



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Tesina de Grado presentada para la obtención  
del Título de Licenciado en Bioquímica**

# **Inhibición de la tiorredoxina glutación reductasa de *Echinococcus granulosus* por ácido nitrooleico**

**Martín Sosa Quesada**

**Orientadora: Dra. Lucía Turell Novo**

**Co-orientadora: Mag. Martina Steglich Guarino**

**Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de  
Ciencias, Universidad de la República**

**Diciembre 2022, Montevideo, Uruguay**



# Agradecimientos

A Lucía, por abrirme las puertas del Laboratorio tan temprano en la carrera e introducirme al mundo de los tioles biológicos y de los nitrolípidos, que me fascinó. También por tu interés genuino en mi formación, motivándome a presentar resultados en mis primeros eventos científicos y por las oportunidades laborales.

A Martina, por transmitirme sus conocimientos y buenas prácticas con generosidad y dedicación en cada experimento, contagiándome las ganas de aprender y trabajar.

A Mariana Bonilla, por la donación del plásmido de la *EgTR<sub>wt</sub>* y la ayuda en la construcción del plásmido de la *EgTR<sub>U596C</sub>*.

A Santiago Garcimartín por la expresión y purificación de la *EgTR<sub>wt</sub>*.

A todo el grupo de Enzimología y Físicoquímica Biológica, por sus valiosos consejos e ideas compartidas con Lucía, Martina y conmigo, con miradas críticas y alentadoras. Son grandes científicos y científicas, y sobre todo buena gente. Gracias por la buena onda dentro y fuera del Laboratorio.

A mi familia, sobre todo a mi mamá, mi papá y mi hermana, por su apoyo incondicional y continuo, siempre. A mi perra Lupe por su compañía en las largas jornadas de estudio en casa.

A mis amigos, los de la vida, y los de la Licenciatura, Santi, Andrés, Manu, Vicky, Caro, Mateo, Mellany, Flo y Magui. Con quienes compartí momentos de estrés y de mucha alegría en estos años.

A la educación pública. Al Jardín N° 239, la Escuela N° 146 y el Liceo N° 1, de Atlántida. A la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, por darme la grata oportunidad de tener una educación gratuita y de primer nivel.

Salú!



# Índice

Índice .....	1
Abreviaturas .....	4
RESUMEN .....	5
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1.1 Bioquímica de tioles.....	6
1.1.1 Aspectos generales.....	6
1.1.2 Reactividad de tioles biológicos .....	6
1.1.3 Importancia de los tioles en proteínas.....	8
1.2 Selenocisteína .....	9
1.2.1 Breve historia.....	9
1.2.2 Incorporación de selenocisteína en proteínas .....	9
1.2.3 Selenocisteína en comparación con cisteína.....	10
1.3 Sistemas antioxidantes dependientes de tiorredoxina y glutatión .....	12
1.3.1 Generalidades.....	12
1.3.2 Sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa .....	12
1.3.3 Sistema glutatión/glutatión reductasa.....	14
1.4 <i>Echinococcus granulosus</i> .....	15
1.4.1 Generalidades y patologías asociadas.....	15
1.4.2 Homeostasis redox .....	17
1.5 Tiorredoxina glutatión reductasa de <i>Echinococcus granulosus</i> ( <i>EgTGR</i> ).....	18
1.5.1 Gen <i>EgTGR</i> .....	18
1.5.2 Estructura, función y enzimología de la <i>EgTGR</i> .....	19
1.5.3 Actividad tiorredoxina reductasa: dependencia del módulo TR.....	21
1.5.4 Actividades deglutationilasa y glutatión reductasa: dependencia del módulo Grx	21
1.5.5 Inhibidores de la <i>EgTGR</i> y TR de mamíferos .....	22
1.6 Nitroalquenos derivados de ácidos grasos .....	25
1.6.1 Formación.....	25
1.6.2 Metabolismo y biodistribución del ácido nitrooleico .....	27

1.6.3	Reactividad del ácido nitrooleico.....	29
1.6.4	Acciones biológicas del ácido nitrooleico.....	31
1.6.4.1	Activación de PPAR $\gamma$ .....	32
1.6.4.2	Activación de HSF-1.....	33
1.6.4.3	Activación de Nrf2.....	34
1.6.4.4	Inhibición de NF- $\kappa$ B.....	35
1.6.4.5	Potencial farmacológico en humanos.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
2.1	Objetivo general.....	37
2.2	Objetivos específicos.....	37
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
3.1	Reactivos.....	38
3.2	Cálculo del coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) del NO <sub>2</sub> -OA por espectrofotometría UV-Vis.....	38
3.3	Análisis del stock de NO <sub>2</sub> -OA por HPLC.....	39
3.4	Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del NO <sub>2</sub> -OA por dispersión de luz.....	39
3.5	Expresión y purificación del módulo tiorredoxina reductasa ( <i>EgTR</i> ) de la tiorredoxina glutatión reductasa de <i>Echinococcus granulosus</i> ( <i>EgTGR</i> ).....	40
3.5.1	Expresión.....	40
3.5.2	Purificación.....	41
3.6	Medidas de actividad tiorredoxina reductasa por ensayo de DTNB.....	42
3.7	Determinación de constantes catalíticas ( $k_{cat}$ ) aparentes.....	42
3.8	Reacción entre <i>EgTR</i> y NO <sub>2</sub> -OA.....	42
3.9	Análisis de modificaciones en <i>EgTR</i> <sub>wt</sub> por reacción con NO <sub>2</sub> -OA mediante espectrometría de masas.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
4.1	Caracterización espectral UV-Vis del NO <sub>2</sub> -OA.....	45
4.2	Determinación de la CMC por dispersión de luz.....	47
4.3	Expresión y purificación de <i>EgTR</i> <sub>U596C</sub> .....	48
4.3.1	Primera expresión.....	49
4.3.2	Segunda expresión.....	52

4.4	Determinación de $k_{\text{cat}}$ para $EgTR_{\text{wt}}$ y $EgTR_{\text{U596C}}$ .....	54
4.5	Reacción entre $EgTR_{\text{wt}}$ y $\text{NO}_2\text{-OA}$ .....	56
4.6	Reacción entre $EgTR_{\text{U596C}}$ y $\text{NO}_2\text{-OA}$ .....	61
4.7	Análisis de sitios de nitroalquilación en $EgTR_{\text{wt}}$ por espectrometría de masas ....	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>67</b>

# Abreviaturas

R-SH	Tiol
R-S <sup>-</sup>	Tiolato
R-SeH	Selenol
R-Se <sup>-</sup>	Selenolato
TR	Tiorredoxina reductasa
TGR	Tiorredoxina glutatión reductasa
Trx	Tiorredoxina
GR	Glutatión reductasa
<i>EgTR<sub>wt</sub></i>	Forma trunca y salvaje de la TGR de <i>Echinococcus granulosus</i>
<i>EgTR<sub>U596C</sub></i>	Forma trunca y mutante de la TGR de <i>Echinococcus granulosus</i>
OA	Ácido oleico o ácido octadecaenoico
NO <sub>2</sub> -OA	Ácido nitrooleico (mezcla equimolar de los regioisómeros 9-NO <sub>2</sub> -OA y 10-NO <sub>2</sub> -OA)
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
CMC	Concentración micelar crítica
RMN	Resonancia magnética nuclear
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masa en tándem
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
DMSO	Dimetilsulfóxido

# RESUMEN

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos se forman *in vivo* y pueden administrarse de forma exógena. El ácido nitrooleico (NO<sub>2</sub>-OA) posee un centro electrofílico adyacente al grupo nitro, capaz de formar aductos de Michael reversibles con tioles, tales como cisteínas proteicas. Esta reacción sustenta, entre otras, las acciones antiinflamatorias y citoprotectoras de estos compuestos en cultivos celulares y modelos animales. Es nuestra hipótesis que el NO<sub>2</sub>-OA también reacciona con selenocisteínas proteicas, lo cual no se ha probado hasta el momento.

En este trabajo se determinó la composición de un stock de NO<sub>2</sub>-OA por HPLC y RMN, identificando la presencia mayoritaria de los regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA en cantidades equimolares. También se midieron propiedades de interés del NO<sub>2</sub>-OA. Su coeficiente de absorptividad molar en metanol fue  $\epsilon_{259 \text{ nm}} = 4498 \pm 28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y en amortiguador fosfato a pH 7.4 fue de  $\epsilon_{272 \text{ nm}} = 3437 \pm 141 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Se determinó la concentración micelar crítica en amortiguador fosfato a pH 7.4, resultando en  $65 \pm 14 \mu\text{M}$ .

Paralelamente, se estudió la reactividad del NO<sub>2</sub>-OA con una forma trunca de la selenoenzima tiorredoxina glutatión reductasa del parásito *Echinococcus granulosus* (*EgTGR*), que sólo posee el módulo tiorredoxina reductasa (*EgTR*). Las enzimas salvaje (*EgTR<sub>wt</sub>*) y mutante (*EgTR<sub>U596C</sub>*) se produjeron de forma recombinante en *E. coli* y se purificaron. Se midió la actividad enzimática utilizando ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico y NADPH como sustratos, siguiendo la formación del producto ácido 5-tio-2-nitrobenzoico. Para *EgTR<sub>wt</sub>* se determinó una  $k_{\text{cat}} \sim 375$  veces más rápida que para *EgTR<sub>U596C</sub>*, demostrando la importancia del residuo de selenocisteína para la catálisis.

