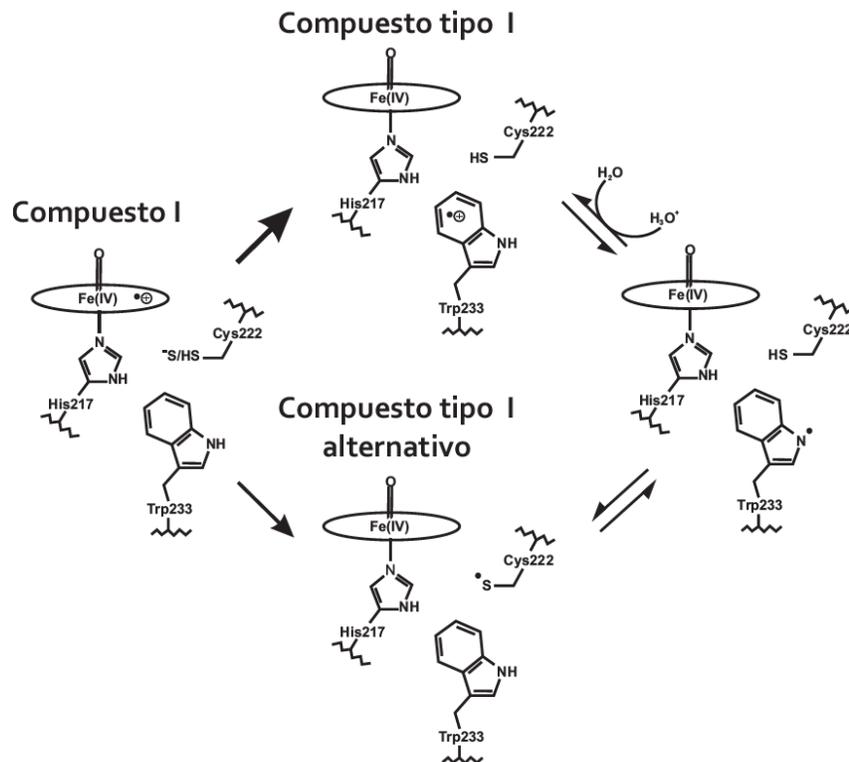


Figura 1.15. Rol del Trp233 y la Cys222 en el ciclo catalítico de APx-CcP luego en la reacción con H_2O_2 .

Figura tomada de Hugo *et al.* 2017¹⁰⁷.

1.7 Reacción de hemoproteínas con peroxinitrito

La química del peroxinitrito reaccionando con centros de metales de transición es compleja en términos de las constantes de velocidad y los posibles productos que se pueden formar en la reacción. Junto con las peroxirredoxinas y las glutatión peroxidasa, algunas hemoproteínas se encuentran entre las enzimas que reaccionan más rápido con el peroxinitrito⁴⁰. Para establecer la relevancia de estas hemoproteínas en el consumo del peroxinitrito un factor importante a considerar es la concentración proteica, que puede ser extremadamente alta en ciertos compartimentos o en algunos tipos celulares especializados.

Los posibles productos que se pueden formar en la reacción de las hemoproteínas con el peroxinitrito se esquematizan en la figura 1.16 y en la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de constantes de velocidad.

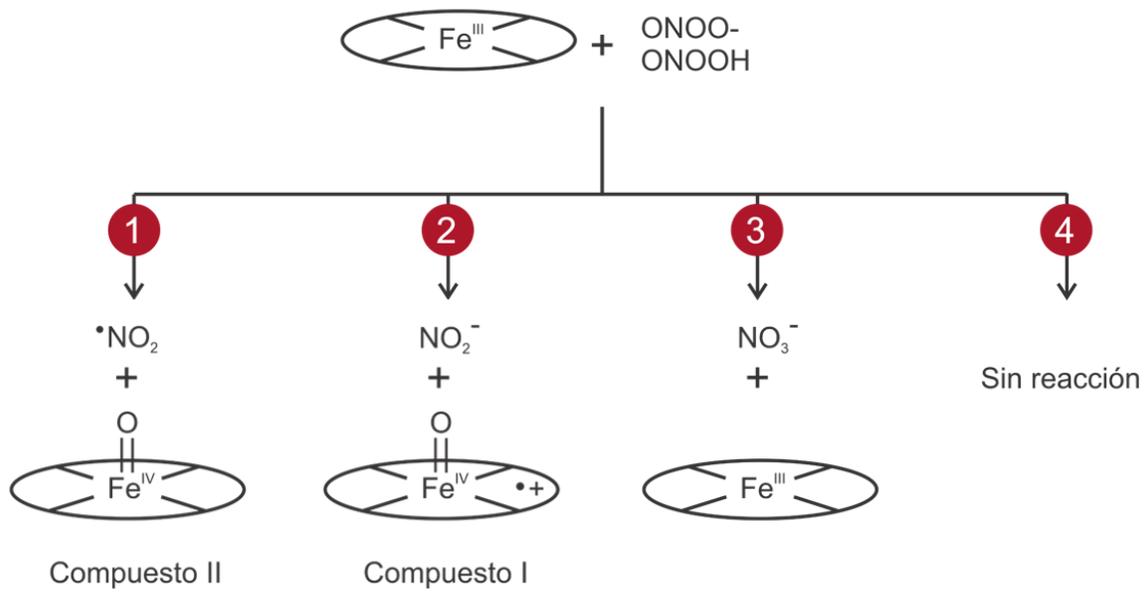


Figura 1.16. Reacción de hemoproteínas con peroxinitrito. Adaptado de Ferrer y Radi 2009¹²².

De las hemoperoxidasas de mamíferos, las que reaccionan más rápido son la MPO y la lactoperoxidasa (LPO) con constantes cinéticas aparentes en el orden de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ver tabla 1). Se ha caracterizado que estas enzimas reaccionan por un mecanismo de un electrón formando compuesto II y $\cdot\text{NO}_2$ (vía 1 en figura 1.16)¹²³⁻¹²⁶. Se cree que reaccionan con la forma neutra ácido peroxinitroso de acuerdo a la dependencia del valor de la constante cinética aparente con el pH. La reacción es usualmente considerada como potencialmente deletérea dado que lleva a la formación de $\cdot\text{NO}_2$ junto con otra especie oxidante que es el compuesto II. Es posible que estas enzimas en su reacción con el peroxinitrito catalicen la nitración de tirosinas.

Otras peroxidasa encontradas en el humano, como la peroxidasa eosinofílica, la peroxidasa tiroidea y algunas peroxidasa vasculares recientemente descritas no han sido caracterizadas aún en su reacción con peroxinitrito⁴⁰.

También se ha estudiado que la HRP reacciona de forma eficiente con el peroxinitrito con una constante de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pero a diferencia de las enzimas anteriormente mencionadas, la HRP reacciona con el peroxinitrito por un mecanismo de dos electrones llevando a la formación de compuesto I y NO_2^- (vía 2 en figura 1.16)^{123,127}. Además en otra enzima que se forma el compuesto I es la

prostaglandina G/H sintasa-1 (PGHS-1), para la que se ha caracterizado que el peroxinitrito reacciona con el dominio peroxidasa.

Con respecto a la reacción de la catalasa con peroxinitrito existe controversia en la literatura. Inicialmente en dos artículos publicados a finales de los 90 se afirmaba que la catalasa no era capaz de reaccionar con el oxidante^{123,128}. Sin embargo, de acuerdo a un reporte más reciente, la enzima es capaz de reaccionar rápidamente con una constante en el orden de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y por un mecanismo de dos electrones evidenciado por la formación del compuesto I en la enzima luego de la reacción¹²⁹.

También tenemos el caso de las proteínas oxihemoglobina, metahemoglobina y metmioglobina que catalizan la isomerización del peroxinitrito a NO_3^- , con constantes en el orden de $\sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (vía 3 en figura 1.16).

Para el caso de las proteínas hemo-tiolato, en muy pocas se ha caracterizado la reacción con el peroxinitrito entre las que se encuentran los citocromo P450, las NOS y la cloroperoxidasa (CPO)¹³⁰.

Finalmente mencionar que pueden existir hemoproteínas que no reaccionen con el peroxinitrito a velocidades apreciables, como es el caso del citocromo c en su forma oxidada (Fe^{III})¹²².

Tabla 1. Reacción de hemoproteínas con peroxinitrito.

Hemoproteína	Constante de reacción con peroxinitrito		Producto del hemo	Ref
	$k^{app} (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	Condiciones		
mieloperoxidasa	6.2×10^6	25°C, pH 7.2	Compuesto II	123
lactoperoxidasa	1.9×10^6	23 °C, pH 7.1	Compuesto II	125
peroxidasa de rábano	1.0×10^6	25 °C, pH 7.4	Compuesto I	127
catalasa	1.7×10^6	23 °C, pH 7.1	Compuesto I	129
prostaglandina endoperóxido H sintasa-1	1.7×10^7	8 °C, pH 7	Compuesto I	131
citocromo P450 (BM-3)	1.0×10^6	12 °C, pH 6.8	Compuesto I	132
cloroperoxidasa	2.0×10^6	23 °C, pH 5.1	Compuesto II	130
oxihemoglobina	2.4×10^4	37 °C, pH 7.4	Fe(III)	133
methemoglobina	3.9×10^4	20 °C, pH 7.0		134
metmioglobina	7.7×10^4	20 °C, pH 7.0		134
citocromo c Fe(II)	1.3×10^4	25°C, pH 7.4	Fe(III)	135

1.8 El ascorbato y su biosíntesis en *T. cruzi*

El ascorbato (AA) o ácido ascórbico cuando se protona ($pK_{a1} = 4.1$) es una molécula orgánica relativamente pequeña que es comúnmente reconocida como vitamina C (figura 1.17).

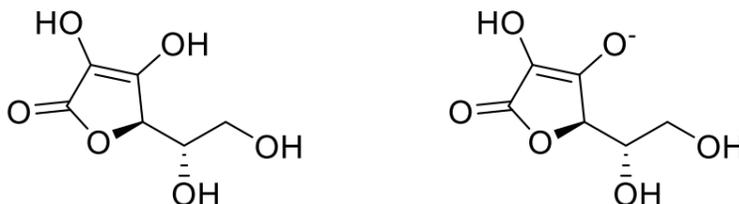


Figura 1.17. Estructuras químicas del ácido ascórbico (izquierda) y del ascorbato (derecha). Dado que el valor de pK_{a1} del ácido ascórbico es de 4.1, a pH fisiológico (7.4) predomina la forma ascorbato (99.95%).

La deficiencia en la vitamina C en humanos es ampliamente conocida por dar lugar a la aparición del escorbuto. Como todas las vitaminas, los humanos la requieren, pero no la pueden sintetizar. Mientras que muchos animales pueden sintetizar el ascorbato, los primates han perdido las enzimas necesarias para su síntesis, por lo que dependen enteramente de la dieta para su incorporación. En particular, se cree que la pérdida de la capacidad de sintetizar el ascorbato se debe a una mutación con pérdida de función de la enzima con actividad gulonolactona oxidasa que cataliza el último paso de la vía en mamíferos¹³⁶.

El ascorbato cumple funciones importantes que han sido revisadas recientemente¹³⁶, entre las que se encuentran participar en la síntesis de colágeno, facilitar la absorción de hierro y formar parte de sistemas antioxidantes.

En el humano el rango de concentraciones del ascorbato en el interior de la mayoría de las células es de 0.05 - 5 mM¹³⁷. Para el caso del plasma los niveles basales de ascorbato son 20 - 30 μ M, alcanzando 100 μ M luego de la suplementación¹³⁸.

La química del ascorbato es sorprendentemente compleja y ha sido revisada extensamente^{137,139}. Reacciona con los radicales de relevancia biológica radical superóxido, tocoperóxido y alcóxido/peróxido con constantes de velocidad $> 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ¹⁴⁰. Además puede reducir radicales en residuos aminoacídicos de forma efectiva. Luego de reducir estos radicales, el ascorbato queda en la forma oxidada

por un electrón radical monodehidroascorbato (MDHA), el cual es estable y presenta baja reactividad. En el caso de la reacción del ascorbato con H_2O_2 , ésta es lenta con una constante de velocidad de $2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7¹³⁶.

Las vías de síntesis endógena de ascorbato difieren entre animales, plantas y hongos (figura 1.18). Los hongos sintetizan un análogo de 5 carbonos del ascorbato que es el D-eritroascorbato. El último paso de la ruta es catalizado por una enzima óxido-reductasa dependiente de flavina que se la ha designado de acuerdo a su sustrato fisiológico como gulonolactona oxidasa (GLO, EC 1.1.3.8) en mamíferos, galactonolactona deshidrogenasa (GALDH, EC 1.3.2.3) en plantas y arabinonolactona oxidasa (ALO, EC 1.1.3.37) en hongos¹³⁶. Esta enzima ha sido identificada en *T. cruzi* (*TcGALDH/ALO*), lo que sugiere la capacidad del parásito de sintetizar ascorbato de forma endógena.

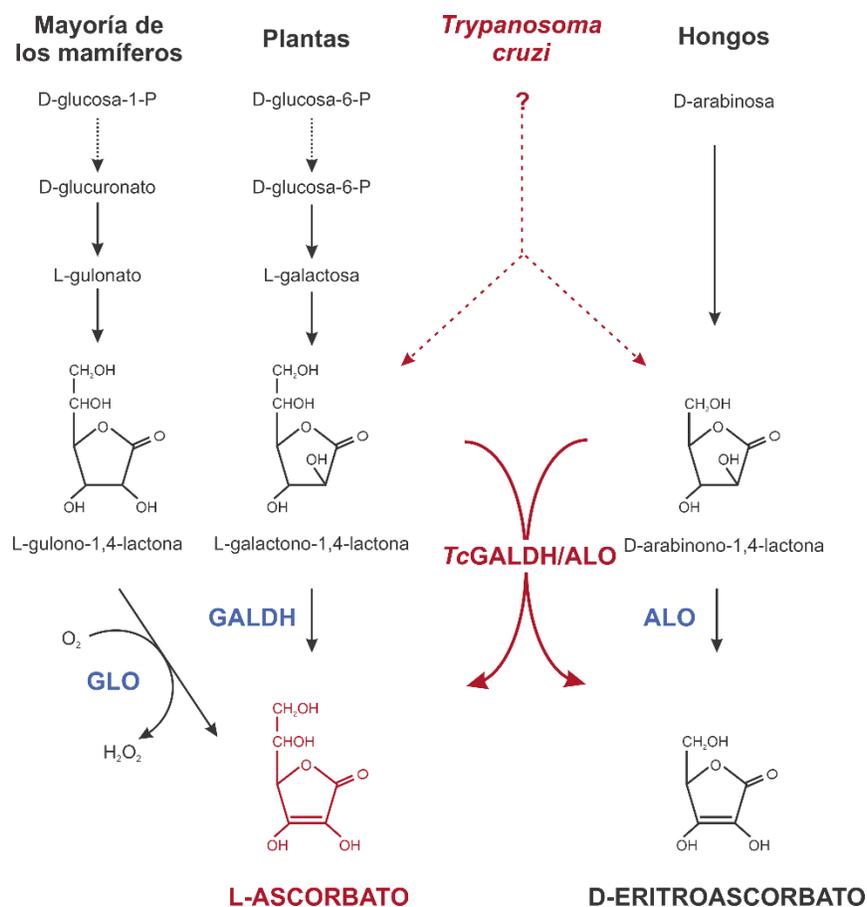


Figura 1.18. Vías de biosíntesis del ascorbato y del eritroascorbato¹³⁶.

Se determinó que *TcGALDH/ALO* se localiza en el glicosoma pero aún no se ha identificado su sustrato *in vivo*¹⁴¹. La *TcGALDH/ALO* recombinante presenta actividad con los sustratos L-galactono-1,4-lactona y D-arabinono-1,4-lactona presentes en plantas y hongos pero carece de actividad con el sustrato L-gulono-1,4-lactona presente en mamíferos. Se la relaciona principalmente a la *GALDH* de plantas, dado que ambas enzimas presentan mayor especificidad por el sustrato L-galactono-1,4-lactona y el cofactor FMN unido de forma no covalente¹⁴². Además se han planteado mecanismos no enzimáticos y enzimáticos para la reducción de la forma oxidada dehidroascorbato (DHA) nuevamente a ascorbato en *T. cruzi*¹⁴³.

Logan *et al.*¹⁴² determinaron que parásitos de *T. cruzi* en los estadios epimastigota y amastigota no son capaces de incorporar ascorbato del medio de cultivo, por lo que dependerían únicamente de la ruta biosintética. No se conoce aún la capacidad de incorporación de ascorbato del estadio infectivo tripomastigota sanguíneo y metacíclico. La concentración intracelular de ascorbato se encuentra cercana a 1 mM en epimastigotas y en el rango de 2-4 mM en tripomastigotas¹⁴³.

La enzima *TcGALDH/ALO* presenta 20 veces mayor actividad específica que la homóloga en *Trypanosoma brucei*. Esto podría reflejar un mayor requerimiento de ascorbato en *T. cruzi*, que es un parásito intracelular obligado, frente a *Trypanosoma brucei* que es extracelular y por lo tanto no será expuesto a las especies reactivas generadas en el fagosoma. Además, el hecho de que *Trypanosoma brucei* carezca de APx-CcP sugiere un rol más importante de las peroxidasa dependientes de ascorbato en los parásitos intracelulares obligados¹⁴².

A pesar de la importancia del ascorbato en el sistema antioxidante de *T. cruzi*, ya sea por reducción directa de oxidantes o por transferencia de electrones desde la tripanotona hacia la APx-CcP, muy poco se sabe acerca de su metabolismo. El estudio bioquímico de esta ruta biosintética abre posibilidades en el diseño de inhibidores específicos como antiparasitarios en aquellos casos donde la ruta sea esencial para la viabilidad del parásito.

2. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

El presente trabajo de Maestría se centra en el estudio de la reacción de la hemoperoxidasa híbrida tipo A de *Trypanosoma cruzi* (APx-CcP) con el oxidante peroxinitrito. Si bien la reactividad de la enzima APx-CcP con H₂O₂ ya fue estudiada previamente en el grupo de investigación, hasta la fecha se desconoce el rol de la enzima en la detoxificación del oxidante peroxinitrito, un potente agente citotóxico contra el parásito.

A pesar de que esta hemoperoxidasa no es esencial para el establecimiento de la infección, uno de los principales antecedentes de este proyecto de Maestría realizado por el grupo de investigación establece que la APx-CcP es importante para la detoxificación de H₂O₂ y que parásitos sobreexpresantes de la enzima resultan ser más infectivos tanto *in vitro* (infecciones a cultivos de macrófagos y cardiomiocitos) como *in vivo* (modelo murino de la enfermedad).

Además previamente en el grupo se estudió que la enzima se localiza en la membrana plasmática en las formas infectivas del parásito (tripomastigota y amastigota), en estrecho contacto con el hospedero, lo que abre nuevas posibilidades en cuanto a su rol en la detoxificación de peróxidos provenientes del macrófago.

Frente a este descubrimiento, nos planteamos que la enzima podría tener un rol en la detoxificación del peroxinitrito proveniente del macrófago durante la fagocitosis, protegiendo así al parásito de sus efectos citotóxicos.

Asimismo es de interés evaluar cuál es el rol del ascorbato como sustrato reductor de la enzima en la infección de *T. cruzi* a macrófagos. Nos planteamos la hipótesis de que la presencia del sustrato reductor de la enzima sería capaz de conferirle al parásito una mayor capacidad de detoxificación de peróxidos provenientes del macrófago y por tanto un mayor nivel de infección.

Preguntas que se intentarán responder

- ¿El mecanismo de reacción de la APx-CcP con peroxinitrito es similar al reportado previamente con H_2O_2 ?
- ¿La enzima protege al parásito de los efectos citotóxicos del peroxinitrito en el fagosoma del macrófago?
- ¿Cuál es el rol del ascorbato en la capacidad del parásito de detoxificación de peróxidos provenientes del macrófago?