Respecto a la reacción entre NO<sub>2</sub>-OA y la enzima, se determinó que el NO<sub>2</sub>-OA inhibe a la *EgTR<sub>wt</sub>* con una cinética bifásica, lo que podría explicarse como la reacción del NO<sub>2</sub>-OA con dos residuos distintos de la enzima. De los ajustes se determinaron las constantes de la fase más lenta como  $k_{\text{on}} = (1.3 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{\text{off}} = (9 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (pH 7.4, 25 °C). El análisis preliminar de la reacción por espectrometría de masa mostró residuos de cisteína e histidina modificados por NO<sub>2</sub>-OA. La *EgTR<sub>U596C</sub>*, mostró un comportamiento distinto respecto a la enzima salvaje, lo que sugiere que la selenocisteína podría estar involucrada en el mecanismo de inhibición por parte del NO<sub>2</sub>-OA.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Bioquímica de tioles

### 1.1.1 Aspectos generales

Un tiol (R-SH) es un compuesto orgánico que contiene el grupo funcional sulfhidrilo, formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno. En los tioles, el azufre está en su menor estado de oxidación (-2). Como se aprecia en la configuración electrónica del azufre ( $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$ ), el mismo cuenta con seis electrones de valencia y un orbital 3d vacante, lo cual le permite un amplio rango de estados de oxidación (-2 a +6). Esto les confiere versatilidad química a los tioles, ya que pueden actuar como dadores electrónicos y también como aceptores. En sistemas biológicos, los tioles están presentes en el aminoácido cisteína (Cys), que forma parte de proteínas y pequeños péptidos (1, 2).

Los tioles tienen propiedades ácido-base en el grupo sulfhidrilo. El  $pK_a$  de un tiol da pistas sobre su reactividad como nucleófilo, ya que la nucleofilia aumenta cuando aumenta el  $pK_a$ . La forma desprotonada de un tiol, conocida como tiolato ( $R-S^-$ ), es más reactiva como nucleófilo que el primero, por eso también es importante que la forma tiolato esté disponible para reaccionar. Un  $pK_a$  alto disminuye la concentración de la forma desprotonada. Por ejemplo, el  $pK_a^{S-H}$  de la cisteína libre es  $\sim 8.4$ , por lo tanto, a pH fisiológico ( $\sim 7.4$ ) solo el  $\sim 1\%$  estará como  $R-S^-$  (3).

En proteínas, los tioles exhiben un amplio rango de  $pK_a$ s, ya que su entorno aminoacídico puede afectar a este parámetro. Una carga positiva próxima al tiol, provista por otro aminoácido (como lisina, arginina o histidina) o bien por un catión metálico, puede estabilizar la forma tiolato. Los dipolos negativos también contribuyen en la disminución del  $pK_a$ , como ocurre en las hélices  $\alpha$ , donde la polaridad de la hélice es negativa hacia el N-terminal y positiva hacia el C-terminal, por la dirección y sentido de los dipolos del enlace peptídico. Esto hace que las cisteínas ubicadas hacia el N-terminal de una hélice  $\alpha$  tengan, generalmente, un  $pK_a$  menor que una cisteína libre. Otros efectos, tales como la exclusión de agua del sitio activo y la presencia de enlaces de hidrógeno específicos, pueden modular la acidez de los tioles proteicos (2-6).

### 1.1.2 Reactividad de tioles biológicos

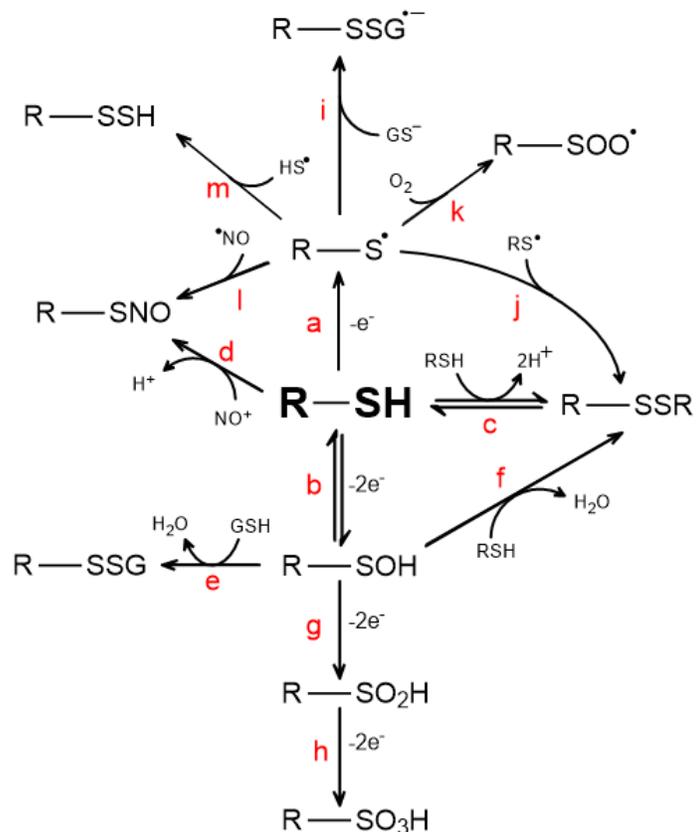
Los tioles biológicos están representados por la cisteína y sus derivados de alto peso molecular, como las proteínas, y de bajo peso molecular, como el tripéptido glutatión (GSH,  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Los tioles pueden oxidarse por un electrón, dando lugar a la formación de radical tiilo ( $R-S^\bullet$ ; Figura 1 reacción a), o por dos electrones, dando ácido

sulfénico (R-SOH; Figura 1 reacción b) o disulfuros (R-SS-R; Figura 1 reacción c). Asimismo, reaccionan con agentes nitrosantes como el nitrosonio (NO<sup>+</sup>; Figura 1 reacción d) (4, 5, 7).

En el caso de los R-SOH derivados de tioles de bajo peso molecular, la reacción más probable a nivel celular es la formación de un disulfuro mixto con GSH reducido (R-SSG; Figura 1 reacción e). Esto se debe a la alta concentración de GSH reducido en la mayoría de los compartimentos celulares (en el rango 5–10 mM) (5, 8). En el caso de las proteínas, los R-SOH pueden reaccionar con GSH reducido para formar derivados proteicos glutationilados (proteína-SSG), o bien con otro tiol proteico, formando enlaces disulfuro (proteína-SS-proteína) intra o intermoleculares (Figura 1 reacción f), según el otro tiol esté en la misma proteína o en otra, respectivamente. A su vez, el R-SOH puede reaccionar con otro oxidante por dos electrones, como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para formar ácido sulfínico (R-SO<sub>2</sub>H; Figura 1 reacción g) o ácido sulfónico (R-SO<sub>3</sub>H; Figura 1 reacción h) (2, 4, 5, 9).

La oxidación de R-SH a R-SOH y R-SS-R son procesos reversibles. En sistemas biológicos,

las respectivas reacciones de reducción se dan por procesos enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros dependen de cascadas enzimáticas que catalizan reacciones redox, donde el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH; en su forma reducida, NADP<sup>+</sup>; en su forma oxidada) otorga los equivalentes de reducción, tales como en los sistemas glutatión/glutatión reductasa y tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. La formación de R-SO<sub>2</sub>H y R-SO<sub>3</sub>H son consideradas irreversibles, aunque en las peroxirredoxinas (Prxs) y otras proteínas, el R-SO<sub>2</sub>H puede reducirse enzimáticamente por sulfirredoxinas (Srxs) a expensas de ATP (5, 9–12).



**Figura 1. Vías de oxidación de tioles.** Se muestran las reacciones mencionadas en el texto.

En el caso de los R-S• de bajo y alto peso molecular, bajo condiciones fisiológicas, su reacción más probable es con GSH tiolato (GS<sup>-</sup>), rindiendo el radical anión disulfuro mixto correspondiente (R-SSG<sup>-</sup>; Figura 1 reacción i). También puede reaccionar con otro R-S<sup>-</sup> presente, distinto de GS<sup>-</sup>. Alternativamente, dos R-S• pueden combinarse para formar un R-SS-R (Figura 1 reacción j), aunque esta reacción es poco probable en solución, ya que tendrían que encontrarse dos especies muy reactivas que están a bajas concentraciones (2, 5).

Por otro lado, los R-S• pueden reaccionar con O<sub>2</sub> para formar radical tioperoxilo (R-SOO•; Figura 1 reacción k). También pueden reaccionar con óxido nítrico (•NO) para dar S-nitrosotioles (R-SNO; Figura 1 reacción l), o con radical sulfanilo (HS•) y rendir persulfuros (R-SSH; Figura 1 reacción m). Las subsecuentes especies radicalarias derivadas del R-S• pueden seguir reaccionando con otros oxidantes por uno y dos electrones. Todas estas reacciones radicalarias son muy rápidas, presentando constantes cinéticas de segundo orden en el rango de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (2, 5).

### 1.1.3 Importancia de los tioles en proteínas

Los tioles en proteínas cumplen importantes y variadas funciones. Pueden estabilizar la estructura de proteínas mediante enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares, actuar como sitios de prenilación y palmitoilación, formar dominios de unión de metales, participar en la catálisis enzimática; ya sea formando centros redox en sitios activos o actuando como nucleófilos. Además, cumplen un rol crucial en vías de señalización redox, ya sea como proteínas transductoras de señales o como factores de transcripción que se unen al ADN en respuesta a cambios en los niveles de especies oxidantes. A su vez, los tioles son blancos preferenciales de compuestos oxidantes, tanto endógenos como exógenos, protegiendo proteínas, lípidos y ADN del daño oxidativo (2, 4, 5, 9, 13).

La relevancia biológica de los tioles se pone de manifiesto, también, a la luz de la evolución. Los residuos de cisteína están ~90% conservados entre proteínas homólogas, perteneciendo a los cuatro aminoácidos más conservados (junto con glicina, prolina y triptófano), lo cual enfatiza una fuerte presión selectiva para conservar las cisteínas en sitios clave. En contraste con los demás aminoácidos, se ha visto que la cantidad de cisteínas en proteínas aumenta con la complejidad de los organismos; en eucariotas, el ~90% de las proteínas contiene al menos un residuo de cisteína. Si bien no está del todo claro, esto puede atribuirse a un aumento de las proteínas no citosólicas con enlaces disulfuro estructurales, así como a un aumento en las proteínas con funciones de transducción de señales redox (4).

## 1.2 Selenocisteína

### 1.2.1 Breve historia

La selenocisteína (Sec o U) es el aminoácido 21. En 1954, Jane Pinsent fue la primera en reportar que el selenio era esencial para la actividad enzimática de la formiato deshidrogenasa de *E. coli* (14). En 1976, estudios sobre el complejo enzimático glicina reductasa de *Clostridium sticklandii* marcado con  $^{75}\text{Se}$ , revelaron por primera vez, la presencia de un residuo aminoacídico con selenio unido covalentemente (15). En 1984, se hizo la primera secuenciación aminoacídica de una selenoproteína (glutación peroxidasa bovina) por la técnica de degradación de Edman (16). Finalmente, en 1986 se descubrió que el residuo de Sec de una glutación peroxidasa de ratón, es codificado por el codón UGA, naturalmente usado como señal de terminación de la traducción (17). Casi en paralelo, se observó lo mismo para el residuo de Sec de la formiato deshidrogenasa de *E. coli* (18, 19). En los años siguientes se ha ido dilucidando la maquinaria de incorporación co-traduccional de Sec en bacterias (20, 21) y eucariotas (22), aunque aún queda mucho por descubrir de este interesante proceso.

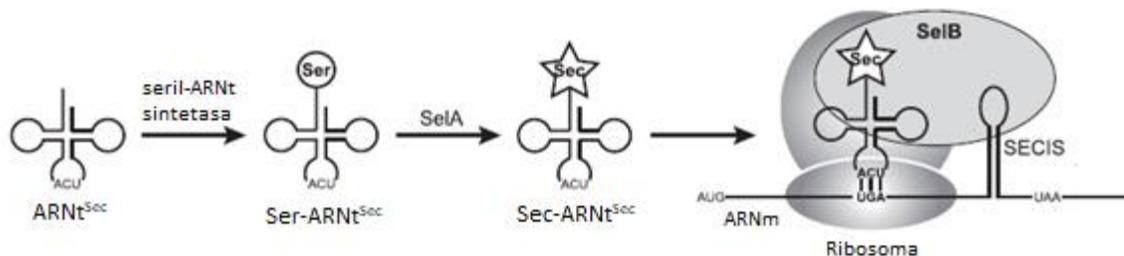
### 1.2.2 Incorporación de selenocisteína en proteínas

La reinterpretación del codón de terminación UGA por la maquinaria traduccional requiere de un elemento en el ARN mensajero (ARNm) de las selenoproteínas llamado SECIS (del inglés, *Selenocysteine Insertion Sequence*). Este se pliega en forma de horquilla por complementariedad de bases y actúa como sitio de unión de proteínas involucradas en la reinterpretación del codón UGA, como la proteína SelB (del inglés, *Selenocysteine-specific elongation factor B*) en bacterias (Figura 2) y eEFSec (del inglés, *eukaryotic Elongation Factor Selenocysteine*) en eucariotas. En bacterias, el SECIS se encuentra inmediatamente corriente abajo del codón UGA, mientras que en arqueas y eucariotas se encuentra en la región 3' no traducida (3' UTR; del inglés *3' Untranslated Region*) y puede estar hasta ~3000 bases de distancia del codón UGA. Para una selenoproteína dada, el elemento SECIS suele estar conservado entre especies, pero los SECIS entre distintas selenoproteínas están poco conservados (23, 24).

En cuanto al ARN transferencia (ARNt) que transporta a la Sec al ribosoma, existe un ARNt<sup>Sec</sup> que tiene una estructura especializada, y es cargado inicialmente con un residuo de serina por una seril-ARNt sintetasa. Hasta el momento no hay reportes acerca de la existencia de una aminoacil-ARNt sintetasa para Sec, en ninguno de los tres dominios de la vida (24). En bacterias, el intermediario Ser-ARNt<sup>Sec</sup> es transformado a Sec-ARNt<sup>Sec</sup> por el complejo homodecamérico SelA (selenocisteína sintetasa) (25). En arqueas y eucariotas hay un paso previo de fosforilación de la Ser del intermediario Ser-ARNt<sup>Sec</sup>, catalizado por la enzima

PSTK (del inglés, *phosphoseryl-tRNA kinase*), rindiendo O-fosfoseril-ARNt<sup>Sec</sup>. Este es sustrato de la enzima homotetramérica SepSecS (O-fosfoseril-ARNt<sup>Sec</sup>:selenocisteinil-ARNt<sup>Sec</sup> sintasa), dando finalmente Sec-ARNt<sup>Sec</sup> (22). Tanto Sela en bacterias, como SepSecS en arqueas y eucariotas, son enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP) y utilizan selenofosfato como dador de selenio, provisto por SelD (una selenofosfato sintetasa) (22, 24, 25).

En bacterias, SelB unido al ARNm interactúa con el ribosoma y el Sec-ARNt<sup>Sec</sup>, orquestando la reinterpretación del codón UGA y la incorporación de Sec en el polipéptido naciente (Figura 2) (26). En eucariotas el mecanismo es más complejo, involucra más proteínas y aún no se comprende totalmente (24).



**Figura 2. Mecanismo de incorporación de Sec en bacterias.** Se ilustra la síntesis del Sec-ARNt<sup>Sec</sup> en dos pasos enzimáticos y el ensamblaje del ribosoma en el SECIS mediado por SelB. Adaptado de (27).

### 1.2.3 Selenocisteína en comparación con cisteína

Teniendo en cuenta lo dicho hasta ahora sobre el intrincado mecanismo de incorporación de Sec en proteínas, es válido preguntarse qué ventajas presenta este residuo en comparación con Cys, su análogo azufrado, que justifiquen el mantenimiento de la maquinaria de inserción de Sec en los tres dominios de la vida.

A nivel atómico, el Se y el S difieren poco en casi todas sus propiedades; radio atómico, distancias de enlaces dicalcogeno y carbono-calcogeno, afinidad electrónica, electronegatividad, entre otras. Sin embargo, la contribución combinada de estas pequeñas diferencias hacen al átomo de Se más polarizable que el S, lo cual está relacionado con una mayor nucleofilia de la Sec, en comparación con Cys (28). En acuerdo con esto, se ha reportado que la constante cinética de segundo orden ( $k$ ) para el intercambio selenol/diselenuro, utilizando el par selenocisteamina/selenocistamina ( $k = 1.65 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), es cinco órdenes de magnitud mayor que para el par análogo azufrado cisteamina/cistamina ( $k = 68.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (29).

Como se mencionó antes, el  $pK_a^{S-H}$  de la Cys libre es  $\sim 8.4$ , por lo tanto, a pH fisiológico solo el  $\sim 1\%$  estará como  $R-S^-$ . En cambio, el  $pK_a^{Se-H}$  de la Sec libre es  $\sim 5.2$ , entonces, a dicho pH

el selenol (R–SeH) estará ~99% desprotonado en selenolato (R–Se<sup>-</sup>), que es la especie reactiva (28, 30, 31). La diferencia de pK<sub>a</sub> también favorece a la Sec en términos de sus propiedades como grupo saliente a pH fisiológico, ya que puede acomodar mejor la carga negativa sobre el Se. Así, la Sec combina dos propiedades importantes para un buen nucleófilo: mayor disponibilidad y ser buen grupo saliente (32).

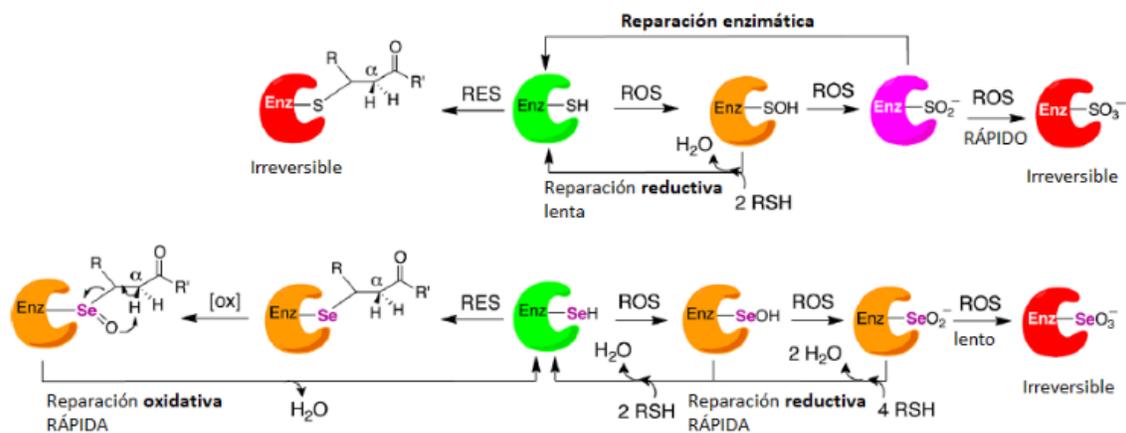
Pero si bien el R–Se<sup>-</sup> es más nucleofílico, está en mayor proporción a pH fisiológico y es mejor grupo saliente que el tiolato de la Cys, existe evidencia de que la principal ventaja químico-enzimática del residuo de Sec es la mayor electrofilia del Se respecto al S (32).