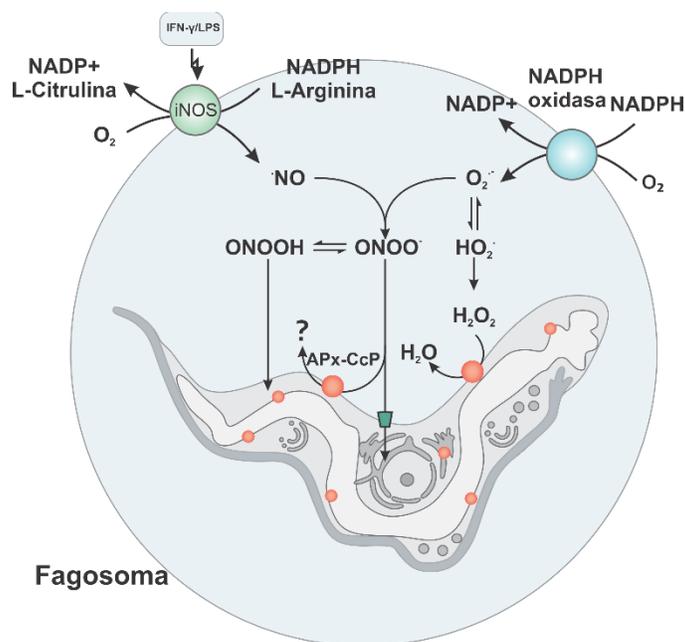


Figura 2.1. Dado que la APx-CcP se localiza en la membrana plasmática en los estadios infectivos del parásito, en esta tesis de Maestría se intentará responder si la enzima es capaz de detoxificar el peroxinitrito, un potente agente citotóxico contra *T. cruzi*.

3. OBJETIVOS

En el presente trabajo se propuso, como objetivo general, caracterizar la reacción de la enzima APx-CcP de *Trypanosoma cruzi* con peroxinitrito *in vitro* e *in vivo*.

Los dos objetivos específicos planteados fueron:

#1. Caracterizar la cinética de la reacción de la APx-CcP recombinante con peroxinitrito

#2. Evaluar el rol de la APx-CcP y del ascorbato como reductor en la detoxificación de peroxinitrito durante la infección a macrófagos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y soluciones

Los reactivos N-etilmaleimida (NEM), ácido γ -amino-levunílico (ALA) lipopolisacárido (LPS), 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), dador de \cdot NO (NOC-18), 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1), N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), interferón γ (IFN- γ), ascorbato, Tripsina–EDTA (solución 10 X), peroxidasa de rábano (HRP) y el citocromo c de caballo fueron obtenidos de Sigma. El isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es de Bioworld. Las sondas 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y Amplex®-Red se obtuvieron de Invitrogen. La fluoresceína se obtuvo de Fluka. El H₂O₂ se obtuvo de Mallinckrodt.

Los medios de cultivo *Brain Heart Infusion* (BHI) y *Luria-Bertani* (LB) se adquirieron de Sigma. El medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) y el suero fetal bovino (SFB) se adquirieron de Gibco. Los antibióticos penicilina, estreptomicina y geneticina (G418) se adquirieron de Sigma.

La solución de peroxinitrito se sintetizó en el laboratorio a partir de H₂O₂ y NO₂⁻ (ver sección 4.2 que sigue), se almacenó a -80 °C y fue diluido en NaOH (10 mM) preparado fresco al momento de su uso. La sonda fluoresceína boronato (FL-B) se sintetizó en el laboratorio por la Dra. Natalia Ríos. Se preparó disolviendo el compuesto sólido en DMSO que se almacenó a -20 °C.

El anticuerpo primario anti-APx-CcP se produjo en conejo en colaboración con el bioterio de la Facultad de Medicina. El anticuerpo primario anti-DMPO fue amablemente cedido por el Dr. Ronald Maison (NIEHS, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los anticuerpos secundarios IgG anti-ratón (conjugado a IR Dye-680 o -800) y IgG anti-conejo (conjugado a IR Dye-680 o-800) se adquirieron de LI-COR Biosciences.

Las concentraciones de APx-CcP, H₂O₂ y peroxinitrito se midieron espectrofotométricamente a 409 (101 mM⁻¹ cm⁻¹), 240 (39.4 M⁻¹ cm⁻¹)¹⁴⁴ y 302 nm (1700 M⁻¹ cm⁻¹)¹⁴⁵, respectivamente.

Excepto que se especifique lo contrario, todos los experimentos se realizaron en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4 y a 25 °C. El amortiguador fue preparado fresco al momento de su uso para evitar la contaminación con CO₂.

4.2 Síntesis de peroxinitrito

El peroxinitrito fue sintetizado en un reactor de flujo detenido a partir de NaNO₂ y H₂O₂ en condiciones ácidas como fue descrito previamente¹⁴⁶. La solución stock fue tratada con óxido de manganeso (MnO₂) granular para eliminar el H₂O₂ remanente de la síntesis. El contenido de NO₂⁻ presente en las soluciones de peroxinitrito fue menor al 30%.

4.3 Expresión y purificación de APx-CcP WT y W233F recombinante

La expresión y purificación de la enzima APx-CcP WT y W233F se realizó como se reportó previamente¹⁰⁶. Brevemente, bacterias *Escherichia coli* DE3 transfectadas con el plásmido se cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0.6 U.A. En este momento se bajó la temperatura a 22°C y se adicionó IPTG (0.5 mM) y ácido γ-amino-levunílico (ALA) (0.5 mM) durante toda la noche. El agregado del precursor del hemo (ALA) al medio de cultivo de la bacteria aumenta significativamente el rendimiento de proteína recombinante activa¹⁰⁵.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) utilizando una columna con iones inmovilizados de níquel (HiTrap 5 mL de Amersham Biosciences) equilibradas con amortiguador de unión (amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4, imidazol 10 mM y NaCl 500 mM). La elución se realizó mediante un gradiente lineal de imidazol (10 - 500 mM) a un flujo de 3 mL min⁻¹ en un equipo de cromatografía líquida de baja presión AKTA pure (GE-Healthcare) con detección UV a 280 nm. El imidazol se removió de las fracciones eluidas mediante gel filtración utilizando una columna HiTrap desalting (Amersham Biosciences) equilibradas con amortiguador fosfato (50 mM, pH 7.4). La pureza se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% y tinción con Azul de Coomassie. El porcentaje de incorporación del grupo hemo se determinó

espectrofotométricamente por la relación entre la absorbancia correspondiente a la banda de Soret ($\epsilon_{409\text{ nm}} = 101\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) y la absorbancia a 280 nm correspondiente al contenido de proteína total ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 56.9\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Para los experimentos únicamente se consideró la concentración de holoenzima midiendo la absorbancia a 409 o 414 nm ($\epsilon = 101\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) para la enzima WT y mutante W233F, respectivamente.

La proteína mutante W233F, donde se sustituye el residuo crítico Trp233 por una fenilalanina, fue generada previamente en el laboratorio mediante un kit de mutagénesis sitio dirigida¹⁰⁷.

4.4 Ensayos de cinética rápida usando un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped flow)

Se estudió la cinética de la reacción de la enzima APx-CcP con peroxinitrito utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido (SX20 Applied PhotoPhysics). La reacción se estudió por el método de las velocidades iniciales siguiendo la descomposición de peroxinitrito a 302 nm ($\epsilon = 1700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

En el método de velocidades iniciales se mezcló peroxinitrito (15 μM) con concentraciones variables de APx-CcP WT (0-10 μM) y se siguió la descomposición de peroxinitrito a 302 nm. Una función lineal se ajustó a los primeros segundos de reacción y la velocidad inicial se obtuvo al dividir la pendiente obtenida del ajuste por el coeficiente de extinción molar del peroxinitrito multiplicado por 1.25. Este último factor tiene en cuenta que a pH 7.4 un 20% de peroxinitrito se encuentra en la forma neutra y no absorbe a 302 nm. La constante cinética de la reacción (k_2) se calculó como se indica en la ecuación [9].

$$v_0 = k_1 + k_2 \times [\text{APx-CcP}]_0 \times [\text{Peroxinitrito}]_0. \quad [9]$$

4.5 Determinación de la constante cinética de reacción por un ensayo de competencia

Alternativamente, se determinó la constante de velocidad de la reacción de APx-CcP con peroxinitrito mediante ensayos de cinética de competencia¹⁴⁷ con

compuestos boronados disponibles en el laboratorio (ácido borónico de cumarina, CBA).

Brevemente, para un par de reacciones compitiendo por un reactivo en común:



Bajo condiciones donde $[A_1]$ y $[A_2] > [B]$, pero sin llegar a excesos de $[A_1]$ y $[A_2] > 10 \times [B]$ la relación de reactividades estará dada por:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\ln\left(\frac{[A_1]_0}{[A_1]_0 - [P_1]}\right)}{\ln\left(\frac{[A_2]_0}{[A_2]_0 - [P_2]}\right)} \quad [10]$$

En nuestro caso: $A_1 = \text{CBA}$; $A_2 = \text{APx-CcP}$; $B = \text{peroxinitrito}$; $P_1 = \text{cumarina (COH)}$; $P_2 = \text{APx-CcP}_{\text{ox}}$ y k_1 es la constante de velocidad para la reacción entre CBA y el peroxinitrito ($k \approx 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). En el ensayo se utilizó APx-CcP (7.5-20 μM), CBA (10 μM) y peroxinitrito (5 μM) y se siguió la formación de P_1 (COH) en ausencia y en presencia de las diferentes concentraciones de APx-CcP. La cantidad de COH formada se determinó fluorimétricamente o mediante técnicas de HPLC utilizando para ello estándares verdaderos de COH (Infinity 1260; Agilent)¹⁴⁸.

4.6 Evaluación de la descomposición catalítica de peroxinitrito por un ensayo de competencia

Para evaluar si la enzima es capaz de descomponer al peroxinitrito de forma catalítica se generó un flujo de peroxinitrito con SIN-1 (0.5 mM) y se registró la oxidación de la sonda FL-B (10 μM) en el tiempo en presencia de distintas concentraciones de APx-CcP (0.2, 2 y 4 μM) en ausencia o presencia del sustrato reductor ascorbato (200 μM).

La estimación del flujo de producción de peroxinitrito dependiente de SIN-1 se realizó mediante una curva de calibración donde se mezcló FL-B (100 μM) con concentraciones variables de peroxinitrito adicionado en bolo (0-10 μM). Luego de mezclar los dos reactivos se realizaron medidas puntuales de la intensidad de fluorescencia y se graficó URF vs $[\text{ONOO}^-]$ (μM). De forma simultánea se registró

el curso temporal de la oxidación de la FL-B (100 μM) por el peroxinitrito derivado de SIN-1 (0.5 mM).

Para evaluar la posible interferencia del ascorbato en el ensayo de competencia se mezcló la sonda FL-B (10 μM) con peroxinitrito adicionado en bolo (5 μM) en presencia de concentraciones variables de ascorbato (1, 2, 5, 10 y 20 mM). Como control positivo se realizó la competencia con NaHCO_3 12.5 y 25 mM (correspondiente a 0.6 y 1.2 mM de CO_2 , respectivamente) o GSH (1, 2, 5, 10 y 20 mM).

Todos los cursos temporales y las medidas puntuales de fluorescencia se registraron en un lector de placas de fluorescencia y a 25 °C (Varioskan, Thermo, $\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$).

4.7 Análisis de espectros de absorbancia UV-vis

Los espectros de absorbancia en el UV-vis fueron registrados antes y después de mezclar APx-CcP WT con un bolo de peroxinitrito (relación APx:ONOO⁻ 1:1.5) o de H₂O₂ (relación 1:1). Los espectros de absorbancia en el tiempo fueron registrados cada 2 minutos por 25 minutos para evaluar la estabilidad del intermediario enzimático formado luego de la reacción. El decaimiento endógeno del intermediario enzimático fue monitoreado por la disminución de la absorbancia a 550 nm en el tiempo. Una función exponencial simple fue ajustada a la curva para estimar la vida media de dicho intermediario enzimático. Los espectros se registraron entre 260 y 700 nm en un espectrofotómetro Shimadzu.

4.8 Experimentos de inmunospin trapping con DMPO

La formación del radical aminoacídico característico del compuesto tipo I se detectó mediante el atrapador de spin 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO). La enzima WT (10 μM) se expuso a H₂O₂ o peroxinitrito (10 μM y 30 μM) en presencia de DMPO (100 mM). Cuando se indica, la proteína fue tratada con NEM (50 mM) de forma previa a la exposición al oxidante. Alternativamente, la enzima se mezcló primero con el oxidante y luego de 10 segundos de iniciada la reacción se agregó el DMPO (100 mM).

El aducto DMPO-nitrona-proteína formado se detectó mediante técnicas de Western blot (ver sección 4.12) utilizando para ello un anticuerpo específico anti-DMPO-nitrona¹⁴⁹.

4.9 Estudio de la inactivación y nitración de la enzima recombinante expuesta a peroxinitrito

La enzima WT o W233F (15 μM) se trató con bolos de peroxinitrito (0-1500 μM) en una dosis única bajo agitación (utilizando vórtex). Posteriormente a la exposición al oxidante se midió la actividad enzimática ascorbato o citocromo c peroxidasa (ver sección 4.10) y se analizó la nitración de residuos de tirosinas por Western blot (ver sección 4.12) utilizando un anticuerpo específico anti-3-nitro-tirosina.

4.10 Medidas de actividad enzimática usando ascorbato o citocromo c

La actividad peroxidasa se evaluó utilizando ascorbato o Cc^{2+} como sustrato reductor. El Cc se redujo previamente con ditionito y el exceso de reductor se removió inmediatamente mediante gel filtración utilizando las columnas HiTrap desalting (Amersham Biosciences) y amortiguador fosfato (100 mM, pH 7.4) como amortiguador de elución. La concentración de Cc^{2+} se calculó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}} = 8900$ y $29900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la forma reducida y oxidada del Cc respectivamente). Los ensayos se realizaron en espectrofotómetro (Shimadzu) a temperatura ambiente y amortiguador fosfato (50 mM, pH 7.4). La actividad peroxidasa ascorbato-dependiente se monitoreó siguiendo la oxidación del ascorbato a 290 nm ($\epsilon_{290\text{nm}} = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) incubando la enzima (0-1 μM) con H_2O_2 (40 μM) y ascorbato (200 μM). La actividad peroxidasa dependiente de Cc^{2+} se evaluó a 550 nm incubando la APx-CcP WT (0.05-0.3 μM) o W233F (0.1-1 μM) con H_2O_2 (0-40 μM) y Cc^{2+} (50 μM).

4.11 Medidas de actividad peroxidasa usando Amplex® Red

La actividad peroxidasa de la APx-CcP también se midió por oxidación del Amplex® Red siguiendo el producto fluorescente resorufina. En este ensayo se mezcló APx-CcP (0.5 μM), Amplex® Red (15, 30 o 60 μM) y concentraciones variables de

H₂O₂ (0-100 µM). Se siguió el aumento de la intensidad de fluorescencia asociado a la formación de la resorufina. Las determinaciones se llevaron a cabo en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4 y a 25°C en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan, Thermo, λ_{exc} = 563 nm y λ_{em} = 587 nm).

4.12 Western blots

Las proteínas se separaron en un gel con SDS al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó el bloqueo en amortiguador fosfato salino conteniendo 5% m/v de leche en polvo descremada. Las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos anti-3-nitro-tirosina, anti-APx-CcP, anti-c-myc9E10 o anti-DMPO-nitrona. Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en PBS y Tween 20 (0.1% v/v) y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Luego las membranas se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados (ya sea IR Dye-800 e IR Dye-680 de Li-COR Biosciences) y se visualizaron en un sistema de detección de fluorescencia en el infrarojo (Odyssey, Li-COR Biosciences).

Los extractos proteicos totales de *T. cruzi* se obtuvieron a partir de 6×10^8 parásitos/mL utilizando amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 0.5 % (v/v); pH 8.0) conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma) durante 15 min a °C. Los extractos se sonicaron y se centrifugaron a 13.000 g durante 30 min a 4 °C. El control de carga se realizó mediante la tinción de la membrana con Ponceau-S.

4.13 Cultivo de *T. cruzi*

Los parásitos de la cepa CL-Brener (WT) se mantuvieron en cultivos en medio BHI (BHI: Infusión de cerebro y corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, KCl 0.4 g/L, Na₂HPO₄ 4 g/L, hemina 0.02 g/L, 10 % de suero fetal bovino (SFB), glucosa 0.3 g/L, estreptomycin 0.2 g/L y penicilina 200.000 U) a 28°C. Epimastigotas de 5 días de cultivo (fase exponencial) se colectaron por centrifugación a 800 g y se utilizaron para la obtención de tripomastigotas metacíclicos infectivos. Los tripomastigotas metacíclicos infectivos se obtuvieron mediante transformación química en medio

artificial de orina de triatomíneo (TAU-3AAG, 96 horas a 28°C). Los tripomastigotas metacíclicos se utilizaron para la infección a células VERO (línea celular de estirpe epitelial derivada de riñón de mono). Los tripomastigotas obtenidos de los sobrenadantes de infección fueron utilizados para las infecciones a macrófagos.

Los tripomastigotas metacíclicos obtenidos por transformación química también fueron utilizados para los experimentos de detección intraparasitaria de peroxinitrito con la sonda FL-B.

4.14 Parásitos sobreexpresantes de APx-CcP

Los epimastigotas sobreexpresantes de la APx-CcP se obtuvieron como en trabajos previos transformando epimastigotas CL-Brener con el plásmido pTEX-APX-9E10^{41,105,113}. Estos parásitos se cultivaron de la misma manera que la cepa WT pero suplementando el medio con el antibiótico de selección geneticina (G418, 250 µg/mL). Este vector pTEX-APX-9E10 contiene en el extremo 3' del gen insertado el epítotope 9E10 de la proteína humana c-myc (*tag* de 10 aminoácidos). Esta característica permite la fácil identificación y localización por citometría de flujo, Western blot e inmunocitoquímica de las enzimas expresadas utilizando un anticuerpo específico anti c-myc9E10 (Santa Cruz).

4.15 Cultivo de macrófagos

La línea celular de macrófagos murinos J774 A.1 (ATCC-TIB-67) se cultivó a 37°C y 5 % CO₂ en medio DMEM suplementado con penicilina 0.1 g/L, estreptomycin 0.1 g/L, NaHCO₃ 1.8 g/L y 10 % de SBF.

4.16 Activación de macrófagos

Los macrófagos fueron inmunoestimulados mediante la incubación con IFN-γ (800 U/mL) y LPS (16 µg/mL) durante 4 horas para la inducción de la iNOS. La activación de la NOX ocurre durante la infección⁴².

4.17 Cuantificación de especies reactivas producidas por los macrófagos

La producción H_2O_2 por cultivos de macrófagos *naive* o inmunoestimulados para la producción de $\cdot NO$ fue evaluada mediante la fluorescencia del Amplex® Red (Invitrogen). La producción de $\cdot NO$ se determinó usando la técnica colorimétrica de Griess¹⁵⁰, que detecta el NO_2^- , producto estable de oxidación del $\cdot NO$, que se acumula en los sobrenadantes del cultivo. La detección de peroxinitrito se evaluó fluorimétricamente utilizando sondas redox derivadas del ácido borónico disponibles en el laboratorio que reaccionan de forma directa con el peroxinitrito¹⁴⁸.

4.18 Exposición a peroxinitrito y detección intraparasitaria con la sonda FL-B

Los parásitos en la forma tripomastigota metacíclico (parásitos infectivos obtenidos por transformación química de los epimastigotas, ver sección 4.13) fueron pre-cargados con la sonda FL-B en concentración 50 μM en dPBS por 40 minutos.

La oxidación de la sonda intraparasitaria luego de la exposición de los parásitos (3×10^8 tripomastigotas/mL) a un bolo de peroxinitrito (25 μM) se evaluó por citometría de flujo (BD FACSCalibur).

Asimismo, se detectó la generación de peroxinitrito durante la invasión a macrófagos *naive* o inmunoestimulados (IFN- γ /LPS) para la producción de peroxinitrito. Los macrófagos fueron incubados con los parásitos WT o sobreexpresantes de APx-CcP pre-cargados con la sonda (en relación macrófago:parásito 1:10). Alternativamente a la activación de los macrófagos, se realizó un tratamiento con un dador de $\cdot NO$ (NOC-18) en concentración 0.5 mM ($\sim 0.15 \mu M \cdot NO/min$) en el momento de la infección. Las placas fueron centrifugadas por 60 segundos a 600 g y dejadas en incubación por 2 horas a 37°C con 5% CO_2 . Pasado este tiempo, las células fueron levantadas con *scraper* y la oxidación de la sonda fue evaluada por citometría de flujo (BD FACSCalibur).