Respecto a los potenciales redox estándar (E<sup>0</sup>), los pares cisteína/cistina (E<sup>0</sup> = -233 mV) y selenocisteína/selenocistina (E<sup>0</sup> = -488 mV), muestran que el segundo par redox es mejor agente reductor por dos electrones, que el primer par redox, debido a su menor E<sup>0</sup> (28, 33).

Otra ventaja que se le atribuye al Se sobre S, surge del modelado computacional de reacciones radicalarias entre ditiotreitól (DTT, esquematizado como [S, S]) y sus análogos monoselenado (SeTT, [S, Se]) y diselenado (DSeT, [Se, Se]) (31, 34). Según cálculos computacionales, mientras que el R–S<sup>•</sup> formado en las especies reaccionantes es capaz de propagarse a carbonos por la abstracción del hidrógeno en el carbono adyacente al azufre, el radical selenilo (R–Se<sup>•</sup>) carece casi por completo de esta habilidad (31, 34). La explicación de esto, sería la barrera termodinámica de 60 kJ/mol en la abstracción de dicho hidrógeno por el R–Se<sup>•</sup> (34).

Finalmente, una importante ventaja a nivel biológico del Se sobre el S sería su mayor resistencia a la oxidación irreversible y al estrés causado por electrófilos endógenos o exógenos (como xenobióticos), también conocido como estrés electrofílico (Figura 3) (32, 35–37). Los R–S<sup>-</sup> y R–Se<sup>-</sup> proteicos pueden oxidarse reversiblemente a R–SOH o ácido selenénico (R–SeOH), o bien sobreoxidarse a R–SO<sub>2</sub>H o ácido selenínico (R–SeO<sub>2</sub>H), respectivamente. Como ya se mencionó antes, la forma R–SO<sub>2</sub>H no puede ser reducida a la forma R–SOH por un tiol de bajo peso molecular, como GSH, debido a que el azufre del grupo R–SO<sub>2</sub>H no es muy electrofílico (35). En cambio, la forma R–SeO<sub>2</sub>H puede reducirse más fácilmente por tioles, debido a la mayor electrofilia del Se. Además, la oxidación de R–SeO<sub>2</sub>H a ácido selenónico (R–SeO<sub>3</sub>H) es generalmente más lenta en comparación con la oxidación del R–SO<sub>2</sub>H a R–SO<sub>3</sub>H, y casi no ocurre (32, 36, 37).

En relación a esto, se propone que los residuos de Sec en proteínas pueden recuperarse rápidamente de la modificación por electrófilos, como acroleína, a través de mecanismos no enzimáticos que involucran la oxidación del átomo de Se y la consecuente eliminación del electrófilo, regenerando la Sec. En cambio, la reacción entre Cys proteicas y acroleína es irreversible (Figura 3) (36).



**Figura 3. Mecanismos de reparación de Sec y Cys en enzimas, que ilustran la ventaja de la Sec.** La enzima activa se muestra en verde. La enzima inactiva que puede repararse por mecanismos no enzimáticos es naranja. El rojo es la enzima inactiva modificada de forma irreversible. El rosado es la enzima inactiva y reparable solo por mecanismos enzimáticos. RES: especies reactivas electrofílicas. ROS: especies reactivas de oxígeno. RSH: tioles. El modelo se basa en la tiorredoxina reductasa de mamíferos como selenoenzima y acroleína como electrófilo. Adaptada de (36).

## 1.3 Sistemas antioxidantes dependientes de tiorredoxina y glutatión

### 1.3.1 Generalidades

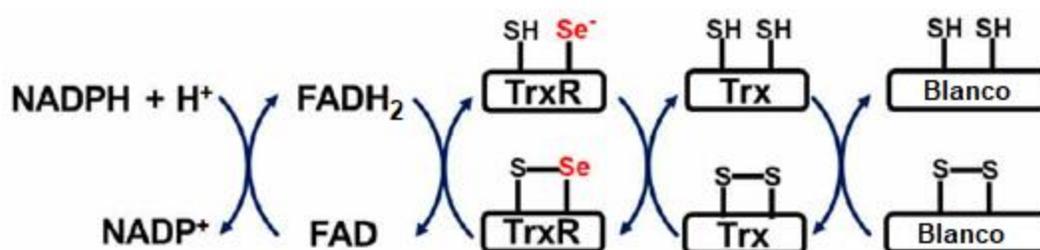
El estado redox de los tioles celulares es controlado, principalmente, por dos grandes sistemas, los sistemas tiorredoxina (Trx) y glutatión. Ambos se encargan de mantener la homeostasis redox a través del reciclaje de Trx o glutatión oxidados (GSSG), para dar sus formas reducidas, las cuales, a su vez, reciclan otros tioles biológicos oxidados por uno o dos electrones. Para esto, el NADPH se encarga de proveer los equivalentes de reducción a Trx o GSH oxidados, vía dos flavoenzimas diferentes, la tiorredoxina reductasa (TR o TrxR) o la glutatión reductasa (GR), respectivamente. Estos sistemas son funcionales en el citosol, núcleo y mitocondria de eucariotas, así como en células procariontas (38, 39).

### 1.3.2 Sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa

Las Trxs son una familia de pequeñas oxidoreductasas que poseen un par ditiol/disulfuro catalítico, mediante el cual proveen equivalentes de reducción a una variedad de enzimas que contienen pares de cisteínas redox activas participando de sus ciclos catalíticos. Entre las enzimas blanco de las Trxs humanas, se destacan la ribonucleótido reductasa (clave en la síntesis de desoxirribonucleótidos), las peroxirredoxinas (Prxs; enzimas antioxidantes) y la metionina sulfóxido reductasa (Msr; involucrada en la reparación de residuos de metionina oxidados). Varios factores de transcripción dependientes de tioles también son

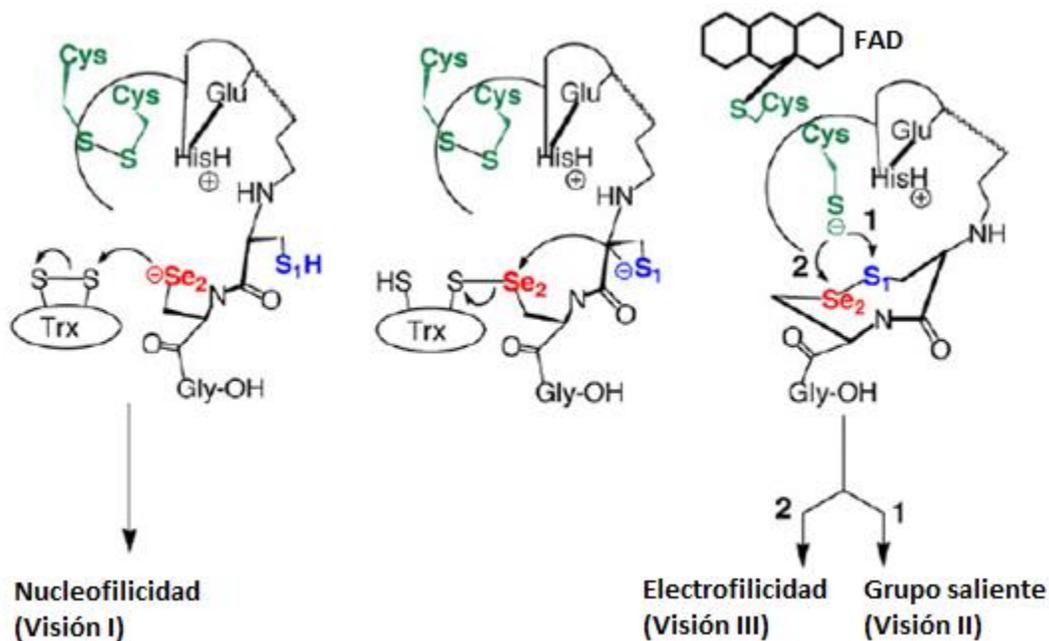
blancos de Trx humanas, como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; regulador de la respuesta inflamatoria), el factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) y el supresor tumoral p53. Tomando esto en conjunto, se resalta la importancia de las Trxs para regular distintas vías de señalización celular, entre ellas, de proliferación y supervivencia celular (40, 41).

La TR cataliza la reducción del disulfuro formado en la Trx oxidada mediante un intercambio selenol/disulfuro, a expensas de NADPH y el grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD; en su forma oxidada, FADH<sub>2</sub> en su forma reducida) (Figura 4). Esta reacción alimenta de Trx reducida el sistema para que continúe funcionando (42). Las TRs de mamíferos son las únicas enzimas que catalizan la reducción de Trx a expensas de NADPH. No obstante, muestran un amplio espectro de sustratos distintos de Trxs, entre ellos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, selenito, hidroperóxidos lipídicos, ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico (DTNB), proteína disulfuro isomerasa (PDI) y formas oxidadas del aminoácido ergotioneína (36, 41, 43–45).



**Figura 4. Ciclo catalítico redox del sistema Trx/TR simplificado.** Los electrones provistos por el NADPH reducen el FAD a FADH<sub>2</sub>, éste reduce un disulfuro redox activo a un ditiol (no se muestra), el cual reduce al selenosulfuro del sitio activo. Los blancos de la Trx suelen ser proteínas con centros redox activos basados en tioles. Adaptado de (41).

En base a estudios estructurales que comparan distintas formas mutantes de la enzima, se propone que el mecanismo de reacción involucra una triada catalítica, entre residuos de Glu/His/Sec. El efecto de la triada estabilizaría el R-Se<sup>-</sup> en la enzima, haciéndolo más nucleofílico (46, 47). Esto es análogo a lo que ocurre en las proteasas de Cys. De esta manera, se proponen distintos roles del residuo de Sec en el mecanismo de reacción (Figura 5). Por un lado, el paso limitante de la reacción de la TR podría ser el ataque nucleofílico del selenolato sobre el disulfuro de la tiorredoxina (visión I). De otra forma, el paso limitante sería la reducción del centro redox GCUG en su forma oxidada. Esta reducción podría ser producto del ataque nucleofílico de otro tiolato de la enzima sobre el S del enlace selenosulfuro, ya que el Se es mejor grupo saliente (visión II), o bien sobre el Se, que sería más electrofílico que el S, en el mismo enlace (visión III) (32).

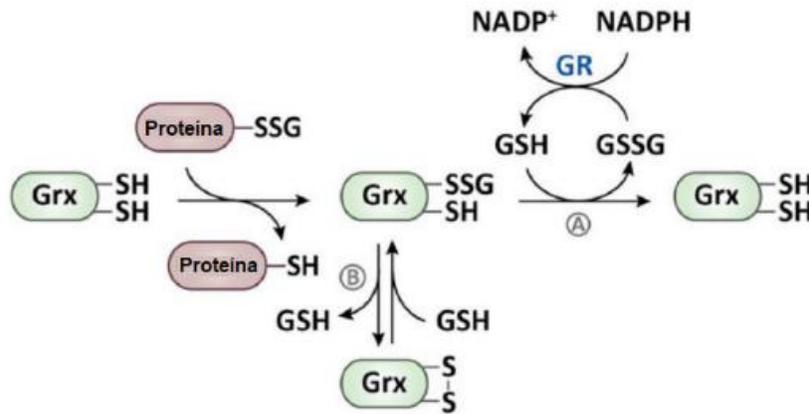


**Figura 5. Distintas visiones sobre el rol de la Sec en el mecanismo de reacción de la TR humana.** Se ejemplifica la reducción del sustrato natural de la TR, la tiorredoxina (Trx). Las Cys en verde forman un disulfuro redox activo que se reduce por FADH<sub>2</sub>. El sitio activo involucra la formación de un selenosulfuro (la Sec se marca en rojo y la Cys en azul). En negro se muestran un Glu y una His que funcionan como triada junto a la Sec para estabilizar el selenolato. Adaptada de (32).

### 1.3.3 Sistema glutatión/glutatión reductasa

El GSH es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos, constituye el principal amortiguador redox basado en tioles, es sustrato en varios procesos antioxidantes y actúa en las vías de detoxificación de xenobióticos. Por ejemplo, es sustrato de las glutatión peroxidasas (GPxs); selenoenzimas encargadas de catalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos u orgánicos a agua y sus respectivos alcoholes, protegiendo a la célula del daño oxidativo (38).

Las glutarredoxinas (Grxs) son una familia de pequeñas oxidoreductasas parecidas a las Trxs, generalmente conocidas por catalizar la reducción de disulfuros mixtos formados entre GSH y tioles proteicos (R-SSG) a expensas de GSH (Figura 6). Por otro lado, el GSH sustenta la regeneración no enzimática de  $\alpha$ -tocoferol, una forma de la vitamina E, que previene la peroxidación de lípidos en las membranas celulares. También es sustrato de las glutatión transferasas (GSTs), encargadas de la detoxificación de xenobióticos (41, 43, 48). La reducción del GSSG es catalizada por la flavoenzima GR a expensas de NADPH (42, 48).



**Figura 6. Esquema del sistema GSH/GR/Grx.** Las Grxs deglutacionilan proteínas y luego se reducen a expensas de GSH por los mecanismos A o B, según si la Grx es monotiólica o ditiólica, respectivamente. El GSSG formado en su reducción es sustrato de la GR, que lo convierte en GSH a expensas de NADPH. Tomada de (4).

## 1.4 Echinococcus granulosus

### 1.4.1 Generalidades y patologías asociadas

Los Plelmintos son un filo de animales invertebrados que incluye dos clases principales de gusanos parásitos vinculados a patologías en humanos: los tremátodos y los céstodos. Dentro de los céstodos, el gusano plano *Echinococcus granulosus* es el agente causante de la hidatidosis. Tiene un complejo ciclo de vida mediado por al menos dos hospederos mamíferos; uno intermediario y uno final (Figura 7). Los intermediarios suelen ser animales ungulados, es decir, mamíferos que tienen pezuñas en sus patas, como ovejas, vacas y cerdos. Los hospederos definitivos son los perros (*Canis lupus familiaris*) y de forma accidental los humanos, que actúan como hospederos sin salida porque cortan el ciclo de vida del parásito, impidiendo su transmisión, pero provocando la hidatidosis (49, 50).

Los hospederos intermediarios se infectan por la ingesta accidental de alimentos o agua contaminada con huevos, que contienen el primer estadio de la larva, llamado oncósfera. Una vez en el estómago, la oncósfera se libera del huevo y se activa por las secreciones del estómago e intestino del animal. En este momento, se activa un conjunto de ganchos que fijan la oncósfera al epitelio intestinal y se liberan glándulas de penetración que lisan de manera localizada el intestino, permitiendo que la larva ingrese al tejido debajo de la mucosa intestinal. Así, alcanza un capilar sanguíneo, el cual penetra y pasa a transportarse por el sistema sanguíneo hacia el hígado, principalmente, donde la larva comienza su metamorfosis al siguiente estadio, llamado metacéstodo (50, 51).

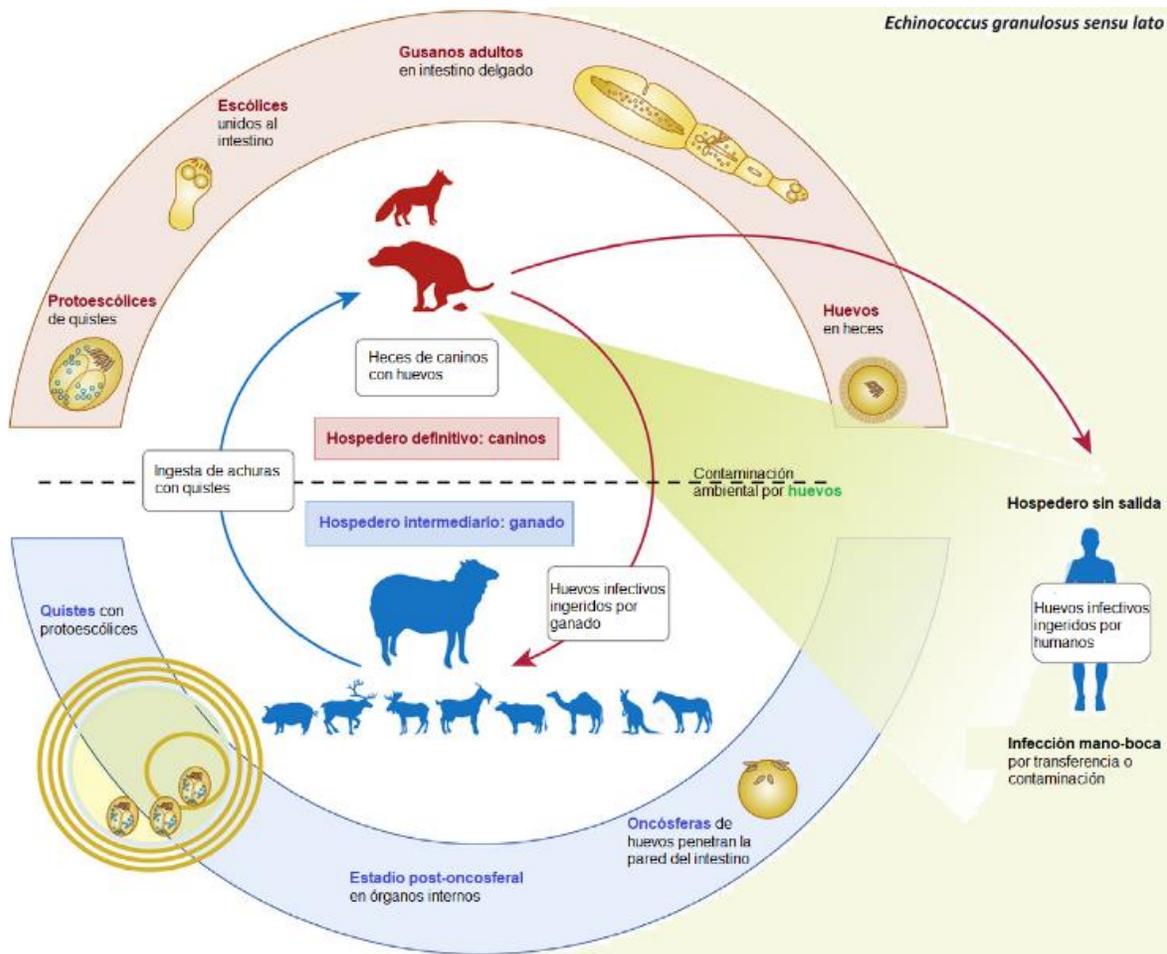


Figura 7. Ciclo de vida de *E. granulosus*. Tomado y traducido de (49).

En *E. granulosus*, el metacéstodo consiste en una vesícula llena de fluido, el fluido hidático, con una capa de células, la capa germinal, que forma engrosamientos que se invaginan en la vesícula, formando cápsulas donde se desarrollan los protoescolices. Estos, constituyen la forma infectiva del hospedero definitivo, el perro, al cual ingresan por ingestión de presas o bien de achuras crudas de ganado. La activación de los protoescolices a escolices hace que éstos últimos se adhieran al intestino del perro y se desarrollen finalmente a su etapa adulta de gusano, que por reproducción sexual genera huevos que se excretan en las heces de los perros. El contacto de los humanos con las heces de los perros infectados es la principal causa de la zoonosis (50, 52).