4.19 Infectividad de *T. cruzi* en macrófagos de cultivo

Los tripomastigotas metacíclicos y/o los tripomastigotas de cultivo celular fueron utilizados para la infección de macrófagos *naive* o activados para la expresión de la iNOS. Las infecciones se realizaron en ausencia o presencia de ascorbato 100 μ M en el medio de cultivo. Luego de 2 horas, los parásitos no internalizados se removieron del cultivo mediante tres lavados con PBS y los macrófagos se incubaron durante 24 horas en DMEM, 10 % SBF a 37°C y 5% de CO₂. Luego los macrófagos se fijaron (PBS, formaldehído 4 % v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron y se tiñeron los núcleos con DAPI (PBS, Triton X-100 0.1 % v/v, DAPI 5 μ g/mL). El porcentaje de infección se evaluó mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse TE 200) con aumento 1000x contando la cantidad de amastigotas cada 100 macrófagos. Los resultados se expresaron relativos a la cepa WT. Se utilizaron para estas infecciones tripomastigotas derivados de cultivo de células VERO de la cepa WT y sobreexpresantes de APx-CcP.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Expresión y purificación de la enzima APx-CcP WT y W233F recombinante en *Escherichia coli*

Las proteínas APx-CcP WT y mutante W233F expresadas de forma recombinante fueron purificadas del cultivo de *Escherichia coli* por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) utilizando un *tag* de polihistidina fusionado a la proteína y una columna de afinidad de iones níquel (HiTrap 5 mL de Amersham Biosciences). Se alcanzó un rendimiento y un nivel de pureza aceptable que fue analizado por SDS PAGE al 12% en condiciones reductoras (figura 5.1). Solo las últimas fracciones de mayor pureza fueron utilizadas para los estudios.

El peso molecular esperado para la enzima incluyendo el *tag* de polihistidina (el cual no fue escindido para la realización de los experimentos) es de 35.6 kDa. Se verificó que la proteína expresada y purificada tuviese este peso molecular incluyendo un marcador de peso molecular en la corrida.

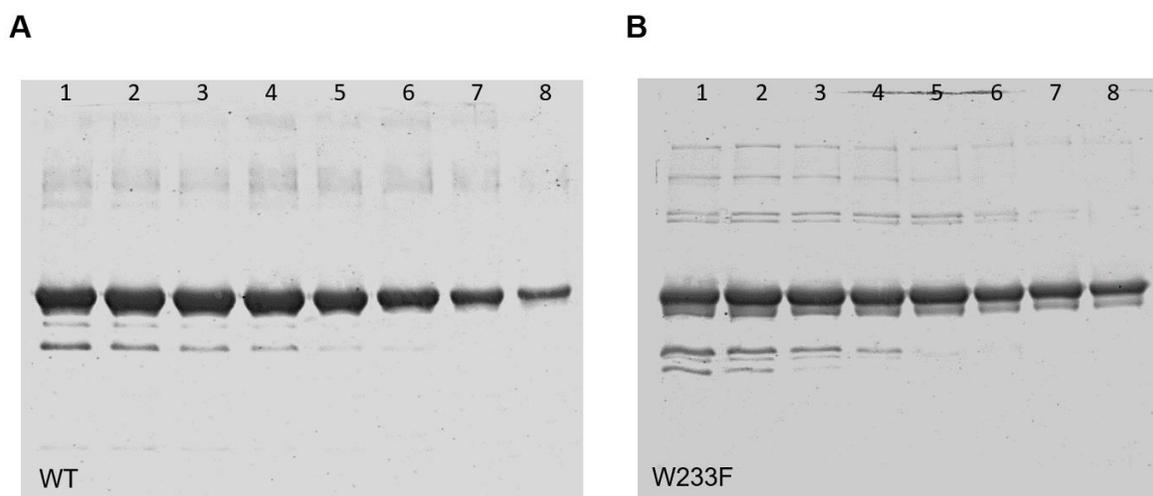


Figura 5.1. Purificación de las enzimas APx-CcP WT y mutante W233F de forma recombinante del cultivo de *Escherichia coli*. Las enzimas WT y W233F se purificaron por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) utilizando una columna de afinidad de Ni²⁺ y elución por competencia con gradiente de imidazol (10 - 500 mM). La pureza de las fracciones eluidas se evaluaron por SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras y tinción con Azul de Coomassie. En la figura se muestran las últimas fracciones que eluyeron de la columna. Se usaron las fracciones más puras (5-8) para los estudios.

Está bien establecido que las hemoproteínas presentan un espectro de absorción UV-vis característico dependiendo del ambiente del hemo en la proteína y que cambia frente a pequeños cambios electrónicos que involucran el hierro y el anillo conjugado de la porfirina. El espectro de absorción de la APx-CcP confirma que se trata de una hemoproteína (figura 5.2). La banda de Soret (γ) para la enzima WT tiene un máximo a 409 nm y para la enzima mutante W233F a 414 nm. Esta diferencia entre las enzimas WT y W233F evidencia que el reemplazo del aminoácido perturba el microambiente del hemo.

Inmediatamente luego de cada purificación se realizó un espectro de absorción UV-vis con el objetivo verificar las posiciones del máximo de absorción de la banda de Soret y como forma de monitorear posibles alteraciones en la configuración electrónica del hemo. Comparando todos los espectros registrados en el transcurso de este trabajo y los reportados en la literatura se puede esperar un error estimado en ± 1 nm en la posición del máximo de la banda de Soret. También mediante la realización de espectros de absorción UV-vis se calculó el contenido de holoenzima que está dado por la relación $A_{\text{soret}}/A_{280 \text{ nm}}$. El porcentaje de incorporación de hemo fue cercano a ~60% en todas las purificaciones, similar a lo obtenido en trabajos previos del grupo¹⁰⁷. Para los experimentos solo se consideró la concentración de holoenzima que se midió espectrofotométricamente a 409 y 414 nm para la enzima WT y W233F, respectivamente.

Observamos cierta inactivación de la enzima con el paso de los días, que disminuyó parcialmente cuando se almacenó en condiciones de bajas concentración de oxígeno mediante el uso de viales anaeróbicos y burbujeo con N_2 . Por este motivo, todos los experimentos se realizaron inmediatamente luego de la purificación, en un plazo no mayor a 7 días.

Previo a la realización de cada experimento, se verificó que se dieran los cambios espectroscópicos en el UV-vis correspondientes a la formación del compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}233^{*+}$) luego del agregado equimolar de H_2O_2 (figura 5.2). La formación del compuesto tipo I se puede identificar fácilmente dado que implica un cambio significativo en la estructura electrónica de la proteína y por lo tanto un cambio

apreciable en el espectro UV-vis. Estos cambios indicativos de la formación del compuesto tipo I en la APx-CcP son el corrimiento de la banda de Soret (γ) de 409 nm a 415 nm y la aparición de dos máximos en la banda $\alpha\beta$ del hemo que en la APx-CcP se encuentran en 539 y 560 nm.

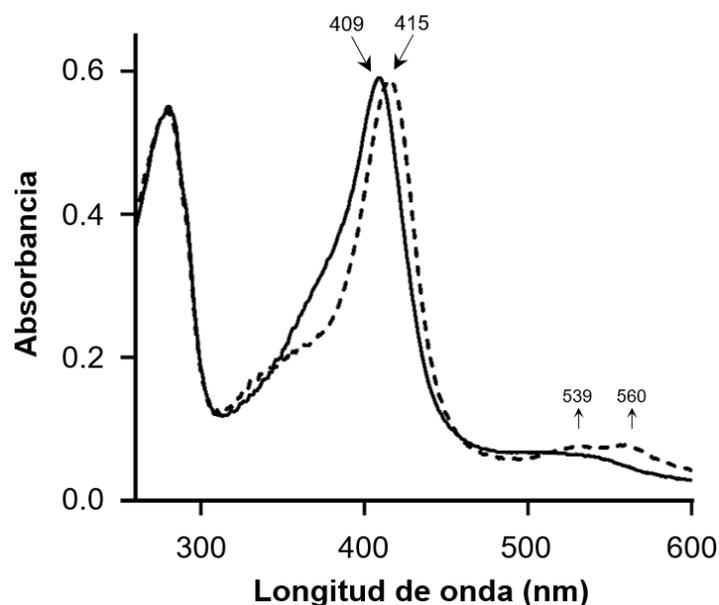


Figura 5.2. Cambios en el espectro UV-vis de la APx-CcP WT característicos de la formación del compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{*+}$). El espectro de la enzima APx-CcP WT fue registrado entre 250 y 600 nm antes (línea continua) y después del agregado equimolar de H_2O_2 (línea punteada). Se observan los cambios espectrales característicos del compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{*+}$), con el corrimiento hacia el rojo de la banda de Soret (de 409 a 415 nm) y la aparición de dos máximos en la banda $\alpha\beta$ del hemo (539 y 560 nm).

5.2 La enzima APx-CcP recombinante reacciona rápidamente con el peroxinitrito

Considerando que otras hemoperoxidasas son capaces de reaccionar con el peroxinitrito, es esperable que la APx-CcP también pueda hacerlo.

En primer lugar, observamos que la mezcla de la enzima con el peroxinitrito produjo una rápida caída de la absorbancia a 302 nm correspondiente a la forma aniónica del peroxinitrito ($\epsilon = 1700 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). De esta observación, detectamos que efectivamente se estaba dando la reacción, por lo que decidimos determinar su constante cinética de segundo orden. Seguimos la reacción por un método directo monitoreando la descomposición del peroxinitrito por la caída de absorbancia a 302 nm en el tiempo. Dada la rapidez de la reacción, fue imprescindible utilizar un

espectrofotómetro de flujo detenido (SX20, Applied Photophysics, tiempo muerto < 2 ms). Es importante aclarar que a esta longitud de onda no se tiene casi interferencia debido a cambios en la absorbancia de la proteína en la reacción.

Considerando estudios previos donde se establece que mediante este diseño experimental es difícil usar condiciones de pseudo-primer orden¹⁴⁷, optamos por determinar la constante cinética por el método de las velocidades iniciales. Una función lineal se ajustó a las medidas obtenidas en los primeros 10 milisegundos de reacción y las velocidades iniciales se obtuvieron al dividir la pendiente obtenida del ajuste por el coeficiente de extinción molar del peroxinitrito a 302 nm multiplicado por 1.25. Este último factor considera que a pH 7.4, un 20% del peroxinitrito se encuentra en la forma neutra ácido peroxinitroso (ONOOH) la cual no absorbe a 302 nm. A partir de la ecuación [9] que se muestra en el apartado de Materiales y Métodos sección 4.4 se obtuvo una constante cinética de segundo orden de reacción (k_2) de $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C (Figura 5.3 paneles A y B).

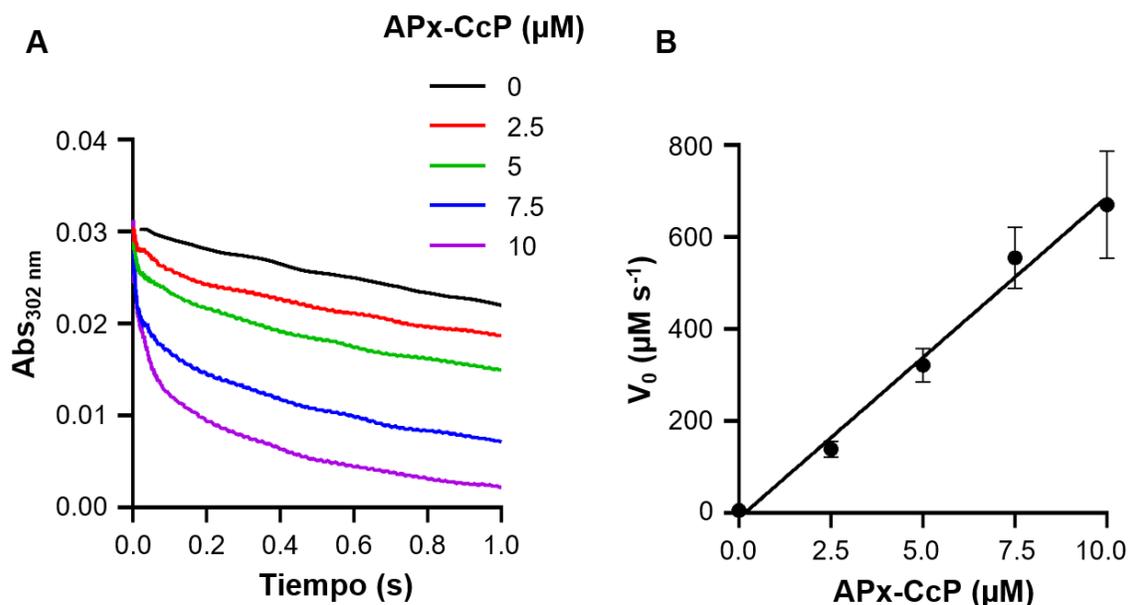


Figura 5.3. Determinación de la constante de la reacción de la APx-CcP con el peroxinitrito por el método de las velocidades iniciales a pH 7.4 y 25 °C. Dada la rapidez de la reacción, la misma se siguió utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped flow). **A.** Cursos temporales donde se sigue la descomposición del peroxinitrito (15 μM) por la disminución de la absorbancia a 302 nm en presencia de concentraciones crecientes de enzima APx-CcP (0-10 μM). Una función lineal se ajustó a los primeros 10 milisegundos de reacción obteniéndose de las pendientes los valores de velocidad inicial. **B.** La velocidad inicial de la descomposición del peroxinitrito varía linealmente con la concentración inicial de APx-CcP. Se realizó un ajuste lineal y de la pendiente se obtuvo una constante cinética de segundo orden de $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C.

Este experimento tuvo el inconveniente de que bajo estas condiciones experimentales fue difícil asegurarnos de estar en condiciones de velocidad inicial. Se observó que los cursos temporales perdieron rápidamente la linealidad en los primeros milisegundos de reacción, por lo que la mayor parte de la reacción ocurrió en el tiempo muerto del equipo. Debido a esto, se hizo imprescindible verificar el valor de la constante por un método alternativo.

De forma complementaria, determinamos la constante de reacción por un ensayo cinético de competencia utilizando el compuesto boronado ácido borónico de cumarina (CBA). El CBA reacciona directamente con el peroxinitrito con una constante cinética de $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4 y 25 °C) formando el compuesto oxidado fluorescente 7-hidroxycumarina (COH) que se puede medir¹⁵¹. Fue posible utilizar este ensayo de competencia para determinar la constante dado que, según nuestra estimación de la constante de reacción por el método de las velocidades iniciales presentada anteriormente, la enzima y el CBA reaccionan con el peroxinitrito con constantes cinéticas comparables, encontrándose dentro del mismo orden de magnitud.

Tal como se detalló en el apartado de Materiales y Métodos en la sección 4.5, la cuantificación del producto COH en presencia de enzima nos permitió determinar la constante cinética de la reacción. Esta cuantificación del producto COH se realizó por HPLC con detección fluorimétrica como se reportó previamente¹⁴⁸.

En la figura 5.4 se puede apreciar como la enzima compite por la reacción con el peroxinitrito disminuyendo la formación de COH. Aplicando la ecuación [10] que se muestra en la sección 4.5 del apartado de Materiales y Métodos, se obtuvieron las constantes cinéticas de reacción que se muestran en la tabla 2. Calculando el promedio de todas las determinaciones que se muestran en la tabla 2 se obtuvo una constante cinética de $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C, valor muy similar al obtenido mediante el método directo.

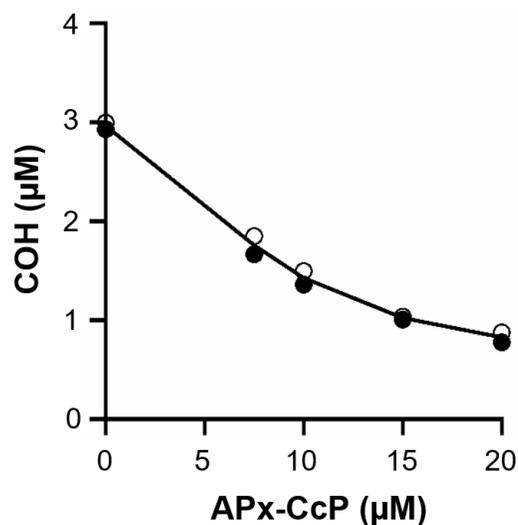


Figura 5.4. Ensayo de cinética de competencia con CBA a pH 7.4 y 25 °C. Se grafica la concentración del producto fluorescente COH en función de distintas concentraciones iniciales de APx-CcP. Por este método de competencia se obtuvo una constante cinética de segundo orden de $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C. La cuantificación de COH se realizó por HPLC utilizando estándares verdaderos como se reportó previamente¹⁴⁸. Se muestran las medidas obtenidas por duplicado.

Tabla 2. Determinación de la constante cinética de la reacción de la APx-CcP con el peroxinitrito por un ensayo de cinética de competencia con CBA a pH 7.4 y 25 °C. Las medidas se realizaron por duplicado.

[APx-CcP] (μM)	$k_2 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	
7.5	3.5×10^6	2.9×10^6
10	3.4×10^6	2.9×10^6
15	3.2×10^6	3.1×10^6
20	3.2×10^6	2.7×10^6

En suma, mediante los dos métodos se calculó una constante cinética para la reacción de la APx-CcP recombinante con peroxinitrito de $3\text{-}4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C. A pesar de haber realizado varios intentos, a 37°C no fue posible determinar la constante cinética porque la reacción fue muy rápida.

De acuerdo a nuestras determinaciones, la APx-CcP reacciona rápidamente con el peroxinitrito, encontrándose entre las hemoproteínas que reaccionan más rápido

con este oxidante. La constante de velocidad es comparable a las obtenidas para las hemoperoxidasas que descomponen más rápido al peroxinitrito, estas son la HRP ($k = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C), la MPO ($6.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.2 y 25 °C) y la CPO ($k = 2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 5.1 y 23°C).

En estos experimentos estudiamos la reacción en ausencia del sustrato reductor, por lo que bajo estas condiciones no es posible que se dé un ciclo catalítico completo. Es interesante considerar si la enzima es capaz de descomponer al peroxinitrito de forma catalítica, lo que determinará su capacidad de detoxificación del oxidante. Más adelante en la sección 5.4 evaluaremos si la reacción de la enzima con el oxidante se da de forma catalítica estudiando la reacción generando un flujo de peroxinitrito y en presencia de sustrato reductor.

El hecho de que la enzima recombinante reaccione rápido con el oxidante, la convierte en un potencial blanco del peroxinitrito en el parásito. Sin embargo, establecer la relevancia de la enzima para la detoxificación de este oxidante *in vivo* es un tema mucho más complejo, va a depender de otros factores además del cinético, como la concentración de la enzima y de otros blancos del peroxinitrito en los distintos compartimentos del parásito. También es interesante considerar las concentraciones de los sustratos reductores en los distintos compartimentos, que también determinará la capacidad de detoxificación de la enzima. Estos aspectos se discutirán en mayor profundidad en las secciones que siguen.

5.3 Detección de la formación del intermediario enzimático compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{233^{*+}}$) y tipo I “alternativo” ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Cys}^{222^{*}}$)

Cuando se trabaja con hemoperoxidasas no es posible generalizar acerca de los intermediarios enzimáticos que se forman en su ciclo catalítico, por lo que deben ser estudiadas caso a caso. Cuando estas enzimas reaccionan con el sustrato pueden formar distintos intermediarios enzimáticos los cuales difieren en su estado de oxidación. Estos posibles intermediarios son el compuesto I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{P}^{*+}$), compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{233^{*+}}$) y compuesto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), que como se explicó en el apartado de Introducción sección 1.6.3.1, tradicionalmente han sido distinguidos por diferencias en sus propiedades espectroscópicas.

En particular las reacciones de las hemoproteínas con el peroxinitrito son diversas y difícilmente predecibles. Algunas reaccionan por un mecanismo de dos electrones formando el intermediario enzimático compuesto I y NO_2^- (como la HRP, la catalasa y la prostaglandina endoperoxidasa sintasa-1). Otras reaccionan por un mecanismo de un electrón, en este caso formando compuesto II y $^*\text{NO}_2$ (como la MPO, la LPO y la CPO). Por último algunas hemoproteínas catalizan la isomerización del peroxinitrito a NO_3^- (es el caso de la oxi- y meta-hemoglobina y metamioglobina).