*E. granulosus* abarca un complejo de especies con distintos genotipos de relevancia biológica, también conocidas como cepas. Es común referirse a todas las cepas de *E. granulosus* como *E. granulosus* "sensu lato", del latín "en amplio sentido". Un análisis del genoma completo, obtenido a partir de un único quiste hidático, reveló que el parásito no

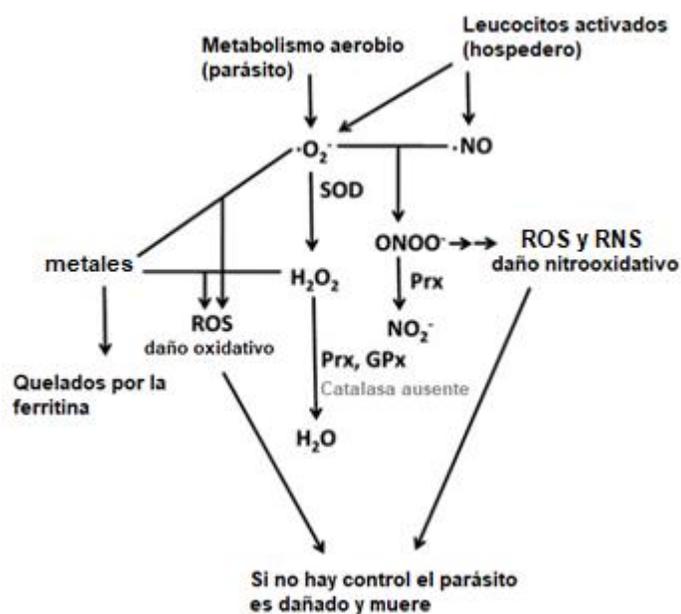
puede sintetizar *de novo* purinas, pirimidinas, colesterol ni la mayoría de los aminoácidos, enfatizando la dependencia con el hospedero (53).

En la hidatidosis, el período inicial de incubación puede durar más de 5 años, estableciéndose enfermedades crónicas que devienen en tratamientos costosos que incluyen cirugías y quimioterapia (54). Según la OMS, hay más de 1 millón de personas infectadas por *E. granulosus* en el mundo. Se calcula que la suma de los costos anuales del tratamiento de la hidatidosis y las pérdidas para la industria ganadera asciende a US\$ 3 billones<sup>1</sup>.

En el caso de la incidencia de hidatidosis en Uruguay, en el período de 1962-1971 (55) se detectaron aproximadamente 550 casos por año en humanos. Los resultados del programa de prevención durante el período 2008-2013 (52) mostraron una marcada, ya que se detectaron 53 casos por año, resaltando la importancia que tiene poner el foco en todos los hospederos involucrados y no solamente en los humanos.

### 1.4.2 Homeostasis redox

Los parásitos helmintos son excelentes modelos biológicos para el estudio de vías involucradas en la homeostasis redox, ya que están sometidos al estrés oxidativo de su propio metabolismo y el de la respuesta inmune de su hospedero (Figura 8) (57). En humanos, la infección por parásitos helmintos activa una respuesta inmune de tipo 2; actúan en el sitio de infección granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos que se diferencian en macrófagos M1 y M2, y mastocitos. Los granulocitos liberan gránulos con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que afectan la integridad de proteínas, lípidos de



**Figura 8. Esquema simplificado de los agentes oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante en *E. granulosus*.** Adaptado de (56).

<sup>1</sup> <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>

membrana, carbohidratos y ADN, por mecanismos radicalares y no radicalares, comprometiendo la vida del parásito (58).

En un reciente estudio se evaluó la respuesta contra el estrés oxidativo en *E. granulosus* utilizando un abordaje proteómico. Brevemente, los autores crecieron *in vitro* protoescolices en ausencia o presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante, extrajeron todas las proteínas y las analizaron por HPLC–MS/MS. Los resultados mostraron que la respuesta al estrés oxidativo es muy diversa e involucra proteínas vinculadas a: 1) la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y xenobióticos, 2) la adaptación a cambios en la osmolaridad, 3) el proceso de apoptosis, 4) el plegamiento de proteínas y 5) su recambio por el proteasoma (59).

En las fases larvaria y de gusano adulto, el mecanismo de defensa antioxidante mejor caracterizado es el sistema Trx y GSH (57, 60). En contraste con el ser humano, donde estos sistemas se presentan por separado y en redundancia, en *E. granulosus* el sistema se encuentra ligado por la tiorredoxina glutatión reductasa (*EgTGR*), siendo esta enzima un cuello de botella para la detoxificación, homeostasis redox y síntesis de desoxirribonucleótidos (dNTPs). En este sentido, el parásito carece de TR, GR y de catalasa (enzima encargada de detoxificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>), pero cuenta con superóxido dismutasas (SOD), Prx, GPx, ferritina y la *EgTGR* recién mencionada (Figura 8) (56, 61).

## 1.5 Tiorredoxina glutatión reductasa de *Echinococcus granulosus* (*EgTGR*)

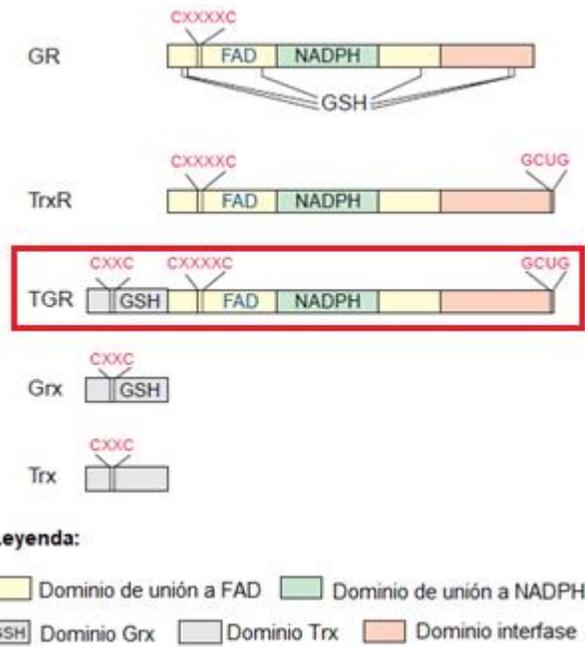
### 1.5.1 Gen *EgTGR*

El gen de la *EgTGR* sufre splicing alternativo, dando lugar a dos transcritos primarios que se traducen en las isoformas de *EgTGR* citosólica y mitocondrial. El transcrito primario de la variante mitocondrial conserva el exón 1, mientras que el de la variante citosólica se saltea dicho exón. La isoforma mitocondrial es procesada por complejos de proteasas mitocondriales que escinden el péptido señal responsable de dirigir la *EgTGR* a este organelo. En consecuencia, ambas isoformas difieren en un único residuo de alanina extra, presente en el extremo N-terminal de la variante mitocondrial (62).

El gen TGR está bien conservado entre distintas especies de platelmintos, como *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*. Todas las secuencias comparten un 95% de identidad a nivel nucleotídico y un 98% a nivel aminoacídico. Los ARNm tienen un elemento SECIS en la región 3' UTR, indicando que todas las TGR tienen un residuo de Sec. También conservan dominios tipo Grx y tipo TR, con varios centros redox activos (63).

### 1.5.2 Estructura, función y enzimología de la *EgTGR*

Esta flavoenzima homodimérica pertenece a la familia piridín-nucleótido disulfuro oxidoreductasa, la cual incluye, además de la TGR, a la GR y a la TR. Las tres enzimas comparten: *i*) un centro redox CX<sub>4</sub>C próximo al extremo N-terminal, *ii*) un dominio de unión a FAD, *iii*) un dominio de unión a NADPH y *iv*) un dominio de interfase entre dos monómeros. Además, TR y TGR contienen *v*) un centro redox extra, ubicado en el extremo C-terminal, cuya secuencia aminoacídica es GCUG, donde U es el residuo de Sec. Particularmente, la TGR es una fusión natural entre una TR y una Grx, con un peso molecular de ~65 kDa por monómero (Figura 9) (57).



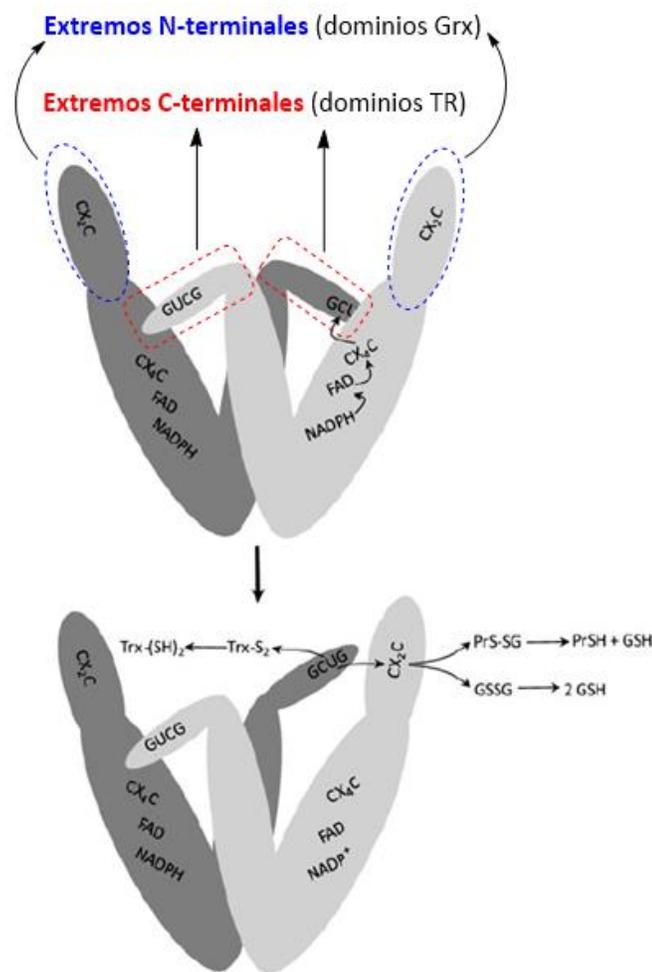
**Figura 9. Esquema de las estructuras primarias de GR, TR (TrxR), TGR, Grx y Trx.** Adaptada de (57).