Como se detalló en el apartado de Introducción sección 1.6.3.2, en la APx-CcP se han planteado dos vías alternativas de transferencia de electrones: del residuo triptofano 233 al hemo (formación de compuesto tipo I, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{233^{*+}}$) o del residuo cisteína 222 al hemo (formación del compuesto tipo I “alternativo”, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Cys}^{222^*}$). Cálculos teóricos sugieren que las dos vías de transferencia de electrones Trp-hemo y Cys-hemo serían igualmente probables de ocurrir en la enzima WT y que en el mutante W233F la ruta de transferencia electrónica Cys-hemo sería la dominante¹⁵². La formación de este compuesto tipo I “alternativo” con la formación del radical tiilo en la cisteína 222 fue evidenciada previamente en trabajos del grupo¹⁰⁷.

Una forma de identificar los intermediarios enzimáticos formados en el ciclo catalítico de estas enzimas es mediante análisis de los cambios en el espectro de absorción. La formación de los distintos intermediarios se puede identificar por cambios en la posición e intensidad de las bandas características del grupo hemo en la proteína. Para realizar este análisis, la enzima APx-CcP WT fue expuesta a peroxinitrito en relación 1.5:1 (peroxinitrito:APx-CcP) y se registraron los espectros de absorción UV-vis que se muestran en la figura 5.5 panel A. Los cambios espectroscópicos que ocurren son similares a los reportados para la reacción con H_2O_2 (ver figura 5.2). Luego del agregado de peroxinitrito se observó un corrimiento hacia el rojo de la banda de Soret (de 408 a 415 nm) y la aparición de dos máximos en la banda $\alpha\beta$ del hemo (529 y 555 nm). En principio estos cambios espectroscópicos podrían corresponder al intermediario globalmente oxidado por dos equivalentes compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}^{233^{*+}}$) o al intermediario enzimático oxidado por un equivalente compuesto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), cuyos espectros presentan la misma forma¹²⁰.

De modo de obtener información complementaria sobre la naturaleza del intermediario enzimático detectado luego de la exposición al peroxinitrito, se realizaron experimentos de inmunospin trapping con DMPO. Previamente en el laboratorio se estudió que mediante este método se identifica el intermediario enzimático compuesto tipo I “alternativo” con el radical tílo en el residuo de cisteína 222 ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Cys}^{222\bullet}$). Se llegó a esta conclusión porque la señal correspondiente al aducto DMPO-nitrona-proteína desaparece frente al tratamiento con el compuesto alquilante de tioles N-etil-maleimida (NEM) y se intensifica en el mutante de la enzima W233F (en la cual se favorece la formación del radical tílo en el residuo de cisteína 222). Además la formación del aducto con DMPO en el residuo de cisteína 222 fue verificada en trabajos previos del grupo por espectrometría de masas¹⁰⁷.

Similar a lo reportado previamente con H_2O_2 , luego de la exposición de la APx-CcP a peroxinitrito en presencia de DMPO se detectó la formación del compuesto tipo I “alternativo” de forma dosis dependiente (figura 5.5 panel B superior).

Tal como ya estaba descrito¹⁰⁷, frente al tratamiento con NEM la señal correspondiente al aducto DMPO-nitrona-proteína ya no se detectó (figura 5.5 panel B inferior). Por otro lado, si en lugar de iniciar la reacción de la APx-CcP con peroxinitrito en presencia de DMPO se agregó el atrapador de spin 10 segundos después de iniciada la reacción, ya no fue posible detectar la formación del radical tílo (figura 5.5 panel B inferior, carriles 6-10). Este resultado sugiere transferencias electrónicas internas en la proteína hacia otros residuos aminoacídicos, posiblemente residuos de tirosina y triptofano.

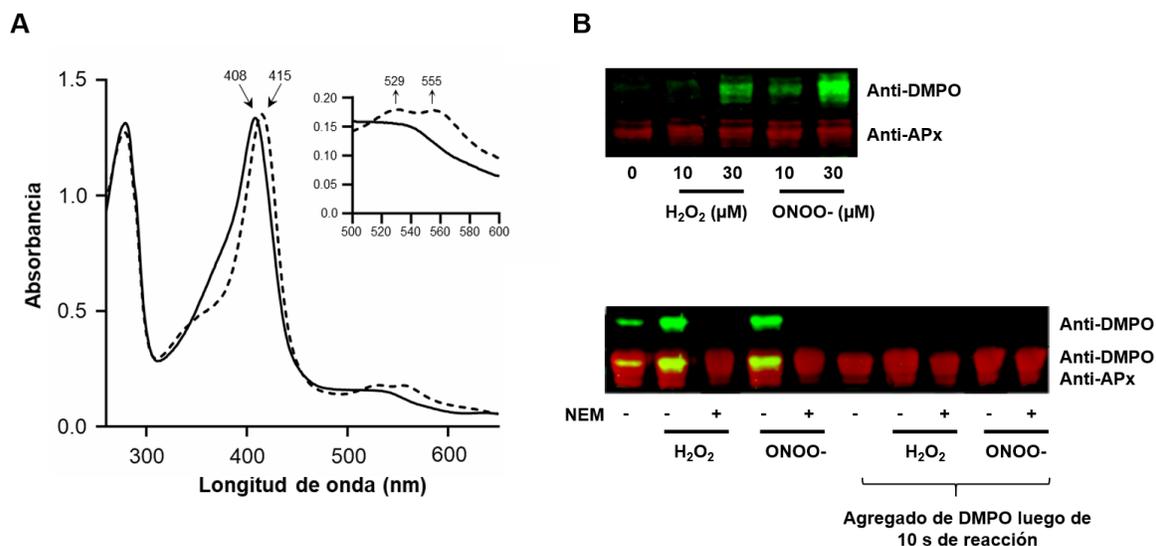


Figura 5.5. Detección de la formación del intermediario enzimático oxidado globalmente por dos electrones compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}233^{++}$) y tipo I "alternativo" ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Cys}222'$). **A.** Espectro de absorción UV-vis registrado entre 250 y 650 nm de la enzima APx-CcP antes (línea continua) y después del agregado de peroxinitrito (línea punteada). El peroxinitrito fue agregado en relación 1.5:1 (peroxinitrito:APx-CcP). Se observan cambios espectrales que podrían ser característicos del compuesto tipo I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Trp}233^{++}$) o compuesto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). **B.** Detección del compuesto tipo I "alternativo" ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{Cys}222'$) por experimentos de inmunospin trapping con DMPO. Figura superior: la APx-CcP (10 μM) fue expuesta a H_2O_2 o peroxinitrito (10 o 30 μM) en presencia de DMPO (100 mM). Figura inferior: en carriles 1-5 se mezcló la APx-CcP (10 μM) con oxidante (H_2O_2 o peroxinitrito, 30 μM) en presencia de DMPO (100 mM). En los carriles 5-10 primero se mezcló la APx-CcP (10 μM) con el oxidante (30 μM) y luego de 10 segundos de iniciada la reacción se agregó el DMPO (100 mM). Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de NEM (50 mM) tal como se indica en la figura.

En suma, los resultados que se muestran en la figura 5.5 sugieren que la APx-CcP reacciona con el peroxinitrito por un mecanismo de dos electrones similar al reportado previamente con H_2O_2 . El ciclo catalítico transcurre a través de la formación de un intermediario enzimático compuesto tipo I, con el hierro del hemo en la forma de ferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) y la generación de un radical aminoacídico en el sitio activo ($\text{Trp}233^{++}$ y $\text{Cys}222'$). Si la reacción con el peroxinitrito se da por un mecanismo de dos electrones, entonces es esperable que el producto de la reacción sea el NO_2^- , el producto reducido por dos electrones del peroxinitrito.

Finalmente verificamos que el compuesto tipo I formado luego de la exposición de la enzima a H_2O_2 o a peroxinitrito se mantiene estable en el tiempo (figura 5.6). El decaimiento endógeno del intermediario fue monitoreado por la disminución de la

absorbancia a 550 nm presentando una vida media estimada en 6 minutos (figura 5.6 panel B).

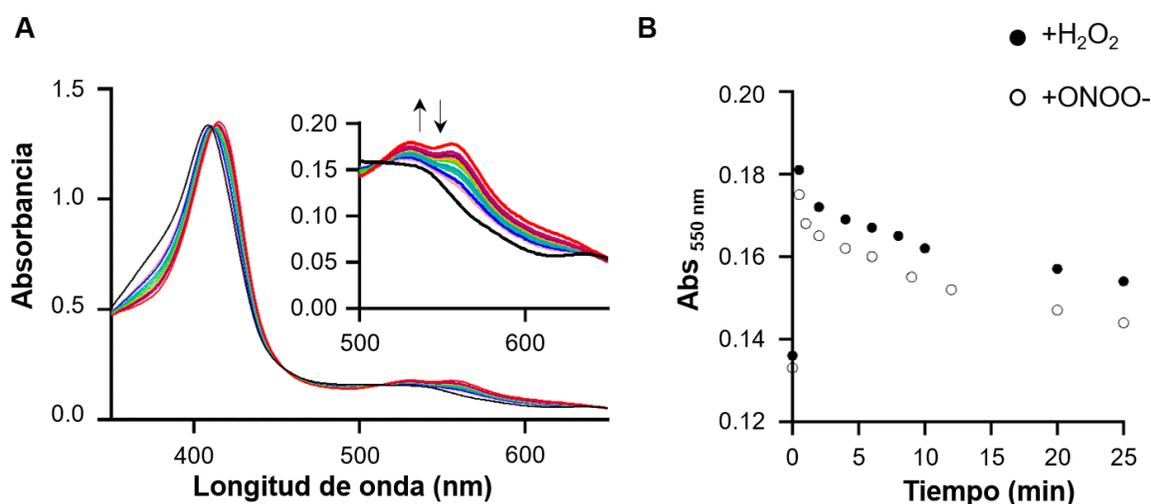


Figura 5.6. Estudio de la estabilidad del compuesto tipo I formado luego del agregado equimolar de oxidante a temperatura ambiente. A. Espectros de absorción UV-vis (350-650 nm) resueltos en el tiempo luego del agregado de peroxinitrito en relación 1:5:1 (peroxinitrito:APx-CcP). Los espectros se registraron cada 2 minutos por 25 minutos. **B.** La enzima se mezcló con cantidad equimolar de H₂O₂ o peroxinitrito y se registraron los valores de absorbancia a 550 nm en función del tiempo. El intermediario formado luego de la exposición a los dos oxidantes presenta una vida media estimada en 6 minutos.

Está descrito que el compuesto I decae de forma espontánea a compuesto II en ausencia de sustrato reductor en todas las hemoperoxidasas¹²⁰. Además se han identificado diferencias en la estabilidad del compuesto I dependiendo si se forma en la reacción con H₂O₂ o con peroxinitrito¹²³.

En el caso de la APx-CcP el compuesto tipo I se mantiene estable por minutos a temperatura ambiente, ya sea que se forme con H₂O₂ o con peroxinitrito. Algo similar se ha reportado para las hemoperoxidasas CcP (Fe^{IV}=O, Trp191⁺⁺) y LmP (Fe^{IV}=O, Trp208⁺⁺). En estas enzimas también se evidenció que la estabilidad del compuesto tipo I es alta, por ejemplo en el caso de la LmP, solo se pierde 20% de la señal luego de 30 minutos a temperatura ambiente¹⁵³. Por otro lado, también existen reportes de que en otras hemoperoxidasas, por ejemplo en la APX, el compuesto I es menos estable (con vida media estimada ≤ 1 min). Los factores que determinan la estabilidad de este intermediario están lejos de ser entendidos. La fuente de electrones de esta reducción no es clara en la mayoría de los casos, pero

se ha propuesto que probablemente sean uno o más residuos aromáticos ubicados en las proximidades del hemo (tirosina y triptofano).

5.4 La APx-CcP detoxifica catalíticamente el peroxinitrito usando ascorbato como sustrato reductor

Hasta el momento estudiamos la reacción de la enzima con el peroxinitrito en ausencia de sustrato reductor. En esta sección se evaluará si el peroxinitrito oxida a la enzima a una forma que puede ser re-reducida por su sustrato natural ascorbato. Dado que el peroxinitrito es una especie inestable a pH fisiológico que se descompone por homólisis, para el estudio de la catálisis fue imprescindible la generación de un flujo de peroxinitrito en lugar de agregarlo en bolo.

Para la evaluación de la capacidad catalítica de la enzima, se decidió realizar experimentos de competencia con la sonda FL-B, dado que reacciona de forma directa y rápida con el peroxinitrito y para nuestra conveniencia la reacción puede ser seguida fluorimétricamente. La sonda FL-B reacciona con el oxidante formando el producto fluorescente fluoresceína con una constante cinética de segundo orden de $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C¹⁵¹. Además presenta la ventaja frente al CBA de que es una sonda de mayor sensibilidad, dado que el producto fluoresceína presenta un rendimiento cuántico más alto que la cumarina.

En el ensayo de competencia, la enzima APx-CcP va a competir con la FL-B por la reacción con el peroxinitrito, por lo que en presencia de enzima esperamos menor oxidación de la sonda. Para el diseño del ensayo nos basamos en trabajos previos del grupo, donde se realizaron experimentos similares con la peroxirredoxina citosólica de *Trypanosoma brucei* pero usando dihidrorodamina (DHR) que es una peor sonda que la FL-B para la detección del peroxinitrito⁹⁸.

La idea del ensayo es generar un flujo de peroxinitrito y medir la oxidación de la sonda FL-B en el tiempo agregando distintas concentraciones de enzima APx-CcP recombinante en ausencia o presencia del sustrato reductor ascorbato. Si la descomposición del peroxinitrito se da de forma catalítica, entonces esperamos que

en presencia de enzima y del sustrato reductor se dé una disminución más marcada en la pendiente de oxidación de la sonda.

Para la correcta interpretación de estos experimentos fue necesario realizar controles apropiados.

En primer lugar, evaluamos la posible interferencia del ascorbato en el ensayo por su reacción directa con el peroxinitrito.

Más allá de reportes divergentes en la literatura sobre la velocidad de la reacción entre el ascorbato y el peroxinitrito¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, los datos más consistentes están en línea con una constante de reacción en el orden de $\sim 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C)^{154,155}.

En el experimento que se muestra en la figura 5.7, la FL-B (10 μM) se expuso a peroxinitrito adicionado en bolo (5 μM) en presencia de ascorbato (1-20 mM) o de otros blancos conocidos del peroxinitrito que ofician como control positivo de la competencia (GSH, 1-20 mM y CO_2 , 0.6 y 1.2 mM).

Considerando una constante de reacción con el peroxinitrito de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y de $\sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el GSH y el CO_2 respectivamente⁴⁰, se puede estimar que a una concentración de GSH de 10 mM y de CO_2 de 1.2 mM el porcentaje de inhibición de la oxidación de la sonda debería aproximarse a $\sim 50\%$. El comportamiento observado en el gráfico 5.7 no se aleja demasiado de lo esperado, si bien la inhibición con CO_2 parece ser un poco mayor en comparación con nuestra estimación teórica. Para el caso del ascorbato, éste también fue capaz de inhibir la formación de fluoresceína. Observando el gráfico se puede estimar que la constante de reacción del ascorbato con el peroxinitrito sería aproximadamente el doble que la constante de reacción del GSH con el peroxinitrito, por lo que se encontraría en el orden de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Es importante considerar que la competencia está sobreestimada en este ensayo. Los tres compuestos ascorbato, GSH y CO_2 que compiten con la FL-B se encuentran en gran exceso en comparación con el peroxinitrito, por lo que su concentración se mantiene prácticamente constante en el tiempo. Sin embargo, en el caso de la FL-B al encontrarse a una concentración mucho menor (10 μM), se va

a ir consumiéndose en la reacción con el peroxinitrito, por lo que a medida que transcurre el tiempo de reacción la sonda va a competir en menor medida.

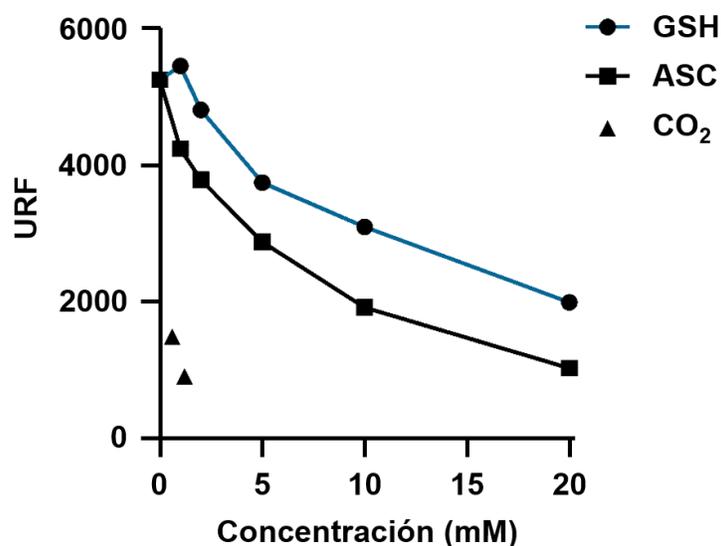


Figura 5. 7. El ascorbato interfiere en la oxidación de la sonda FL-B por el peroxinitrito. Detección del producto oxidado fluorescente fluoresceína, que se forma en la reacción de la sonda con el peroxinitrito en presencia de distintos compuestos competidores. Se realizan las medidas en presencia de distintas concentraciones de ascorbato (1, 2, 5, 10 y 20 mM) o en presencia de blancos conocidos que reaccionan directamente con el peroxinitrito: GSH (1, 2, 5, 10 y 20 mM) y CO₂ (0.6 y 1.2 mM). Se realizaron medidas puntuales de fluorescencia en un lector de placas (Varioskan, Thermo, $\lambda_{exc} = 492$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm). Las medidas se realizaron en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4 y a 25 °C.

En suma, a partir de este control podemos concluir que el ascorbato interfiere en las concentraciones ensayadas (iguales o mayores a 1 mM). Para minimizar esta interferencia en los ensayos de competencia que siguen se decidió usar una concentración de ascorbato mucho menor (200 μ M).

Posteriormente realizamos otro control donde verificamos que la enzima APx-CcP no reacciona directamente con la FL-B. Este resultado era esperable dado que contamos con el antecedente de que el compuesto I de la HRP ($Fe^{IV}=O, P^{*+}$) tampoco reacciona directamente con la sonda. Lo que si observamos fue que el agregado de enzima genera una disminución de los valores iniciales de intensidad de emisión de fluorescencia que se podría explicar por un fenómeno de *quenching*. Esta disminución de la intensidad de fluorescencia inicial que genera el agregado de enzima fue corregida en los cursos temporales que se muestran en la figura 5.9

con la finalidad de poder comparar mejor las curvas obtenidas en las distintas condiciones.

Como ya se mencionó, para la realización de este experimento fue imprescindible generar un flujo de peroxinitrito, que fue generado con SIN-1 (0.5 mM). El SIN-1 se descompone a pH fisiológico y en condiciones aeróbicas generando flujos similares de $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot NO$, funcionando así como un dador de peroxinitrito.