Cada monómero de TGR conserva las cinco características enumeradas anteriormente sumadas a otro centro redox activo CX<sub>2</sub>C en el extremo N-terminal, muy conservado en las Grx (Figura 9) (56, 57, 64). Por lo antes mencionado, basado en estudios bioquímicos, las TGRs de varios platelmintos poseen actividades TR, GR y Grx (60–62, 65–69).

Mediante estudios estructurales por cristalografía de rayos X y modelado *in silico*, se determinó que los monómeros de la TGR se orientan cabeza-cola, con forma de “W” (Figura 10). La interfase entre los monómeros (la “Λ”), se da a nivel de los dominios TR, mientras que los dominios Grx se ubican en los extremos más alejados de la “W”, sin contactarse. En la interfase se extienden dos extremos C-terminales de 16 aminoácidos (uno por monómero) que incluyen los centros redox GCUG de los módulos TR. Hay proximidad espacial entre el centro GCUG C-terminal de un monómero y el centro redox CX<sub>2</sub>C N-terminal del módulo Grx del segundo monómero, lo cual es importante para la actividad Grx (70, 71).

Dado que el extremo C-terminal que contiene el centro redox GCUG no ha podido ser resuelto en la estructura cristalográfica de *SmTGR* (72) ni de *EgTGR* (71), se propone que debe tener una alta movilidad, dependiendo de si el par Cys/Sec está oxidado o reducido. No obstante, en un reciente estudio se logró cristalizar la TGR del nemátodo *Brugia malayi* incluyendo el residuo de Sec (PDB: 7POX). En este caso, uno de los extremos C-terminales del homodímero quedó inmovilizado en el cristal, permitiendo resolver la estructura (73).

El modelo de reacción propuesto para la *EgTGR*, basado en su estructura (71, 72, 74) y estudios bioquímicos (60–62, 65), involucra el flujo de dos electrones en forma de hidruro ( $H^-$ ) desde el NADPH al FAD, luego del  $FADH_2$  al centro redox  $CX_4C$  oxidado como disulfuro, y desde su forma ditiol reducida, al centro redox GCUG oxidado como selenosulfuro en el extremo C-terminal de la segunda subunidad. Una vez reducido, los electrones del par selenol-tiol pueden seguir dos vías distintas: reducir *EgTrx* oxidada (actividad TR) o reducir el disulfuro del centro redox  $CX_2C$  del dominio Grx N-terminal de la primera subunidad. En el último caso, el par ditiol  $CX_2C$ , puede reducir GSSG a GSH (actividad GR) o bien deglutacionilar proteínas o péptidos, es decir, reducir un disulfuro mixto entre GSH y un tiol proteico (representado como PrS–SG) (Figura 10).



**Figura 10. Modelo del mecanismo de reacción propuesto para la TGR.**  $CX_4C$ ,  $CX_2C$  y GCUG son los centros redox activos. Se muestran las tres posibles actividades enzimáticas: TR (sustrato  $Trx-S_2$ ), GR (sustrato GSSG) y Grx (sustrato proteínas glutationiladas; PrS-SG). Adaptada de (56).

### 1.5.3 Actividad tiorredoxina reductasa: dependencia del módulo TR

Estudios de mutagénesis dirigida llevados a cabo con formas recombinantes de *EgTGR* (61), *SmTGR* (65) y *Fasciola gigantica* TGR (*FgTGR*) (69) muestran la importancia del módulo TR y especialmente del residuo de selenocisteína en la reducción de Trx (sustrato fisiológico) o DTNB (sustrato no fisiológico).

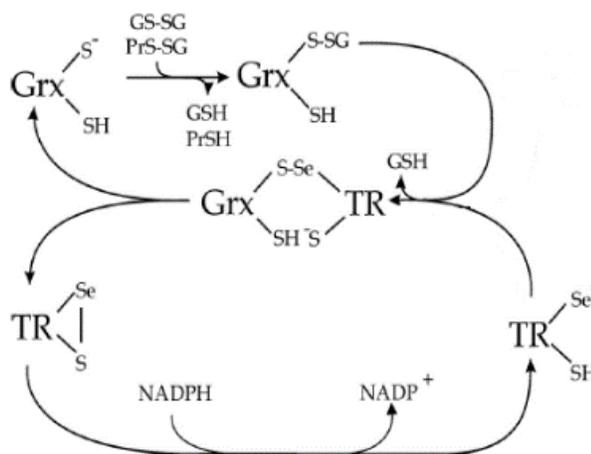
En *E. granulosus* se observó que, tanto la forma completa de la enzima (*EgTGR*) como una forma trunca carente del dominio Grx (*EgTR*), son capaces de catalizar la reacción con NADPH y Trx o DTNB como sustratos. La mutante *EgTGR*<sub>U596C</sub> conserva una mínima actividad TR respecto a la forma salvaje. La constante catalítica ( $k_{cat}$ ) aparente es  $\sim 190$  o  $\sim 250$  veces menor para DTNB o Trx mitocondrial (mtTrx), respectivamente, y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) aparente  $\sim 1.5$  veces mayor para mtTrx como sustrato. Esto se traduce en una pérdida en especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) por la *EgTGR*<sub>U596C</sub> respecto a la forma salvaje con estos sustratos (61).

Relaciones semejantes se vieron en *SmTGR*<sub>U597C</sub> en comparación con la enzima salvaje, acentuando cierta promiscuidad con otros sustratos, como hidróxidos e hidroperóxidos orgánicos (65). Esto muestra que el residuo de Sec es fundamental para la especificidad y eficiencia de la catálisis, aunque no completamente indispensable para la actividad TR *in vitro* (61, 65).

### 1.5.4 Actividades deglutationilasa y glutatión reductasa: dependencia del módulo Grx

El dominio Grx N-terminal de cada monómero en la *EgTGR* le confiere la capacidad de deglutationilar péptidos *in vitro* (61). En la literatura se estudiaron los mecanismos de deglutationilación mediante experimentos con *EgTGR* salvaje, *EgTR*, *EgTGR* trunca en el residuo de selenocisteína y dos versiones mutantes por serina en las cisteínas del centro redox CX<sub>2</sub>C (SX<sub>2</sub>C y CX<sub>2</sub>S). De los resultados surge que los dos centros redox activos GCUG y CX<sub>2</sub>C son indispensables para la deglutationilación de péptidos. Sin embargo, el mecanismo es monotiólico, ya que la versión mutante CX<sub>2</sub>S presentó actividad deglutationilasa (60).

En base a estos resultados, se propone que el mecanismo de deglutationilación implica el ataque nucleofílico de la Cys redox activa del motivo CX<sub>2</sub>C sobre el átomo de azufre del GSH unido al péptido, para formar un intermediario disulfuro mixto representado como Grx-SSG, que posteriormente es resuelto por el residuo de selenocisteína del segundo monómero de la *EgTGR*, dando como resultado un selenosulfuro en el centro redox GCUG, GSH libre y el centro CX<sub>2</sub>C en forma ditiol reducido (Figura 11) (60). Por otro lado, *E. granulosus* es capaz de reducir GSSG a GSH gracias a la actividad GR de la *EgTGR*, que depende, al igual que la actividad deglutationilasa, de los centros redox GCUG y CX<sub>2</sub>C (Figura 11) (60, 61).



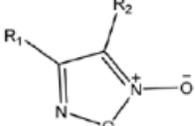
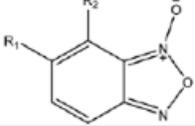
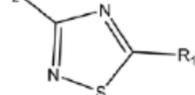
**Figura 11. Mecanismo de reacción de actividades deglutationilasa y GR propuesto para la *EgTGR*.** Nótese que Grx y TR representan los dominios de la *EgTGR* (no son enzimas independientes). GS-SG: glutatiol disulfuro, PrS-SG: proteína glutationilada, GSH: glutatiol, PrSH: proteína deglutationilada. Adaptada de (60).

Ambas actividades enzimáticas dependientes del módulo Grx (glutatiol reductasa y deglutationilasa), exhiben comportamiento histerético en presencia de grandes concentraciones de GSSG en relación a la concentración de *EgTGR*. La histeresis consiste en una reducción inicialmente lenta de GSSG (también llamada fase lag) seguida de un rápido incremento en la velocidad en los cursos primarios. El tiempo de la fase lag puede disminuirse si se disminuye [GSSG], se aumenta [GSH] o se aumenta [*EgTGR*] (60, 61).