Para el cálculo del flujo de peroxinitrito dependiente de SIN-1 se realizó una curva de calibración con FL-B (100 μM) y distintas concentraciones conocidas de peroxinitrito (0-10 μM) adicionado en bolo (figura 5.8 panel A). De este gráfico URF vs. $[ONOO^-]$ μM se obtuvo una pendiente de 427 URF/ μM . Usando estas concentraciones es esperable que prácticamente todo el peroxinitrito reaccione con la sonda. De forma simultánea se registró el curso temporal de la oxidación de la FL-B (100 μM) por el peroxinitrito dependiente de SIN-1 (0.5 mM), se realizó una regresión lineal y se obtuvo una pendiente de 3.4 URF/s (figura 5.8 panel B). A partir del cociente de la ecuación [11] fuimos capaces de estimar un flujo de peroxinitrito dependiente de SIN-1 de $\sim 0.5 \mu M/min$. Todas las medidas se realizaron en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4 y a temperatura ambiente.

$$\frac{\text{pendiente (URF/s)}}{\text{pendiente (URF}/\mu\text{M})} \times 60 = \mu\text{M (ONOO}^{\cdot-})/\text{min} \quad [11]$$

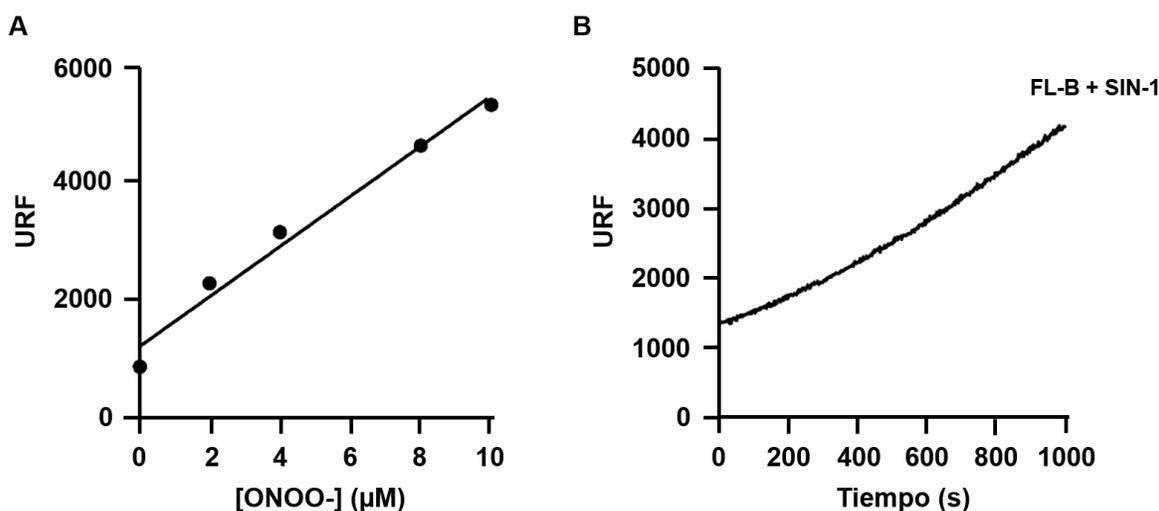


Figura 5.8. Estimación del flujo de peroxinitrito dependiente de SIN-1 (0.5 mM). A. Curva de calibración URF vs. [Peroxinitrito] (μM). La curva se construyó mezclando la sonda FL-B (100 μM) con distintas

concentraciones de peroxinitrito (0-10 μM). **B.** Curso temporal de oxidación de la FL-B (100 μM) por el peroxinitrito derivado del compuesto SIN-1 (0.5 mM). Las medidas puntuales del panel A y el curso temporal del panel B se registraron en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan, Thermo, $\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$). Las medidas se realizaron en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4 y a 25 °C.

Finalmente realizamos ensayos que nos permitieran evaluar si la enzima es capaz de descomponer al peroxinitrito de forma catalítica usando el ascorbato como sustrato reductor.

Para ello, se creó un flujo de peroxinitrito con SIN-1 ($\sim 0.5 \mu\text{M}/\text{min}$, 25 °C) y se siguió la oxidación de la sonda FL-B (10 μM) en el tiempo. En la figura 5.9 panel A se muestran los cursos temporales de oxidación de la sonda. Se puede observar que solo con el agregado de ascorbato (200 μM) se detecta una pendiente menos pronunciada en los cursos temporales de oxidación de la sonda. Este resultado es coherente con el mostrado previamente en la figura 5.7, donde observamos que el ascorbato fue capaz de inhibir la oxidación de la sonda.

Luego repetimos el experimento en presencia de concentraciones crecientes de enzima (0.2, 2 y 4 μM) en ausencia o presencia de ascorbato (200 μM). Dado que el ascorbato interfiere en el ensayo, se eligió una concentración cercana al valor de K_M de la enzima para el ascorbato ($K_M = 192 \mu\text{M}^{107}$), ya que se consideró que no es conveniente agregar concentraciones más altas.

Observamos que en presencia de enzima disminuyó la pendiente del curso temporal de oxidación de la sonda (curvas de línea punteada en gráfico de la figura 5.9 panel A). Cuando a la vez agregamos el ascorbato la pendiente del curso temporal se hizo aún menor (curvas de línea continua en el gráfico de la figura 5.9, panel A). Es decir que el agregado de enzima en presencia del sustrato reductor generó una disminución más pronunciada en la pendiente de oxidación de la sonda (figura 5.9 panel B).

El hecho de que solo el agregado de enzima (en ausencia del sustrato reductor), generó una disminución en la pendiente de oxidación de la sonda se puede explicar por la reacción de la enzima en el estado basal (con el hemo en la forma de férrico) con el peroxinitrito, lo que llevaría a cierto consumo del oxidante por parte de la enzima, tal como se observó previamente en la sección 5.2.

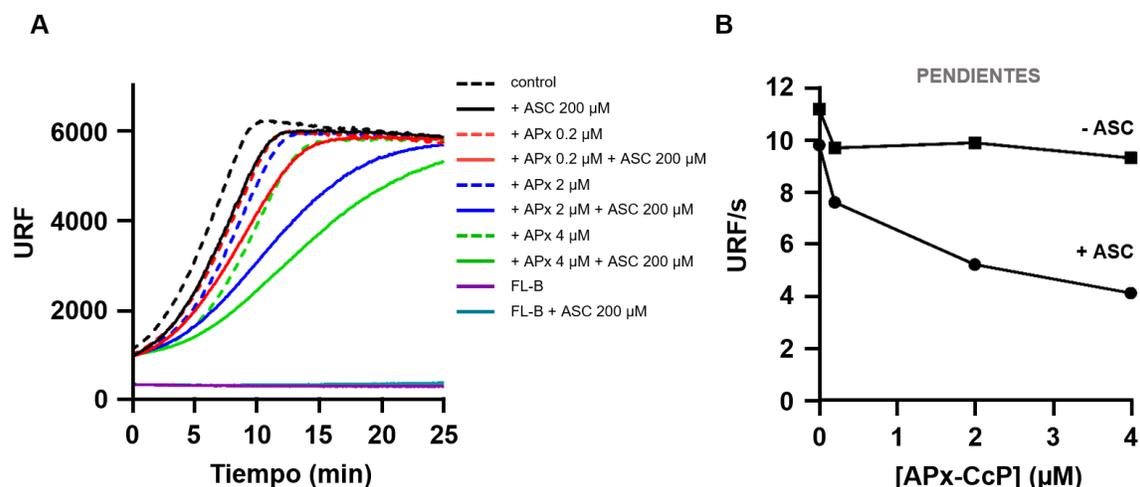


Figura 5.9. La APx-CcP detoxifica al peroxinitrito de forma catalítica usando ascorbato como sustrato reductor. A. Cursos temporales de oxidación de la sonda FL-B dependiente de SIN-1 (flujo de peroxinitrito $\sim 0.5 \mu\text{M}/\text{min}$) en ausencia o presencia de APx-CcP (0.2, 2 y $4 \mu\text{M}$) y en ausencia (línea punteada) o presencia (línea continua) de ascorbato ($200 \mu\text{M}$). **B.** Pendientes de oxidación de la sonda FL-B (URF/s) en función de la concentración de enzima APx-CcP (μM) en ausencia y presencia de ascorbato ($200 \mu\text{M}$).

Este experimento sugiere que la enzima detoxifica al peroxinitrito de forma catalítica usando el ascorbato como sustrato reductor. Observamos que el agregado del ascorbato aumentó la velocidad de descomposición del peroxinitrito por parte de la enzima, lo que vuelve al sistema más eficiente para la detoxificación del oxidante. Es importante que existan mecanismos bioquímicos que regeneren a la enzima en su estado basal con el hierro en la forma de férrico para que sea capaz de iniciar un nuevo ciclo catalítico. Además la enzima al reaccionar con el peroxinitrito en lugar de tener un rol protector podría promover otras reacciones de oxidación por un electrón (con la formación de especies radicalares) si el compuesto tipo I formado luego de la reacción no es eficientemente reducido.

5.5 Inactivación y nitración de la APx-CcP mediada por peroxinitrito

Como ya se mencionó en el apartado de Introducción sección 1.3.1.4, el peroxinitrito promueve reacciones de oxidación en biomoléculas, ya sea por reacción directa o mediada por sus especies radicalares derivadas. Estas modificaciones oxidativas pueden tener impacto en la estructura y función de estas biomoléculas.

En particular en esta sección se evaluará si la exposición de la enzima al oxidante lleva a su inactivación. En la literatura se han caracterizado numerosas enzimas que

son inactivadas por peroxinitrito¹⁵⁷, aunque no siempre esto es reflejo de lo que ocurre a nivel celular donde van a existir otras reacciones compitiendo. Para el caso de la APx-CcP, al tratarse de una hemoproteína el peroxinitrito podría llevar a la pérdida de actividad enzimática al reaccionar con el hemo y causar su degradación, así como por oxidación de residuos aminoacídicos (principalmente residuos de cisteína, tirosina, metionina y triptófano) y por formación de modificaciones post-traduccionales nitro-oxidativas (como la nitración de residuos de tirosina y/o triptofano).

En los experimentos para evaluar la inactivación mediada por el peroxinitrito, la enzima fue expuesta a concentraciones crecientes del oxidante agregado en bolo (0-2 mM) y posteriormente se realizaron medidas de actividad peroxidasa remanente utilizando Cc^{2+} o ascorbato como sustrato reductor. El agregado de un bolo de 1-2 mM de peroxinitrito, que para otros oxidantes más estables como el H_2O_2 podría considerarse una concentración excesivamente grande, para el caso del peroxinitrito representa un nivel de exposición razonable de esperar en un contexto celular⁴⁰.

Como se observa en la figura 5.10, la enzima WT mostró ser resistente a la inactivación mediada por peroxinitrito, reteniendo ~85% de actividad Cc o ascorbato peroxidasa cuando se la expuso a un exceso de 10 veces de oxidante. Este resultado refleja que hasta que no se agrega el oxidante en exceso no existe degradación del grupo hemo. Además sugiere que si se están oxidando o nitrando residuos críticos de la enzima, no estarían afectando de forma importante la catálisis.

Posteriormente se detectó una modificación post-traduccionales nitro-oxidativa que podría llevar a la inactivación de la enzima que es la formación de 3-nitro-tirosina. Los niveles de nitración de tirosinas se detectaron en las mismas muestras que fueron tratadas con oxidante a través de la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente esta modificación post-traduccionales. Como se observa en la figura 5.10 panel D, para la enzima WT los niveles de

nitración de tirosinas parecen correlacionarse con el perfil de inactivación de la enzima.

El hecho de que no se observe nitración de tirosinas hasta que no se agrega el peroxinitrito en 10 veces o más en exceso con respecto a la enzima, apoya el mecanismo catalítico previamente propuesto de reacción por dos electrones con el oxidante.

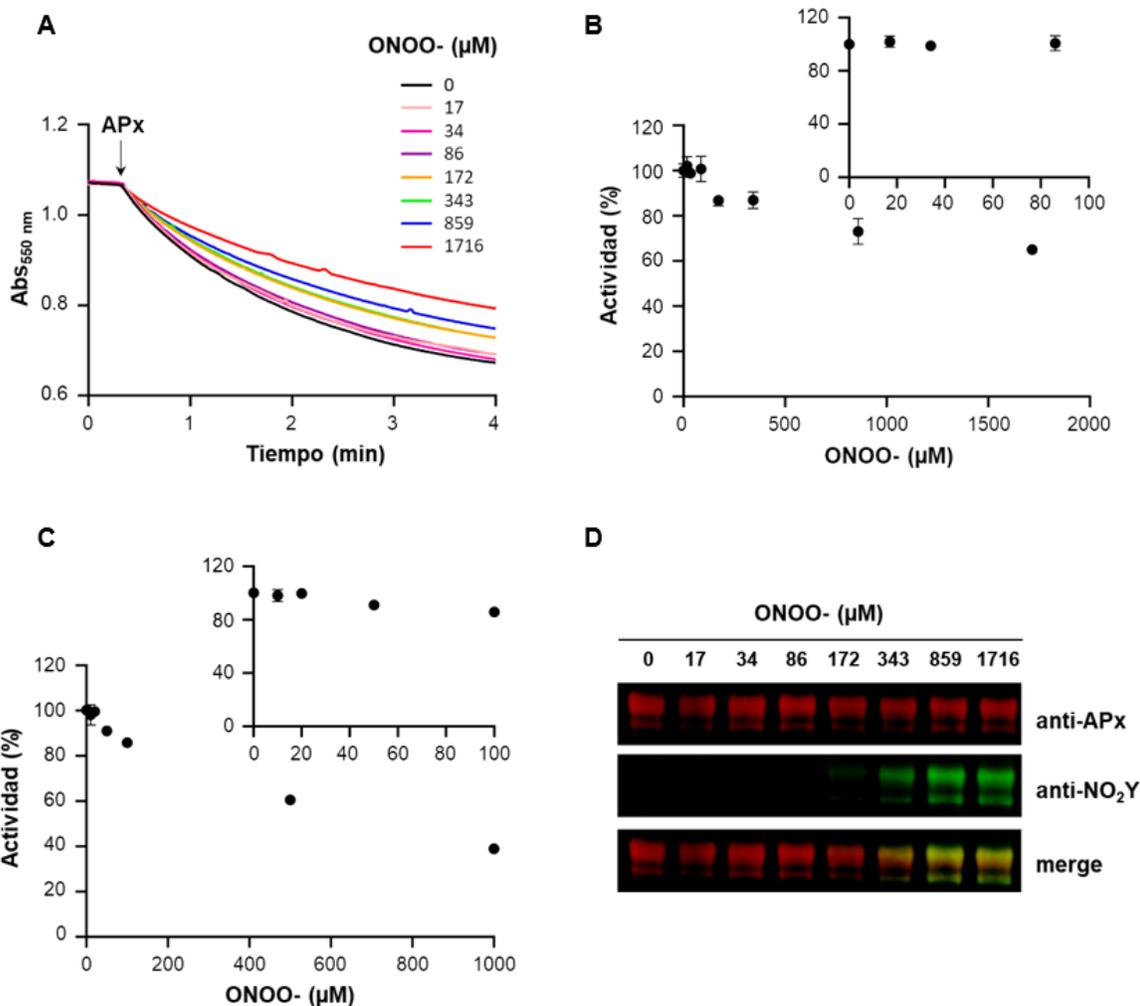


Figura 5.10. Inactivación y nitración de la APx-CcP WT recombinante mediada por peroxinitrito. La enzima APx-CcP (15 μM) fue tratada con bolos de peroxinitrito (0-2000 μM) y luego se evaluó la actividad enzimática remanente y los niveles de nitración de tirosinas. **A y B.** Actividad remanente Cc peroxidasa luego de la exposición a bolos del oxidante. La actividad se midió siguiendo la oxidación del ferrocitocromo c (Cc²⁺) a 550 nm. **C.** Actividad remanente ascorbato peroxidasa luego de la exposición a bolos del oxidante. La actividad se midió siguiendo la oxidación del ascorbato a 290 nm. **D.** Los niveles de nitración de tirosinas fueron detectados por Western blot utilizando anticuerpos primarios anti-3-nitro-tirosina.

Para la enzima mutante W233F, luego de la exposición a bolos de peroxinitrito no fue posible medir la actividad remanente Cc peroxidasa, solo fue posible medir la actividad remanente dependiente de ascorbato. Esto es así porque el residuo Trp233 es esencial para la actividad Cc peroxidasa, por lo que su reemplazo por fenilalanina en la mutante lleva a una pérdida completa de actividad con este sustrato reductor. La actividad ascorbato peroxidasa en la enzima W233F se mantiene, aunque es aproximadamente 10 veces menor en comparación con la enzima WT.

Como se puede observar en la figura 5.11 panel A, en la enzima mutante W233F se obtuvo un perfil de inactivación similar al obtenido para la enzima WT, la enzima mutante también mostró ser resistente a la inactivación mediada por peroxinitrito. La enzima retuvo ~80% de actividad luego de la exposición a peroxinitrito en 10 o 50 veces en exceso. Este resultado sugiere que la exposición al peroxinitrito agregado en bolo no afecta en gran medida la integridad del hemo y nuevamente, si existe oxidación y/o nitración de residuos críticos, no parecerían estar afectando de forma importante la actividad enzimática.

Cuando se midieron los niveles de 3-nitro-tirosina en la enzima mutante, se detectó nitración de tirosinas a concentraciones menores de peroxinitrito en comparación con la enzima WT. Aunque los resultados de Western blot para la enzima WT y W233F no son directamente comparables porque se realizaron en experimentos separados y las condiciones no fueron exactamente iguales, se sugiere que la enzima mutante presenta mayores niveles de nitración de tirosinas que la enzima WT frente a la exposición a bolos de igual concentración de peroxinitrito.

Posibles explicaciones a esta observación no son evidentes. En principio la mutación no genera cambios muy notorios en la superficie de exposición al solvente de los residuos de tirosina que puedan explicar las diferencias, dado que las estructuras cristalográficas de las enzimas WT y W233F resueltas recientemente se superponen prácticamente por completo. Una posible explicación podría ser que en la enzima mutante el radical tío (Cys222') sea menos estable en comparación con

la enzima WT, es decir que ocurra una mayor oxidación de residuos cercanos de tirosina y/o triptofano que posteriormente se nitrán.

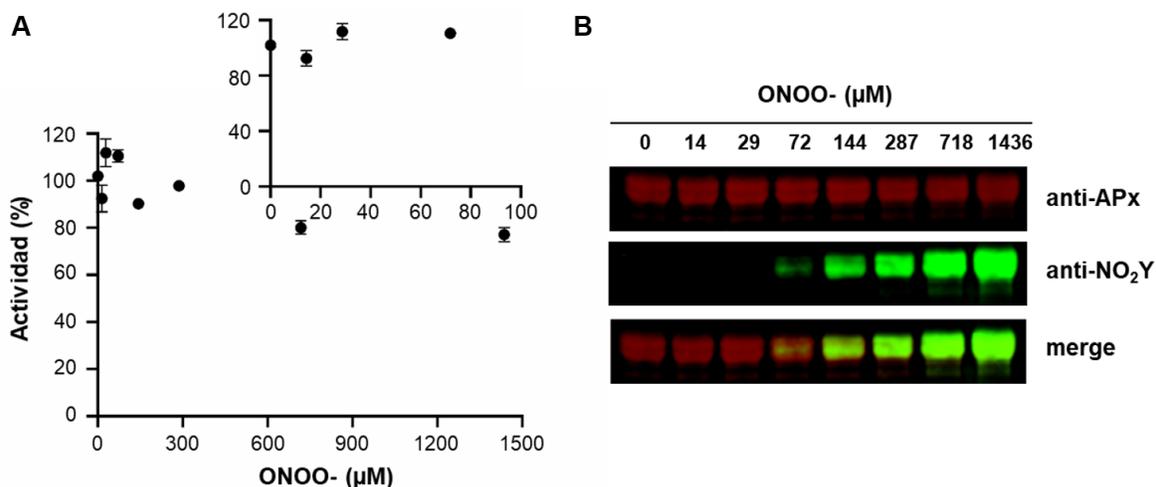


Figura 5.11. Inactivación y nitración de la APx-CcP mutante W233F recombinante mediada por peroxinitrito. La enzima APx-CcP W233F (15 μM) fue tratada con bolos de peroxinitrito (0-1500 μM) y luego se evaluó la actividad ascorbato peroxidasa remanente y los niveles de nitración de tirosinas. **A.** Actividad ascorbato peroxidasa remanente luego de la exposición a bolos del oxidante. La actividad se midió siguiendo la oxidación del ascorbato a 290 nm. **B.** Los niveles de nitración de tirosinas fueron detectados por Western blot utilizando anticuerpos primarios anti-3-nitro-tirosina.

Establecer que la pérdida de función es consecuencia de la nitración de tirosinas es una tarea difícil. En primer lugar, porque el peroxinitrito es capaz de causar muchas modificaciones oxidativas en paralelo además de la nitración de tirosinas. Como ya se mencionó, puede por ejemplo oxidar residuos de cisteína, metionina y triptofano o través de sus especies radicalares derivadas mediar incluso otras modificaciones adicionales. Por lo tanto, las modificaciones en estos aminoácidos deberían también ser consideradas, para poder evaluar el efecto de cada modificación en la función de la proteína y confirmar así que la pérdida de actividad se debe de hecho a la nitración de tirosinas.

Para comprobar la hipótesis de que la pérdida de función se debe a la nitración de tirosinas es necesario identificar residuos de tirosina que son preferencialmente nitrados y responsables de la inactivación. De acuerdo a la secuencia subida en el repositorio UniProt, la APx-CcP presenta 12 residuos de tirosina que son potencialmente nitrables por peroxinitrito. Utilizando el servidor GetArea¹⁵⁸ fue

posible estimar que estas tirosinas tienen poca superficie expuesta al solvente, lo que probablemente dificulte la nitración por falta de acceso. Esto podría tener cierto correlato con el hecho de que no se observa nitración de proteína hasta que no se agrega el oxidante en concentración de 10 veces o más de exceso.

En la figura 5.12 que sigue se muestran 9 de estos residuos de tirosina que están resueltos en la estructura cristalográfica obtenida recientemente por el grupo de la Dra. Emma Raven¹¹⁹. La identificación de sitios preferenciales de nitración no se realizó en este trabajo. Se podría lograr en el futuro por mapeo de péptidos por espectrometría de masas, técnicas de biología estructural (cristalografía de rayos x, NMR, resonancia Raman) y mediante mutagénesis dirigida.

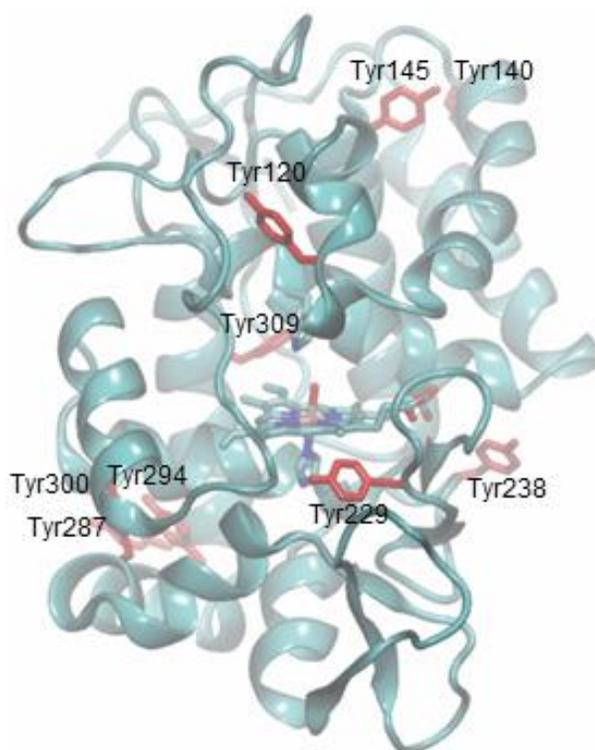


Figura 5.12. Estructura secundaria y terciaria de la APx-CcP donde se señalan 9 de sus residuos de tirosina que se encuentran resueltos en la estructura cristalográfica. Esta estructura fue resuelta recientemente por el grupo de la Dra. Emma Raven¹¹⁹.

5.6 Ensayo de actividad peroxidasa para tamizaje de posibles inhibidores

Los ensayos basados en el Amplex® Red constituyen una técnica *gold standard* para la detección y cuantificación de H₂O₂ en sistemas libres de células o cuando es liberado de éstas al medio extracelular. En el ensayo el H₂O₂ oxida a la HRP formando el compuesto I (Fe^{IV}=O, P⁺). Este compuesto I oxida al Amplex® Red para formar el producto fluorescente resorufina generando una señal intensa¹⁵⁹.

Como prueba de concepto, en la búsqueda de un posible método alternativo para medir la actividad peroxidasa de la enzima de forma rápida y sencilla, realizamos el mismo ensayo pero agregando a la APx-CcP en lugar de la HRP. Este ensayo ya ha mostrado ser exitoso para el caso de otras hemoperoxidasas¹⁶⁰.

En los cursos temporales que se muestran en la figura 5.13, se puede observar que el agregado de APx-CcP en presencia de distintas concentraciones de H₂O₂ (0-50 µM) genera una señal intensa correspondiente al producto oxidado del Amplex Red® que fue agregado en tres concentraciones (15, 30 y 60 µM).

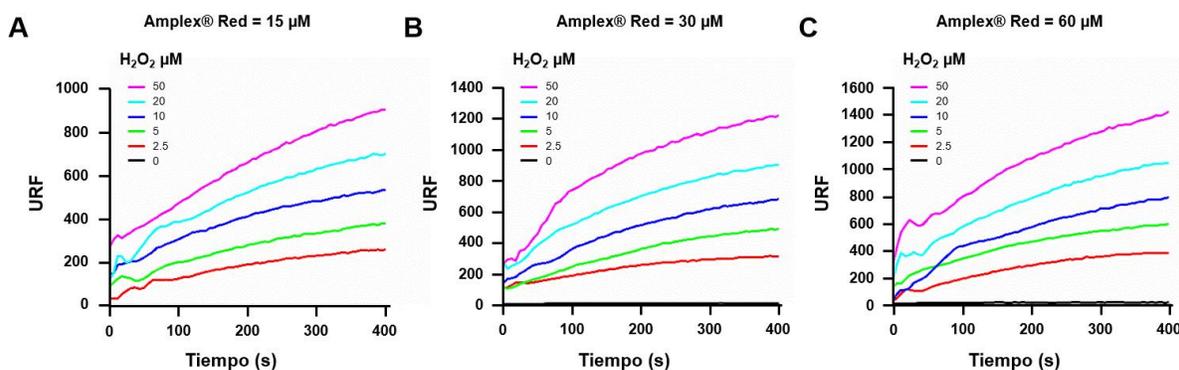


Figura 5.13. Medidas rápidas de actividad peroxidasa de la APx-CcP usando Amplex® Red. En el ensayo se mezcló APx-CcP (0.5 µM), H₂O₂ (0-50 µM) y Amplex® Red en concentración 15 µM (panel A), 30 µM (panel B) y 60 µM (panel C). Se siguió la formación del producto fluorescente resorufina en el tiempo ($\lambda_{exc} = 563$ nm, $\lambda_{em} = 587$ nm).

Los cursos temporales que se muestran en la figura 5.13 evidencian que mediante este diseño experimental no nos encontramos en condiciones de velocidad inicial. Para estudiar la dependencia de la señal con la concentración del sustrato H₂O₂, se consideró la intensidad de fluorescencia máxima alcanzada (figura 5.14).

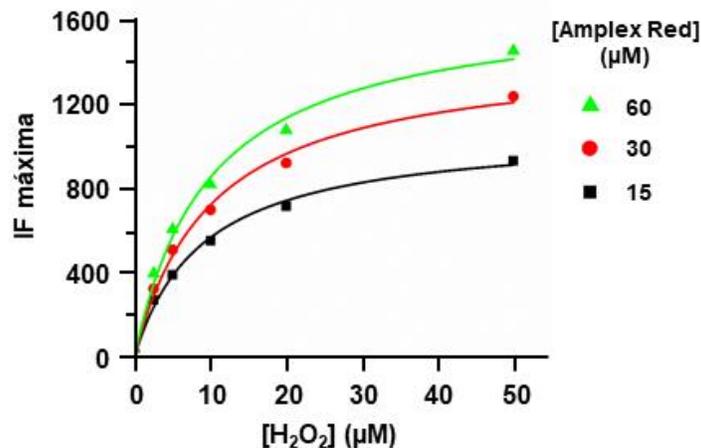


Figura 5.14. Medidas rápidas de actividad peroxidasa de la APx-CcP usando Amplex® Red. Se grafican las curvas obtenidas de intensidad de fluorescencia máxima (IF máxima) en función de la concentración de H₂O₂ (0-50 µM) para distintas concentraciones de Amplex® Red (15, 30 y 60 µM).

La aplicabilidad de este ensayo podría verse limitada en el caso de que se agregue peroxinitrito como sustrato. Si se agrega este sustrato en lugar de H₂O₂, la actividad podría verse sobreestimada dado que existen reportes a favor de que el Amplex® Red puede ser oxidado por los radicales derivados del peroxinitrito¹⁵⁹.

En futuros trabajos sería interesante realizar la caracterización completa de este método de detección de la actividad peroxidasa de la APx-CcP. Este ensayo podría tener una aplicación clara para la búsqueda de posibles inhibidores.

5.7 La sobreexpresión de la APx-CcP disminuye la detección de peroxinitrito durante la invasión a macrófagos

Una vez que determinamos que la enzima es capaz de detoxificar al peroxinitrito *in vitro* y de forma catalítica usando el ascorbato como sustrato reductor, decidimos evaluar la relevancia de esta enzima durante la infección a macrófagos. Es de interés estudiar la reacción con este oxidante *in vivo* porque se trata de un potente agente citotóxico contra *T. cruzi*³⁹. Además, dado que la enzima se localiza en la membrana plasmática en los estadios infectivos del parásito, esta hemoperoxidasa podría convertirse en una ruta predominante de descomposición del peroxinitrito que alcanza el parásito en el contexto del fagosoma.

Previamente en el laboratorio se estudió que la sobreexpresión de la enzima en el estadio epimastigota no confiere protección contra el peroxinitrito⁹⁹. Se cree que la detoxificación enzimática del peroxinitrito en este estadio se llevaría a cabo principalmente por las peroxirredoxinas en las isoformas citosólica y mitocondrial (CPx y MPx, respectivamente). Estas enzimas reaccionan rápidamente con el peroxinitrito con constantes en el orden de $\sim 10^6$ - $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ¹⁶¹.

Sin embargo, en esta tesis se propuso evaluar la importancia de la APx-CcP en la detoxificación de peroxinitrito en el estadio infectivo tripomastigota, que no ha sido estudiada aún. Trabajar con la forma tripomastigota es mucho más interesante, dado que junto con la forma amastigota son las formas infectivas que se encuentran en el hospedero vertebrado y las que son directamente responsables de la enfermedad de Chagas.

Inicialmente en el proyecto de tesis se propusieron experimentos donde tripomastigotas de la cepa WT y sobreexpresantes de APx-CcP fueran expuestos a bolos de peroxinitrito y posteriormente se midieran diferencias en la viabilidad parasitaria con ioduro de propidio o fluoresceína di acetato por citometría de flujo. Los resultados obtenidos de pruebas preliminares indican que mediante este diseño experimental es difícil alcanzar la sensibilidad suficiente para poder visualizar diferencias en la viabilidad celular de parásitos WT y sobreexpresantes de APx-CcP luego de la exposición al oxidante. Como alternativa a estos ensayos, realizamos experimentos con la sonda FL-B sintetizada en el laboratorio, la cual permite detectar la formación de peroxinitrito dentro del parásito y ha mostrado excelentes resultados como se detalla a continuación.

Esta sonda FL-B presenta varias ventajas para la detección de peroxinitrito en sistemas biológicos. Reacciona directamente con el oxidante, es cinéticamente selectiva, altamente sensible y presenta baja toxicidad (comprobada en varios modelos celulares). Además sus longitudes de onda de excitación y emisión la hacen apta para su uso en estudios de sistemas biológicos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

La sonda ha sido validada previamente en el laboratorio para la detección de peroxinitrito generado de forma endógena en varios modelos celulares. En particular, ha presentado excelentes resultados para la detección del peroxinitrito intrafagosomal en el modelo celular de infección *in vitro*, donde macrófagos murinos fueron infectados con parásitos *T. cruzi* pre-cargados con la sonda. Por microscopía de epifluorescencia se observó que la señal de la fluoresceína se detecta estrictamente localizada en aquellos parásitos que se encuentran en el fagosoma y no en los parásitos presentes en otros compartimentos celulares del macrófago o que no fueron internalizados^{151,162}.

En primer lugar, trabajamos con los parásitos en la forma tripomastigota metacíclicos (parásitos infectivos obtenidos por transformación química) de la cepa WT y sobreexpresantes de APx-CcP. Los parásitos sobreexpresantes de APx-CcP mostraron cinco veces mayor expresión de enzima en comparación con la cepa WT (cepa Brener), en concordancia con lo reportado previamente¹⁰⁵ (ver figura 5.15 panel D). Los parásitos fueron cargados con la sonda FL-B (3×10^8 tripomastigotas/mL) y expuestos a peroxinitrito (25 μ M) adicionado en bolo. La oxidación de la FL-B se evaluó mediante citometría de flujo.

En el gráfico de la figura 5.15 se observa que para las dos cepas la exposición a un bolo de peroxinitrito aumentó la formación intraparasitaria de fluoresceína. Además para la cepa sobreexpresante APx-CcP se detectó menor formación de fluoresceína en comparación con la cepa WT cuando ambas cepas fueron expuestas a iguales cantidades de oxidante. Este resultado indica que la sobreexpresión de la enzima lleva a una mayor capacidad del parásito de detoxificación de peroxinitrito adicionado de forma exógena.

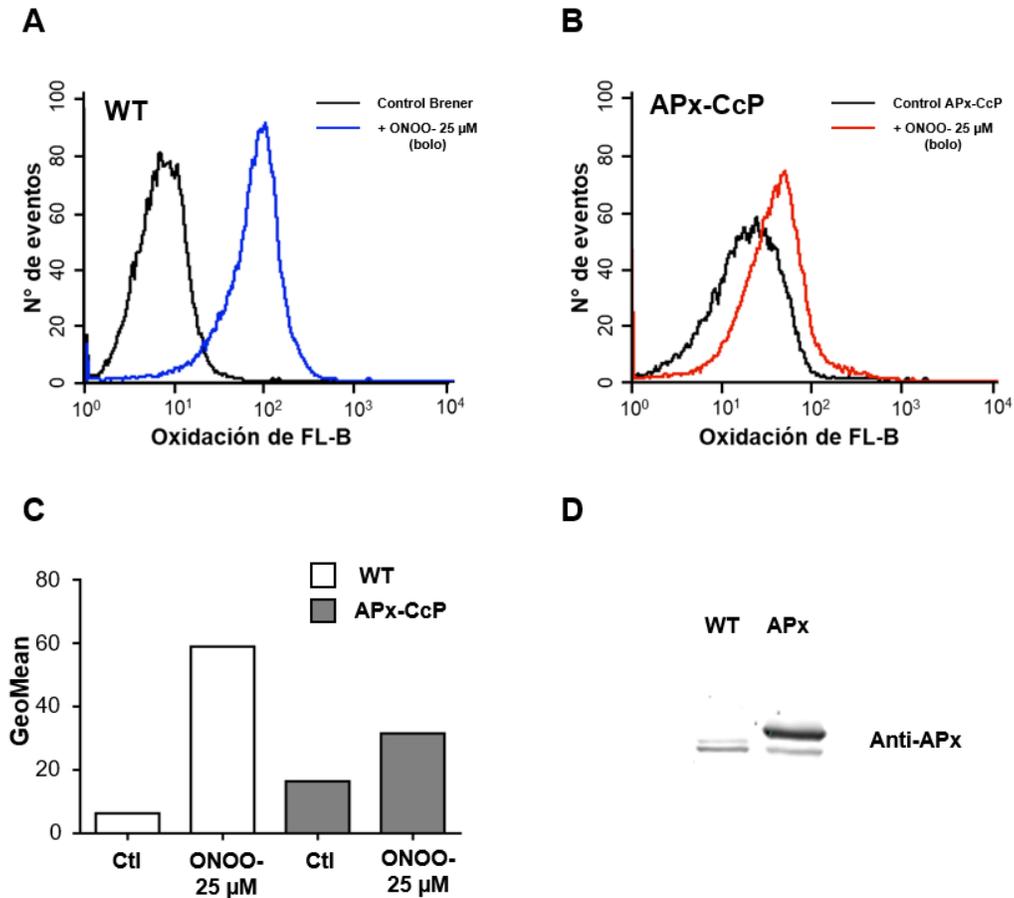


Figura 5.15. Los tripomastigotas metacíclicos sobreexpresantes de APx-CcP tienen mayor capacidad de detoxificación de peroxinitrito adicionado de forma exógena en forma de bolo. Tripomastigotas metacíclicos (3×10^8 tripos/mL) fueron pre-cargados con la sonda FL-B y luego expuestos a un bolo de peroxinitrito (25 μ M). La detección intraparasitaria de la sonda se realizó por citometría de flujo. **A.** Detección de la oxidación de la sonda FL-B en el interior de parásitos de la cepa WT (Brener, Br). **B.** Detección de la oxidación de la sonda FL-B en el interior de parásitos sobreexpresantes de APx-CcP. **C.** Se representa el valor de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia para las distintas condiciones. **D.** Control de la sobreexpresión de APx-CcP. Se muestra el resultado de Western blot de extractos de *T. cruzi* (epimastigotas) de la cepa WT (cepa Brener) y sobreexpresante APx-CcP usando un anticuerpo primario específico para la APx-CcP. En la cepa sobreexpresante se marcan dos bandas, la de menor peso molecular corresponde a la proteína endógena del parásito y la de mayor peso molecular corresponde a la enzima con el tag del epítipo de c-myc (10 aminoácidos) expresada en el vector pTEX-9E10. La imagen se obtuvo utilizando el sistema Odyssey (LI-COR). La cuantificación de las bandas se realizó en el software ImageJ. El control de carga se realizó mediante tinción de la membrana con Ponceau-S.

La validez de este modelo donde la célula es expuesta a peroxinitrito de forma exógena agregado en forma de bolo es cuestionable, dado que en los sistemas biológicos los oxidantes se producen en forma de flujo. En los siguientes

experimentos la generación de peroxinitrito se realizará de forma que se asemeje en mayor medida a su formación en sistemas biológicos.

Una vez que evidenciamos esta diferencia en la oxidación de la sonda entre los tripomastigotas metacíclicos WT y sobreexpresantes de APx-CcP quisimos evaluar diferencias en la capacidad de detoxificación de peroxinitrito durante la fagocitosis en macrófagos.

Nuevamente los parásitos fueron pre-cargados con la sonda y posteriormente se incubaron con macrófagos murinos de la línea J774 A.1 durante dos horas. Los macrófagos fueron tratados o no con un dador de $\cdot\text{NO}$ (NOC-18, flujo de $0.15 \mu\text{M}$ $\cdot\text{NO min}^{-1}$, $t_{1/2} \sim 1080$ minutos) en el momento de la infección.

Es importante recordar que la propia infección estimula el ensamblaje y activación de la enzima NOX-2 con la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (y por consiguiente también de H_2O_2) hacia el parásito que es internalizado en el fagosoma. Cuando los macrófagos además se encuentran expuestos a un flujo de $\cdot\text{NO}$, entonces también esperamos que se dé la formación de peroxinitrito, mediante la reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$. Al igual que en el experimento anterior, la detección de la formación del producto oxidado de la sonda se evaluó mediante citometría de flujo.

En la figura 5.16 se muestran los resultados obtenidos. Durante la invasión a macrófagos no estimulados sin tratamiento con NOC-18 se observó menor oxidación de la sonda en el interior de los parásitos sobreexpresantes de APx-CcP que en la cepa WT (cepa Brener). Tal como se reportó previamente¹⁰⁷, este resultado indica que la APx-CcP es capaz de reducir el H_2O_2 derivado de la NOX-2 durante la fagocitosis y de esta forma prevenir la oxidación de la sonda FL-B.

Cuando se agregó un dador de $\cdot\text{NO}$ (NOC-18) en el momento de la infección para que se dé la generación de peroxinitrito, se observó mayor oxidación de la sonda en las dos cepas. Este resultado era esperable dado que la FL-B reacciona con el peroxinitrito mucho más rápido que con H_2O_2 ^{148,151}, siendo una sonda cinéticamente selectiva para la detección de peroxinitrito. En esta condición también se evidenció menor oxidación de la sonda en los parásitos sobreexpresantes de APx-CcP que

en la cepa WT, indicando que la enzima también es capaz de reaccionar y detoxificar de forma eficiente el peroxinitrito generado en el fagosoma.

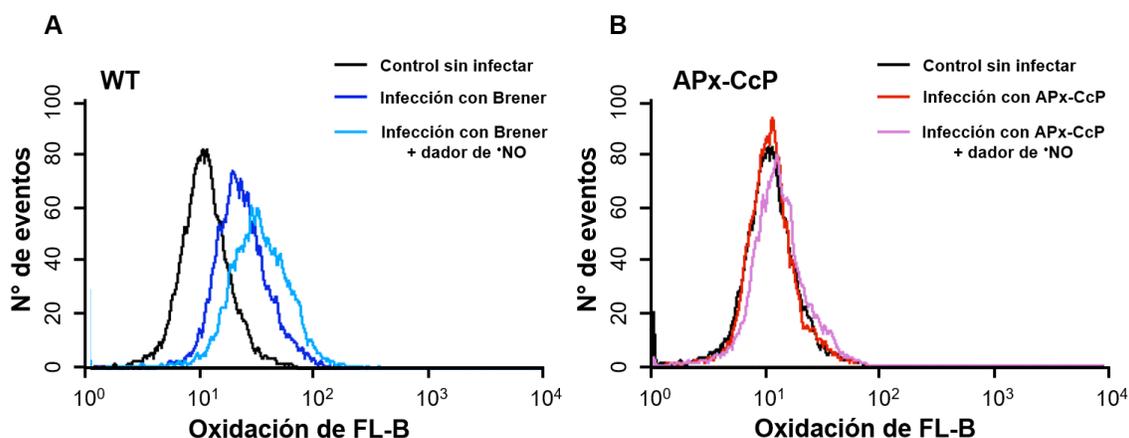


Figura 5.16. Detección de la formación de peroxinitrito con la sonda FL-B en el interior de parásitos WT (cepa Brener (Br)) o sobreexpresantes de APx-CcP durante la invasión a macrófagos J774 A.1 no estimulados tratados o no con un dador de $\cdot\text{NO}$ (NOC-18). La oxidación de la sonda se evaluó por citometría de flujo. **A.** Detección de la oxidación de la sonda FL-B en el interior de parásitos de la cepa WT (Brener, Br) durante la invasión a macrófagos. **B.** Detección de la oxidación de la sonda FL-B en el interior de parásitos sobreexpresantes de APx-CcP durante la invasión a macrófagos.

Finalmente y de mayor relevancia, evaluamos las diferencias en la capacidad de detoxificación del peroxinitrito generado de forma endógena en el macrófago.

En lugar de agregar un dador de $\cdot\text{NO}$, de forma previa a la infección los macrófagos fueron inmunoestimulados (IFN- γ /LPS, 4 horas) para la inducción de la enzima iNOS y la consiguiente producción de $\cdot\text{NO}$. Luego de las 4 horas de incubación con IFN- γ y LPS, los macrófagos fueron infectados con parásitos de la cepa WT o sobreexpresantes APx-CcP que fueron previamente cargados con la sonda FL-B. Nuevamente, la oxidación de la sonda dentro de los parásitos se evaluó por citometría de flujo a las 2 horas.

El resultado obtenido se muestra en la figura 5.17. En primer lugar, se evidenció que para las dos cepas la oxidación de la sonda aumentó varias veces cuando los macrófagos fueron inmunoestimulados (IFN- γ /LPS) en comparación con los no estimulados (que se designan en la figura 5.17 como Ctl). Cuando se realizó la activación en presencia de un inhibidor de la iNOS (L-NAME) ya no se observó esta diferencia, la intensidad de fluorescencia que se midió fue similar a la de la condición

control. Esto demuestra que el aumento en la oxidación de la sonda se debe a la reacción de ésta con el peroxinitrito, dado que cuando se bloquea la formación de $\cdot\text{NO}$ con el inhibidor, ya no se observa este aumento de fluorescencia en los macrófagos inmunoestimulados con respecto a los no activados.

Cuando se trató con el dador químico de $\cdot\text{NO}$ usado previamente (NOC-18) en el momento de la infección, se obtuvo un resultado similar al mostrado previamente en la figura 5.16, y comparable a la condición de los macrófagos inmunoestimulados para la producción de peroxinitrito.

Para los parásitos sobreexpresantes de la APx-CcP nuevamente se observó menor oxidación de la sonda en los macrófagos activados para la producción de peroxinitrito, confirmando la capacidad de la enzima de reaccionar y detoxificar de forma eficiente el peroxinitrito producido de forma endógena en el fagosoma durante la internalización del parásito.

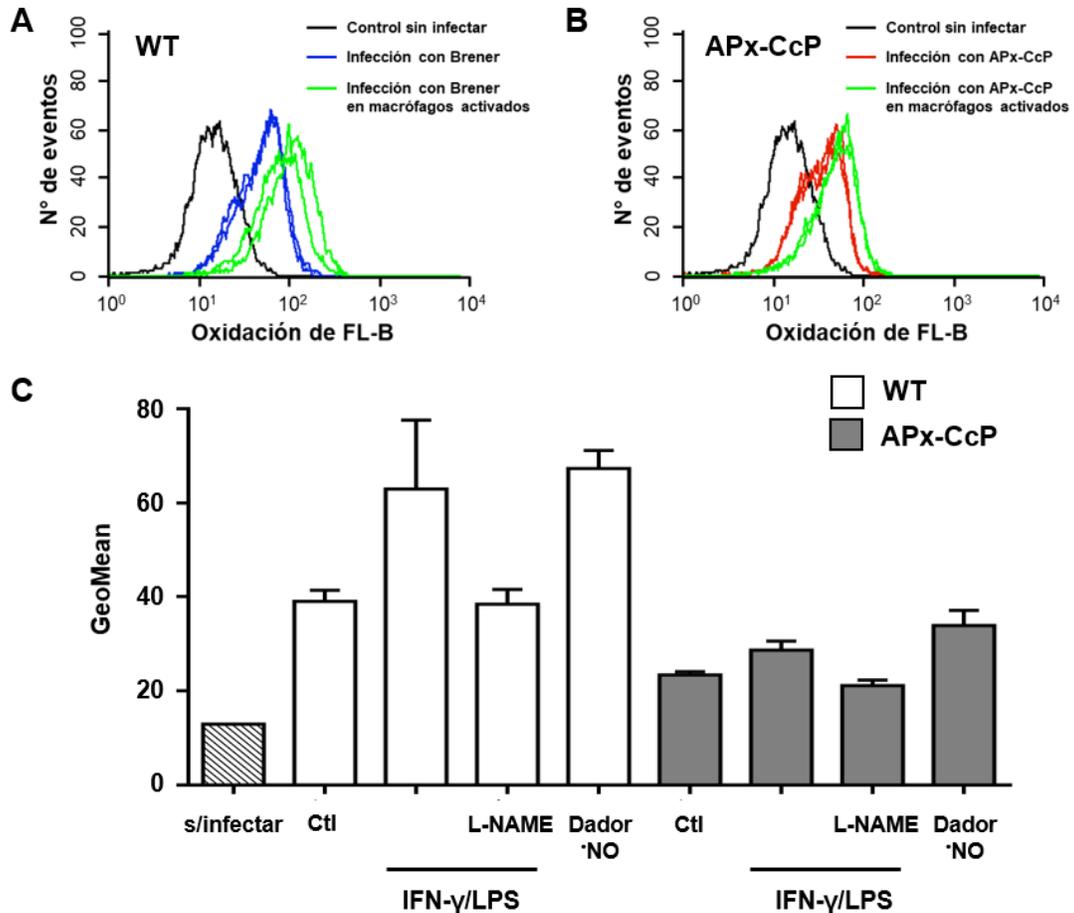


Figura 5.17. La sobreexpresión de la enzima APx-CcP disminuye la detección de peroxinitrito durante la invasión a macrófagos J774 A.1 *naïve* o activados para la producción de peroxinitrito. Macrófagos J774 A.1 fueron estimulados durante 4 horas para la inducción de la iNOS (IFN- γ , 800 U/mL; LPS, 16 μ g/mL). Los macrófagos fueron infectados con tripomastigotas metacíclicos pre-cargados con FL-B (relación parásito:célula de 10:1) durante 2 h a 37 °C. Las células se recolectaron mecánicamente luego de la infección y se analizaron mediante citometría de flujo. **A.** Detección de la oxidación de la sonda FL-B en el interior de parásitos de la cepa WT (Brener (Br)) durante la invasión a macrófagos *naïve* o inmunoestimulados. **B.** Detección de la oxidación de la sonda FL-B en el interior de parásitos sobreexpresantes de APx-CcP durante la invasión a macrófagos *naïve* o inmunoestimulados. **C.** Se representa el valor de la media geométrica (GeoMean) de la intensidad de fluorescencia para las distintas condiciones. Ctl corresponde a macrófagos no estimulados y IFN- γ /LPS corresponde a macrófagos estimulados. Cuando se indica, L-NAME (10 mM) o un dador de \cdot NO (NOC-18) se adicionó al medio previo a la infección. Se muestra la media \pm SD de las medidas realizadas por duplicado.

5.8 Parásitos sobreexpresantes de APx-CcP son más resistentes al peroxinitrito en infecciones a macrófagos

Con el objetivo de seguir evaluando el rol de la APx-CcP en la detoxificación de peroxinitrito durante la infección, macrófagos J774 A.1 fueron inmuoestimulados para la producción de peroxinitrito (4 horas) y luego infectados con tripomastigotas derivados de cultivo de la cepa WT o sobreexpresante de APx-CcP en ausencia o presencia de ascorbato (100 μ M) agregado al medio de cultivo en el momento de la infección. El porcentaje de infección se evaluó a las 24 horas mediante microscopía de fluorescencia con aumento 1000x contando la cantidad de amastigotas cada 100 macrófagos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.18. En primer lugar, se puede observar como en macrófagos no estimulados (Ctl) los parásitos sobreexpresantes de APx-CcP fueron más infectivos que los WT (Brener). Este resultado es concordante con el obtenido previamente en Hugo *et al*¹⁰⁷, indicando la participación de la enzima en la detoxificación del H₂O₂ y su contribución a la virulencia del parásito.^{42,107} La presencia de ascorbato no parece afectar los niveles de infección de las dos cepas bajo estas condiciones.

Cuando los macrófagos fueron inmuoestimulados (IFN- γ /LPS) para la producción de peroxinitrito, los parásitos sobreexpresantes también mostraron mayores niveles de infección que la cepa WT. Este resultado muestra que los sobreexpresantes de la APx-CcP son más resistentes a la citotoxicidad del peroxinitrito, lo que evidencia la participación de la enzima en la detoxificación de este oxidante durante la fagocitosis. Además, la presencia de ascorbato aumentó los niveles de infección para las dos cepas.

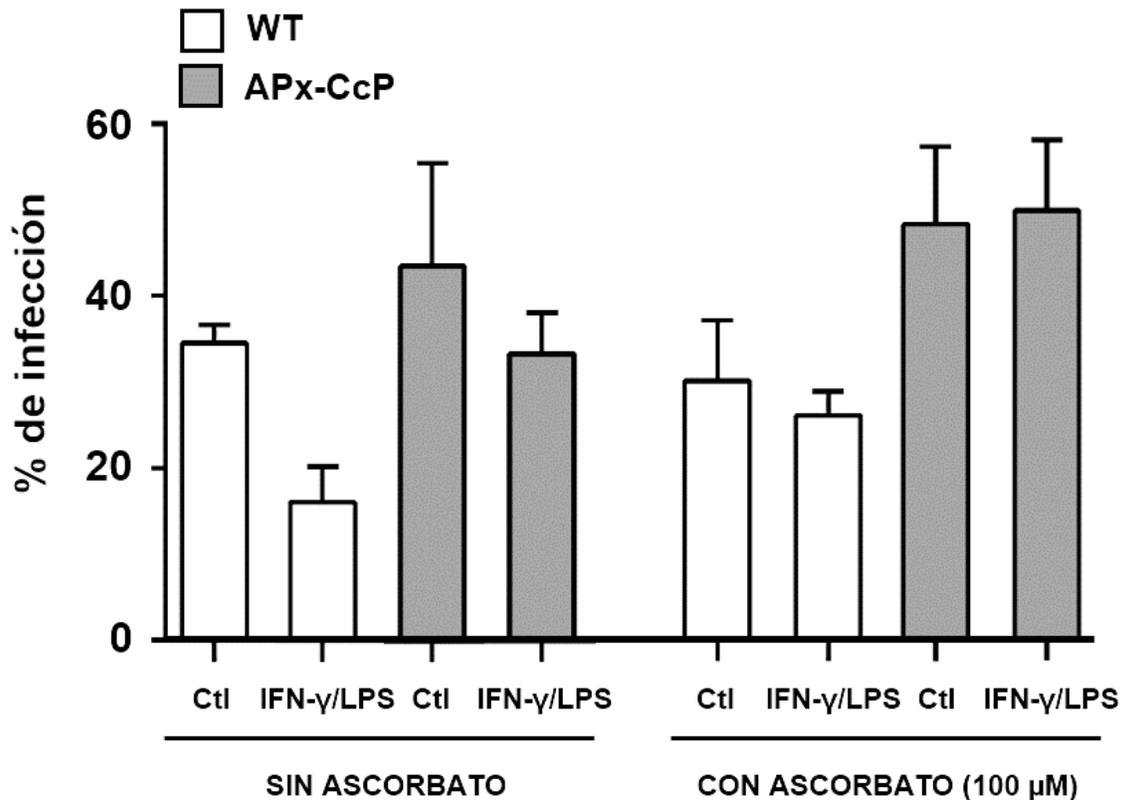


Figura 5.18. Infecciones a macrófagos J774 A.1 *naive* o inmunoestimulados (IFN γ /LPS) con parásitos de la cepa WT (Brener) o sobreexpresantes de APx-CcP en presencia o ausencia de ascorbato 100 μ M en el momento de la infección. El porcentaje de infección se evaluó a las 24 horas mediante microscopía de fluorescencia contando la cantidad de amastigotas cada 100 macrófagos. Se muestra la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Actualmente no está claro si *T. cruzi* en el estadio tripomastigota y amastigota depende exclusivamente del ascorbato sintetizado endógenamente o es capaz de incorporar el ascorbato proveniente del hospedero. Como se mencionó previamente en la Introducción en la sección 1.8, *T. cruzi* en el estadio tripomastigota presenta altos niveles de ascorbato cercanos a 2-4 mM¹⁴³.

Si bien el valor de la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) de la enzima para el ascorbato es un orden de magnitud menor que para el Cc, el ascorbato podría ser un sustrato reductor relevante en algunos compartimentos del parásito como en el retículo endoplasmático (concentración en milimolar) o en la membrana plasmática.

En el transcurso de este trabajo de tesis nos planteamos si el ascorbato proveniente del hospedero podría ser ventajoso para el parásito en sus estadíos infectivos, donde la APx-CcP se localiza en la membrana plasmática. Si suponemos que la enzima se localiza en la membrana en el lado exterior de la célula, entonces en esa localización podría utilizar también el sustrato reductor proveniente del hospedero. En el plasma, los niveles basales de ascorbato se encuentran en el entorno de 20-30 μM , alcanzándose una concentración de 100 μM luego de la suplementación. Para las células fagocíticas humanas el ascorbato tiene concentraciones intracelulares altas, en el entorno de 0.5-1.5 mM ¹³⁸.

Cuando realizamos las infecciones con suplementación con ascorbato, quisimos evaluar la importancia del ascorbato como posible mediador de la capacidad antioxidante de la enzima. Nos preguntamos si el agregado de ascorbato, como sustrato reductor de la APx-CcP, le conferiría al parásito mayor capacidad de detoxificación de oxidantes y por lo tanto un mayor nivel de infección en comparación con la condición sin suplementación. Si esto fuese cierto, es esperable que el aumento en los niveles de infección con la suplementación de ascorbato sea mayor en la cepa sobreexpresante de APx-CcP en comparación con la cepa WT. Esta fue la idea inicial, sin embargo, con el transcurso de los experimentos se nos hizo evidente que para la correcta interpretación de los resultados era necesario incorporar controles adicionales apropiados, como se describirá a continuación.

Recapitulando los resultados obtenidos en macrófagos no estimulados la suplementación con ascorbato no aumentó los niveles de infección para ninguna de las dos cepas. En principio este resultado indica que, bajo estas condiciones experimentales, la suplementación con ascorbato 100 μM no le confirió a la enzima una mayor capacidad de detoxificación de H_2O_2 generado en el fagosoma del macrófago.

En los macrófagos activados para la producción de peroxinitrito, la suplementación con ascorbato aumentó los niveles de infección para las dos cepas, siendo este aumento levemente mayor para el caso de la cepa sobreexpresante de APx-CcP. Este resultado podría indicar que la suplementación con ascorbato le confiere al

parásito mayor capacidad de detoxificación del peroxinitrito que es producido en el fagosoma. Sin embargo, no es posible concluir a partir de estos experimentos que el efecto observado se deba al rol del ascorbato como sustrato reductor de la enzima.

El aumento en los niveles de infección con la suplementación también se podría deber a otros efectos del ascorbato independientes de su función como sustrato reductor de la APx-CcP. Por ejemplo, el efecto observado se podría explicar por la reacción directa del ascorbato con el peroxinitrito o con especies radicalares¹³⁶. Como ya se mencionó, existe controversia en la literatura acerca del valor de la constante de reacción del ascorbato con el peroxinitrito, por lo que no es posible descartar que no sea esta reacción la que explique el efecto observado.

En suma, los resultados obtenidos en presencia de ascorbato son poco concluyentes en cuanto a su rol como sustrato reductor de la APx-CcP durante la infección. Para profundizar en el rol del ascorbato se requieren experimentos adicionales que no pudieron ser concretados en los plazos estipulados para esta tesis de Maestría. Por un lado se van a repetir las infecciones a macrófagos en presencia o ausencia de ascorbato agregando una condición donde se infecte con la cepa *knockout* para la APx-CcP, cepa que será amablemente cedida por el Dr. Shane Wilkinson¹¹⁸. Estos resultados serán complementados con experimentos de infección a macrófagos obtenidos de ratones deficientes en la actividad NOX-2 (C57BL/6 gp91 phox^{-/-}).

6. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis determinamos por un método directo y uno indirecto de competencia que la hemoperoxidasa de *T. cruzi* expresada de forma recombinante en *E. coli* reacciona rápidamente con el peroxinitrito con una constante cinética de segundo orden de $3\text{-}4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C, encontrándose entre las hemoproteínas que reaccionan más rápido con este oxidante.

Los cambios en el espectro de absorción UV-vis de la enzima luego de la exposición al oxidante y los resultados obtenidos en los experimentos de inmunospin trapping con DMPO proveen evidencias mecanísticas del ciclo catalítico de la APx-CcP en su reacción con el peroxinitrito. El oxidante reacciona con la enzima por un mecanismo de dos electrones con la generación del compuesto tipo I, lo que llevaría a la formación simultánea de nitrito (NO_2^-) como producto de reacción. Además mediante ensayos de competencia utilizando la sonda FL-B y realizando controles apropiados evidenciamos que la detoxificación del oxidante por parte de la enzima se puede dar de forma catalítica utilizando el sustrato reductor ascorbato.

La enzima mostró ser bastante resistente a la inactivación y nitración mediada por peroxinitrito reteniendo 80% de actividad luego de la exposición a un exceso de 10 veces de oxidante agregado en forma de bolo. Este resultado sugiere que la exposición al oxidante no afecta en gran medida la integridad del hemo, y si existe oxidación/nitración de residuos críticos no parecería estar afectando de forma importante a la actividad enzimática.

Por otro lado detectamos menor oxidación de la sonda FL-B en los parásitos sobreexpresantes de la enzima en comparación con la cepa WT cuando fueron expuestos a un dador de $\cdot\text{NO}$ y de mayor relevancia, en experimentos de invasión a macrófagos inmunoestimulados para la producción de peroxinitrito.

Cuando evaluamos la infectividad a las 24 horas en macrófagos inmunoestimulados, observamos un mayor nivel de infección en los parásitos sobreexpresantes de la enzima en comparación con la cepa WT, evidenciando así la participación de la APx-CcP en la detoxificación del peroxinitrito generado durante

la fagocitosis. De esta forma, podemos concluir que el aumento del contenido de la enzima le confiere al parásito una ventaja en la detoxificación de este oxidante que se ve reflejado en una mayor supervivencia en el macrófago.

Los experimentos de infección a macrófagos realizados con suplementación con ascorbato son poco concluyentes en cuanto al rol del ascorbato como mediador de la capacidad antioxidante de la enzima. A partir de estos resultados preliminares surgen interesantes hipótesis, en las cuales el grupo continuará profundizando, tal como se detalla en la próxima sección de Perspectivas.

Los resultados presentados en esta tesis confirman y extienden estudios previos del grupo y abren perspectivas a trabajos futuros acerca del mecanismo catalítico de la hemoperoxidasa de *T. cruzi* y su contribución a la virulencia del parásito.

7. PERSPECTIVAS

7.1 Profundización en el estudio del mecanismo catalítico de la enzima

En futuros trabajos se podría evaluar si en la reacción de la APx-CcP con el peroxinitrito se forma NO_2^- como producto. Se podrían realizar medidas de la relación $[\text{NO}_2^-]/[\text{NO}_3^-]$ en presencia o ausencia de distintas concentraciones de enzima como se ha realizado previamente en el laboratorio¹⁶³.

Para profundizar en el mecanismo catalítico sería interesante estudiar si la enzima reacciona con la forma neutra (ONOOH) o aniónica (ONOO⁻) del peroxinitrito. En trabajos previos se ha determinado que algunas hemoperoxidasas reaccionan con la forma neutra del peroxinitrito mediante el estudio de la dependencia de la constante cinética de segundo orden de la reacción con el pH¹²³.

7.2 Evaluación del ascorbato como modulador de la capacidad antioxidante de la enzima

Para profundizar en el rol del ascorbato como modulador de la capacidad de detoxificación de oxidantes de la enzima se repetirán los experimentos de infección a macrófagos sin y con suplementación con ascorbato agregando condiciones adicionales.

Los resultados preliminares de las infecciones a macrófagos inmunoestimulados para la producción de peroxinitrito con suplementación con ascorbato 100 μM muestran que la suplementación aumenta la infectividad para las dos cepas WT y sobreexpresante de APx-CcP. Nos planteamos repetir estas infecciones pero con una cepa *knockout* para la APx-CcP. Si de todas formas se observa un aumento de los niveles de infección de la cepa *knockout* con la suplementación, entonces podríamos descartar que el efecto observado se debe al rol del ascorbato como modulador de la capacidad antioxidante de la APx-CcP. Estos resultados podrían ser complementados con experimentos de infección a macrófagos obtenidos de ratones deficientes en la actividad NOX-2 (C57BL/6 gp91 phox^{-/-}). Estos experimentos nos permitirían descartar que el efecto observado se deba a la reacción de la APx-CcP con el *NO.

Finalmente se espera alcanzar un número de réplicas aceptable que nos permita realizar un análisis estadístico para la interpretación y presentación de los resultados de infecciones sin y con suplementación con ascorbato.

7.3 Purificación del citocromo c de *T. cruzi*

En el futuro sería interesante expresar y purificar de forma recombinante el citocromo c de *T. cruzi*, lo que constituiría un avance importante en el área. Contar con el citocromo c del parásito nos permitiría completar la caracterización cinética de esta hemoperoxidasa con su sustrato fisiológico, tal como se ha hecho para la hemoperoxidasa de *Leishmania major*¹¹⁵.

8. REFERENCIAS

1. Barrias, E. S., de Carvalho, T. M. U. & De Souza, W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front. Immunol.* **4**, 1–10 (2013).
2. Andrade, L. O. & Andrews, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 819–823 (2005).
3. Organización Mundial de la Salud. (2021). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). (Acceso: 7 de febrero de 2022)
4. Salvatella, R. Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención. *Arch Pediatr Urug* **87**, 49–52 (2016).
5. Gomes, C., Almeida, A. B., Rosa, A. C., Araujo, P. F. & Teixeira, A. R. L. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *Int. J. Infect. Dis.* **81**, 81–84 (2019).
6. Martin, D. L. *et al.* Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop.* **149**, 15–18 (2015).
7. Rassi Jr, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388–402 (2010).
8. Marin-Neto, J. A., Rassi Jr, A., Avezum Jr, A., Mattos, A. C. & Rassi, A. The Benefit trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 319–324 (2009).
9. Matta Guedes, P. M., Gutierrez, F. R., Nascimento, M. S., Do-Valle-Matta, M. A. & Silva, J. S. Antiparasitical chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. *Trop. Med. Int. Heal.* **17**, 1057–1065 (2012).
10. Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D. & Maguire, J. H. Chagas disease in the united states: a public health approach. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, e00023-19 (2020).
11. Curtis-Robles, R., Wozniak, E. J., Auckland, L. D., Hamer, G. L. & Hamer, S. A. Combining public health education and disease ecology research: using citizen science to assess Chagas Disease entomological risk in Texas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, 1–12 (2015).
12. Meyer, H. & Xavier de Oliveira, M. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: A four-year study. *Parasitology* **39**, 91–94 (1948).

13. De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. & Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, (2010).
14. Nogueira, N. & Cohn, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **143**, 1402–1420 (1976).
15. de Carvalho, T. M. U. & De Souza, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct. Funct.* **14**, 383–392 (1989).
16. De Souza, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology* **86**, (1984).
17. Batista, M. F., Nájera, C. A., Meneghelli, I. & Bahia, D. The parasitic intracellular lifestyle of Trypanosomatids: parasitophorous vacuole development and survival. *Front. Cell Dev. Biol.* **8:396**, 1–10 (2020).
18. Baldrige, C. W. & Gerard, R. W. The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol. Content* **103**, 235–236 (1932).
19. Iyer, G. Y. & Quastel, J. H. NADPH and NADH oxidation by guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**, 427–434 (1963).
20. Babior, B. M., Curnutte, J. T. & McMurrich, B. J. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **58**, 989–996 (1976).
21. Baehner, R. L. & Karnovsky, M. L. Deficiency of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidase in chronic granulomatous disease. *Science (80-)*. **162**, 1277–1279 (1968).
22. Metz, G., Carlier, Y. & Vray, B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN- γ -preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunol.* **15**, 693–699 (1993).
23. Russo, M., Starobinas, N., Ribeiro-Dos-Santos, R., Minoprio, P., Eisen, H., Hontebeyrie-Joskowicz, M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **11**, 385–395 (1989).
24. Paiva, C. N., Medei, E. & Bozza, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* **14**, 1–19 (2018).
25. Goes, G. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* needs a signal provided by reactive oxygen species to infect macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10:e000455**, 1–25 (2016).
26. Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs Jr, J. B. & Nacy, C. A. Activated

- macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* **144**, 278–283 (1990).
27. Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. & Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**, 4794–4797 (1990).
 28. Muñoz-Fernández, M. A., Fernández, M. A. & Fresno, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* **33**, 35–40 (1992).
 29. Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L. & Sher, A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* **22**, 2501–2506 (1992).
 30. Hölscher, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* **66**, 1208–1215 (1998).
 31. Torrico, F. *et al.* Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* **146**, 3626–32 (1991).
 32. Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R. & Nathan, C. F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* **169**, 1011–1020 (1989).
 33. Piacenza, L., Trujillo, M. & Radi, R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J. Exp. Med.* **216**, 501–516 (2019).
 34. Ischiropoulos, H., Zhu, L. & Beckman, J. S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 446–451 (1992).
 35. De Groote, M. A. *et al.* Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13997–14001 (1997).
 36. Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. & Baldwin, C. L. Macrophage control of *brucella abortus*: Role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cellular Immunology* **151**, 309–319 (1993).
 37. Diefenbach, A. *et al.* Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite.

Immunity **8**, 77–87 (1998).

38. Santiago, H. C. *et al.* NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1492 (2012).
39. Alvarez, M. N., Piacenza, L., Irigoín, F., Peluffo, G. & Radi, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 222–232 (2004).
40. Ferrer-Sueta, G. *et al.* Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem. Rev.* **118**, 1338–1408 (2018).
41. Piacenza, L., Alvarez, M. N., Peluffo, G. & Radi, R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 415–421 (2009).
42. Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L. & Radi, R. Intrapagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J. Biol. Chem.* **286**, 6627–6640 (2011).
43. Rubbo, H., Denicola, A. & Radi, R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 96–102 (1994).
44. Fang, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–832 (2004).
45. Hayyan, M., Hashim, M. A. & Alnashef, I. M. Superoxide Ion: generation and chemical Implications. *Chem. Rev.* **116**, 3029–3085 (2016).
46. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97–112 (1995).
47. Imlay, J. A. Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
48. Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J. & Merkus, D. Reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, ID 862423, 1-15 (2017).
49. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
50. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748 (2017).

51. Martínez, A. *et al.* Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 8879–8888 (2019).
52. McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte superoxide (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055 (1969).
53. Takahashi, M. & Asada, K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 558–566 (1983).
54. Lynch, R. E. & Fridovich, I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* **253**, 4697–4699 (1978).
55. DeCoursey, T. E. The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase. *Immunol. Rev.* **273**, 194–218 (2016).
56. Babior, B. M. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 42–47 (2004).
57. Winterbourn, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology* **528**, (Elsevier Inc., 2013).
58. Orrico, F. *et al.* The permeability of human red blood cell membranes to hydrogen peroxide is independent of aquaporins. *J. Biol. Chem.* **298**, 101503 (2022).
59. Bienert, G. P. *et al.* Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 1183–1192 (2007).
60. Nathan, B. Y. C., Nogueira, N., Juangbhanich, C. & Cohn, Z. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **149**, 1056–1068 (1979).
61. Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. & Kennedy, M. C. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J. Biol. Chem.* **275**, 14064–14069 (2000).
62. Yamazaki, I. & Piette, L. H. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology. *J. Biol. Chem.* **265**, 13589–13594 (1990).
63. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).
64. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G.

- Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9265–9269 (1987).
65. Bartberger, M. D. *et al.* The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10958–10963 (2002).
 66. Rubbo, H. *et al.* Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: Termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 15–25 (1995).
 67. Möller, M. N., Li, Q., Lancaster, J. R. & Denicola, A. Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB Life* **59**, 243–248 (2007).
 68. Madej, E., Folkes, L. K., Wardman, P., Czapski, G. & Goldstein, S. Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 2013–2018 (2008).
 69. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4003–4008 (2004).
 70. Möller, M. N., Lancaster, J. R. & Denicola, A. Chapter 2 The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes. *Curr. Top. Membr.* **61**, 23–42 (2008).
 71. Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927–930 (1994).
 72. Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* **271**, C1424–C1437 (1996).
 73. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1620–1624 (1990).
 74. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250 (1991).
 75. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481–487 (1991).
 76. Ischiropoulos, H. *et al.* Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 431–437 (1992).

77. Radi, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 5839–5848 (2018).
78. Marla, S. S., Lee, J. & Groves, J. T. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14243–14248 (1997).
79. Khairutdinov, R. F., Coddington, J. W. & Hurst, J. K. Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* **39**, 14238–14249 (2000).
80. Denicola, A., Souza, J. M. & Radi, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **95**, 3566–3571 (1998).
81. Keith, W.G., Powell, R. Kinetics of Decomposition of Peroxynitrous Acid. *J. Chem. Soc. A*, 90 (1969).
82. Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S. & Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem. J.* **290**, 51–57 (1993).
83. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. & Cayota, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 463–488 (2001).
84. Augusto, O. *et al.* Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859 (2002).
85. Signorelli, S., Möller, M. N., Coitiño, E. L. & Denicola, A. Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **512**, 190–196 (2011).
86. Beckman, J. S. *et al.* Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 438–445 (1992).
87. Zhu, L., Gunn, C. & Beckman, J. S. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 452–457 (1992).
88. Van Der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B. & Cross, C. E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J. Biol. Chem.* **272**, 7617–7625 (1997).
89. Wu, W., Chen, Y. & Hazen, S. L. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* **274**, 25933–25944 (1999).

90. Marquez, L. A. & Dunford, H. B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II: Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J. Biol. Chem.* **270**, 30434–30440 (1995).
91. Castro, L., Eiserich, J. P., Sweeney, S., Radi, R. & Freeman, B. A. Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* **421**, 99–107 (2004).
92. Isobe, C., Abe, T. & Terayama, Y. Remarkable increase in 3-nitrotyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with lacunar stroke. *Brain Res.* **1305**, 132–136 (2009).
93. Montoliu, C. *et al.* 3-nitro-tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 1629–1637 (2011).
94. Baldus, S. *et al.* Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* **33**, 1010–1019 (2002).
95. Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T. & Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in *Trypanosomatids*. *Science (80-)*. **227**, 1485–1487 (1985).
96. Oza, S. L., Tetaud, E., Ariyanayagam, M. R., Warnon, S. S. & Fairlamb, A. H. A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **277**, 35853–35861 (2002).
97. Manta, B. *et al.* Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3199–3216 (2013).
98. Trujillo, M. *et al.* *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* **279**, 34175–34182 (2004).
99. Piacenza, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J.* **410**, 359–368 (2008).
100. Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A. & Kelly, J. M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione- dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **275**, 8220–8225 (2000).
101. Piñeyro, M. D., Arias, D., Ricciardi, A., Robello, C. & Parodi-Talice, A. Oligomerization dynamics and functionality of *Trypanosoma cruzi* cytosolic tryparedoxin peroxidase as peroxidase and molecular chaperone. *Biochim.*

Biophys. Acta - Gen. Subj. **1863**, 1583–1594 (2019).

102. Specker, G., Estrada, D., Radi, R. & Piacenza, L. *Trypanosoma cruzi* Mitochondrial Peroxiredoxin Promotes Infectivity in Macrophages and Attenuates Nifurtimox Toxicity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 749476 1–15 (2022).
103. Wilkinson, S. R. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or trypanredoxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 17062–17071 (2002).
104. Wilkinson, S. R. *et al.* TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **364**, 787–794 (2002).
105. Wilkinson, S. R., Obado, S. O., Mauricio, I. L. & Kelly, J. M. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13453–13458 (2002).
106. Hugo, M. Sistemas enzimáticos de detoxificación de oxidantes en patógenos intracelulares. (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UDELAR, 2014).
107. Hugo, M. *et al.* Kinetics, subcellular localization, and contribution to parasite virulence of a *Trypanosoma cruzi* hybrid type A heme peroxidase (TcAPx-CcP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E1326–E1335 (2017).
108. Temperton, N. J., Wilkinson, S. R. & Kelly, J. M. Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**, 339–343 (1996).
109. Ismail, S. O. *et al.* Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**, 187–197 (1997).
110. Arias, D. G. *et al.* Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 37–46 (2011).
111. Arias, D. G. *et al.* On the functionality of a methionine sulfoxide reductase B from *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic. Biol. Med.* **158**, 96–114 (2020).
112. Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Martínez, A. & Radi, R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in chagas disease. *Antioxidants Redox Signal.* **19**, 723–734 (2013).
113. Piacenza, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners

- of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int. J. Parasitol.* **39**, 1455–1464 (2009).
114. Adak, S. & Datta, A. K. *Leishmania major* encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: A novel role of the transmembrane domain. *Biochem. J.* **390**, 465–474 (2005).
 115. Jasion, V. S. & Poulos, T. L. *Leishmania major* peroxidase is a cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* **51**, 2453–2460 (2012).
 116. Yadav, R. K., Dolai, S., Pal, S. & Adak, S. Role of C-terminal acidic cluster in stabilization of heme spin state of ascorbate peroxidase from *Leishmania major*. *Arch. Biochem. Biophys.* **495**, 129–135 (2010).
 117. Yadav, R. K., Dolai, S., Pal, S. & Adak, S. Role of tryptophan-208 residue in cytochrome c oxidation by ascorbate peroxidase from *Leishmania major*-kinetic studies on Trp208Phe mutant and wild type enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 863–871 (2008).
 118. Taylor, M. C., Lewis, M. D., Francisco, A. F., Wilkinson, S. R. & Kelly, J. M. The *Trypanosoma cruzi* vitamin C dependent peroxidase confers protection against oxidative stress but is not a determinant of virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003707 1-17 (2015).
 119. Freeman, S. L. *et al.* Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* heme peroxidase and characterization of its substrate specificity and compound I intermediate. *J. Biol. Chem.* **298**, 102204 (2022).
 120. Moody, P. C. E. & Raven, E. L. The nature and reactivity of ferryl heme in compounds I and II. *Acc. Chem. Res.* **51**, 427–435 (2018).
 121. Martinez, A. Fe-superóxido dismutasas y hemoperoxidasa híbrida tipo A (APx-CcP) en *T. cruzi*. (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UDELAR, 2018).
 122. Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* **4**, 161–177 (2009).
 123. Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P. & Wever, A. Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* **215**, 767–775 (1993).
 124. Galijasevic, Semira, Maitra, Dhiman, Lu, Tun, Sliskovic, Inga, Abdulhamid, Ibrahim, Abu-Soud, H. M. Myeloperoxidase interaction with peroxynitrite: chloride deficiency and heme depletion. *Free Radic Biol Med* **47**, 431–439 (2009).
 125. Gebicka, L., Didik, J. & Gebicki, J. L. Catalytic scavenging of peroxynitrite by lactoperoxidase in the absence and presence of bicarbonate. *Free Radic. Res.*

- 44**, 217–223 (2010).
126. Furtmüller, P. G. *et al.* Peroxynitrite efficiently mediates the interconversion of redox intermediates of myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 944–954 (2005).
 127. Ogusucu, R. *et al.* Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite : Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 326–334 (2007).
 128. Mehl, M., Daiber, A., Herold, S., Shoun, H. & Ullrich, V. Peroxynitrite reaction with heme proteins. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **3**, 142–152 (1999).
 129. Gebicka, L. & Didik, J. Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1375–1379 (2009).
 130. Gebicka, L. & Didik, J. Kinetic studies of the reaction of heme-thiolate enzyme chloroperoxidase with peroxynitrite. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 159–164 (2007).
 131. Trostchansky, A. *et al.* Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: A free radical mechanism of inactivation. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1029–1038 (2007).
 132. Daiber, A. *et al.* Nitration and inactivation of cytochrome P450(BM-3) by peroxynitrite: Stopped-flow measurements prove ferryl intermediates. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6729–6739 (2000).
 133. Exner, M. & Herold, S. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 287–293 (2000).
 134. Herold, S. & Shivashankar, K. Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. *Biochemistry* **42**, 14036–14046 (2003).
 135. Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R. & Radi, R. Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **319**, 491–497 (1995).
 136. Smirnov, N. Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radic. Biol. Med.* **122**, 116–129 (2018).
 137. Du, J., Cullen, J. J. & Buettner, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 443–457 (2012).
 138. Levine, M. *et al.* Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: Evidence for a recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3704–3709 (1996).

139. Deutsch, J. C. Dehydroascorbic acid. *J. Chromatogr. A* **881**, 299–307 (2000).
140. Buettner, G. R. & Jurkiewicz, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiat. Res.* **145**, 532–541 (1996).
141. Wilkinson, S. R., Prathalingam, S. R., Taylor, M. C., Horn, D. & Kelly, J. M. Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11645–11650 (2005).
142. Logan, F. J., Taylor, M. C., Wilkinson, S. R., Kaur, H. & Kelly, J. M. The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase. *Biochem. J.* **407**, 419–426 (2007).
143. Clark, D., Albrecht, M. & Arévalo, J. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 143–145 (1994).
144. Nelson, D. P. & Kiesow, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* **49**, 474–478 (1972).
145. Bohle, D. S., Hansen, B., Paulson, S. C. & Smith, B. D. Biomimetic synthesis of the putative cytotoxin peroxynitrite, ONOO⁻, and its characterization as a tetramethylammonium salt. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7423–7424 (1994).
146. Reed, J. W., Ho, H. H. Jolly, W. L. Chemical syntheses with a quenched flow reactor. Hydroxytrihydroborate and peroxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1248–1249 (1974).
147. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins. in *Methods in Enzymology* **441**, 173–196 (2008).
148. Rios, N. *et al.* Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *Free Radic. Biol. Med.* **101**, 284–295 (2016).
149. Detweiler, C. D. *et al.* Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 364–369 (2002).
150. Granger, D. L., Taintor, R. R., Boockvar, K. S. & Hibbs, J. B, J. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol.* **268**, 142–151 (1996).
151. Rios, N. Síntesis y caracterización de compuestos boronados diseñados como sondas para la detección y cuantificación de peroxinitrito. (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UDELAR, 2020).

152. Pedron, F. N., Issoglio, F., Estrin, D. A. & Scherlis, D. A. Electron transfer pathways from quantum dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **153**, 225102 1–11 (2020).
153. Jasion, V. S., Polanco, J. A., Meharena, Y. T., Li, H. & Poulos, T. L. Crystal structure of *Leishmania major* peroxidase and characterization of the compound I tryptophan radical. *J. Biol. Chem.* **286**, 24608–24615 (2011).
154. Bartlett, D., Church, D. F., Bounds, P. L. & Koppenol, W. H. The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 85–92 (1995).
155. Squadrito, G. L., Jin, X. & Pryor, W. A. Stopped-flow kinetic study of the reaction of ascorbic acid with peroxyxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **322**, 53–59 (1995).
156. Kurz, C. R., Kissner, R., Nauser, T., Perrin, D. & Koppenol, W. H. Rapid scavenging of peroxyxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1529–1537 (2003).
157. Alvarez, B. & Radi, R. Peroxyxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* **25**, 295–311 (2003).
158. Get Area. Disponible en: <http://curie.utmb.edu/getarea.html>.
159. Dębski, D. *et al.* Mechanism of oxidative conversion of Amplex Red to resorufin pulse radiolysis and enzymatic studies. *Free Radic Biol Med* **95**, 323–332 (2016).
160. Tórtora, V. Estudios estructurales y funcionales de formas modificadas de citocromo c: Rol de la nitración de tirosinas y su efecto en la coordinación del hemo. (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UDELAR, 2014).
161. Piñeyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R. & Trujillo, M. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 287–295 (2011).
162. Martinez, A. *et al.* Cytosolic Fe-superoxide dismutase protects *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical increasing pathogen virulence in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **120**, S93 (2018).
163. Romero, N. *et al.* Reaction of human hemoglobin with peroxyxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J. Biol. Chem.* **278**, 44049–44057 (2003).