### 1.5.5 Inhibidores de la *EgTGR* y TR de mamíferos

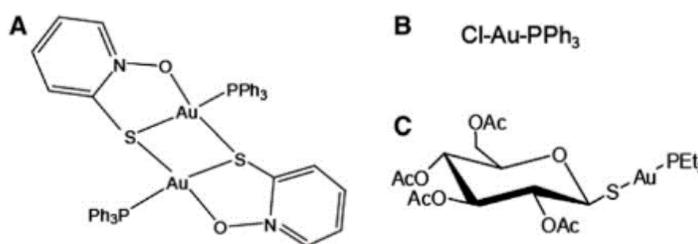
Como ya se mencionó, la *EgTGR* es la única enzima que sostiene los sistemas Trx y GSH en el parásito, ya que el mismo no cuenta con TR o GR convencionales. Por lo tanto, su inhibición desarticula el suministro de equivalentes de reducción para procesos de señalización y regulación redox, como mecanismos antioxidantes (vía GPx y Prx), síntesis de ADN (vía ribonucleótido reductasa), reparación de proteínas (vía metionina-sulfóxido reductasa) y metabolización de xenobióticos (vía GST). Esto lleva a que la *EgTGR* sea un blanco atractivo de fármacos. Además, las tres actividades enzimáticas (reducción de Trx y GSSG, y deglutationilación de péptidos) requieren del centro redox GCUG activo para una catálisis eficiente, lo cual lo convierte en un punto débil de la enzima (56, 75).

Resultados de un cribado de inhibidores de *EgTGR*, muestra derivados de furoxanos, benzofuroxanos y tiadiazoles como potenciales inhibidores de la *EgTGR* recombinante, con actividad parasiticida en cultivos de protoescólices (Figura 12). Estos compuestos inhiben irreversiblemente ambas actividades enzimáticas, uniéndose lentamente a la enzima (76). En relación a la inhibición por furoxanos, se ha propuesto que la misma podría ser dependiente de la liberación de  $\cdot\text{NO}$  por parte de estos compuestos, ya que un dador de  $\cdot\text{NO}$ , NOC-7, mostró ser un buen inhibidor de la *EgTGR* recombinante *in vitro*. No obstante, los cultivos de larvas de *E. granulosus* son poco sensibles a la toxicidad del  $\cdot\text{NO}$  (60).

Estructura general	Familia
	Furoxanos
	Benzofuroxanos
	Tiadiazoles

**Figura 12. Familias de inhibidores de *EgTGR* recombinante con actividad parasiticida.** Los sustituyentes con grupos atrayentes de electrones aumentan la inhibición enzimática y muerte de los parásitos. Tomada de (76).

En otra publicación, se evaluó la cinética de inhibición de la *EgTGR* por tres complejos de oro: auranofina, trifenilfosfina de  $\text{Au}^{1+}$  y trifenilfosfina de  $\text{Au}^{1+}$  acomplejado con N-óxido de 2-mercaptopiridina (abreviado  $\text{Au}^{1+}$ -MPO; el MPO actúa como un transportador del átomo de oro) (Figura 13). Los resultados mostraron que el compuesto  $\text{Au}^{1+}$ -MPO inhibe la actividad GR rápidamente, mientras que la inhibición de la actividad TR aumenta con el tiempo de incubación (71).



**Figura 13. Compuestos de oro inhibidores de *EgTGR*.** (A)  $\text{Au}^{1+}$ -MPO, (B) trifenilfosfina de  $\text{Au}^{1+}$  y (C) auranofina. Tomada de (71).

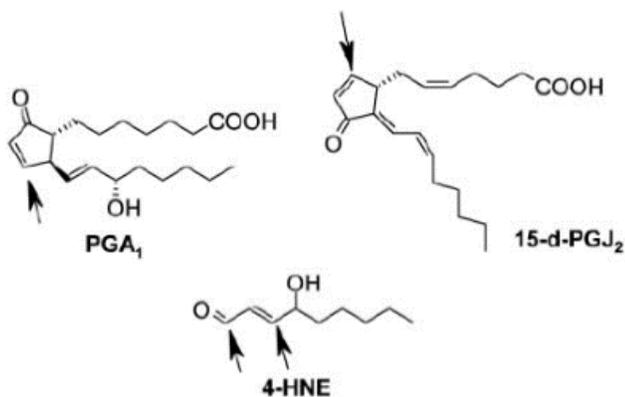
La estructura cristalográfica y el análisis por espectrometría de masas del complejo *EgTGR*- $\text{Au}^{1+}$  reveló que un átomo de Au está coordinado por dos residuos de Cys (C519 y C573) del extremo C-terminal, aunque por ninguna de las dos técnicas se pudo visualizar el motivo redox GCUG. No obstante, se sugiere que C519 y sobre todo C573 colaboran en la catálisis estabilizando el extremo C-terminal, según se visualizó por modelado computacional en base al extremo C-terminal de *SmTGR*. Asimismo, se observó que la inhibición de *EgTGR* por  $\text{Au}^{1+}$ -MPO compromete la viabilidad de larvas y protoescólices de *E. granulosus* (71). Otras

publicaciones destacan la inhibición por compuestos de oro en *FgTGR* (69), *SmTGR* (72), *TcTGR* (67) y también en *EgTGR* (61), haciendo referencia a la posible interacción entre el átomo de oro y el residuo de Sec.

En un trabajo reciente se estudió a la TR1 de rata por espectroscopía de absorción extendida de rayos X de estructura fina (EXAFS, por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica es posible determinar distancias entre átomos, y en efecto, la estructura radial local en torno a un átomo específico. Comparando espectros de muestras de TR1 salvaje reducida u oxidada y las formas mutantes U498C y U498S, incubadas con auranofina, se observó por primera vez que el átomo de Au<sup>1+</sup> de la auranofina se une directamente al átomo de Se del residuo de selenocisteína (77).

Las prostaglandinas A1 (PGA<sub>1</sub>) y 15-desoxi-J2 (15-d-PGJ<sub>2</sub>), y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) son lípidos electrófilos. Poseen un carbonilo α,β-insaturado capaz de sufrir reacciones de Michael reversibles con residuos nucleofílicos de proteínas (Figura 14) (79). Las PGA<sub>1</sub> y 15-d-PGJ<sub>2</sub> interactúan covalentemente

con la TR de mamíferos, posiblemente, alquilando algún tiol (80). Tanto PGA<sub>1</sub>, 15-d-PGJ<sub>2</sub> y 4-HNE inhiben la actividad TR de manera irreversible, dependiente de la dosis del lípido electrófilo y del tiempo de incubación (78, 81). La reacción entre 4-HNE y TR sigue una cinética bifásica, con una primera fase rápida seguida de una fase lenta con vidas medias de ~20 s y ~7 min, respectivamente. El producto de la reacción es la alquilación de los residuos de Sec y Cys del extremo C-terminal, según se apreció por espectrometría de masa (78).



**Figura 14. Estructuras de prostaglandina A1 (PGA<sub>1</sub>), prostaglandina 15-desoxi-J2 (15-d-PGJ<sub>2</sub>) y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE).** Las flechas negras indican los carbonos electrófilos susceptibles a reacciones de Michael con R-S<sup>-</sup>. Tomada de (78).

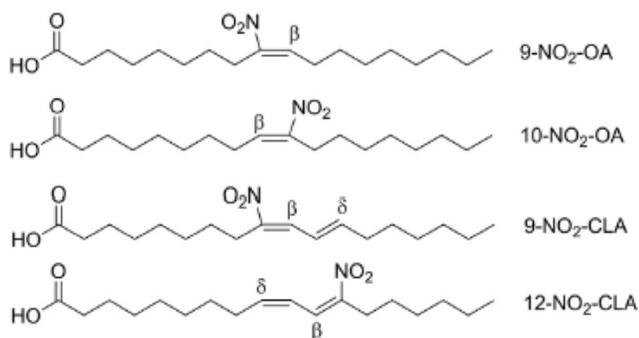
Otra familia de lípidos electrófilos son los nitroalquenos derivados de ácidos grasos. Reaccionan más rápido que las prostaglandinas con tioles proteicos y no proteicos, aunque no se sabe nada de su reacción con selenoenzimas. Actualmente, no existen trabajos donde se hayan probado estos compuestos como inhibidores de TR o TGR. El antecedente más cercano es con una GR (82), que sabemos se parece estructuralmente a la TR y TGR (Figura 9), pero no posee ningún residuo de Sec.

## 1.6 Nitroalquenos derivados de ácidos grasos

### 1.6.1 Formación

Los nitrolípidos o nitroalquenos derivados de ácidos grasos ( $\text{NO}_2$ -FAs, por sus siglas en inglés) tienen un grupo nitro adyacente a una insaturación en la cadena hidrocarbonada (Figura 15) (83). Pueden sintetizarse *in vitro*, con regioselectividad y estereoselectividad (84–86). También se forman *in vivo*, generalmente durante la digestión a partir de sus precursores (87, 88) y en condiciones de inflamación (89), así como pueden ser incorporados directamente en la dieta, generalmente a través de aceite de oliva (90, 91).

Los precursores de la formación de nitrolípidos de mayor relevancia bioquímica son ácidos grasos insaturados, el agente nitrante radical dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) y sus precursores; nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) (92). El producto de la reacción entre  $\cdot\text{NO}_2$  y  $\cdot\text{NO}$ , el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), comunica las vías de nitración (adición de  $\cdot\text{NO}_2$ ) y nitrosilación (adición de  $\cdot\text{NO}$ ) de biomoléculas, lo cual lo convierte en un intermediario relevante en la nitración (93). El nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ) también puede nitrar lípidos insaturados *in vitro* (94), aunque esta reacción es de menor relevancia fisiológica por la inestabilidad del catión en los ambientes hidrofóbicos donde suele ocurrir la nitración (93).



**Figura 15. Estructura de los ácidos nitrooleico ( $\text{NO}_2$ -OA) y nitrolinoleico conjugado ( $\text{NO}_2$ -CLA).** Se muestran los regioisómeros respecto al grupo nitro de mayor abundancia natural. Con letras griegas se indican los carbonos electrofílicos.

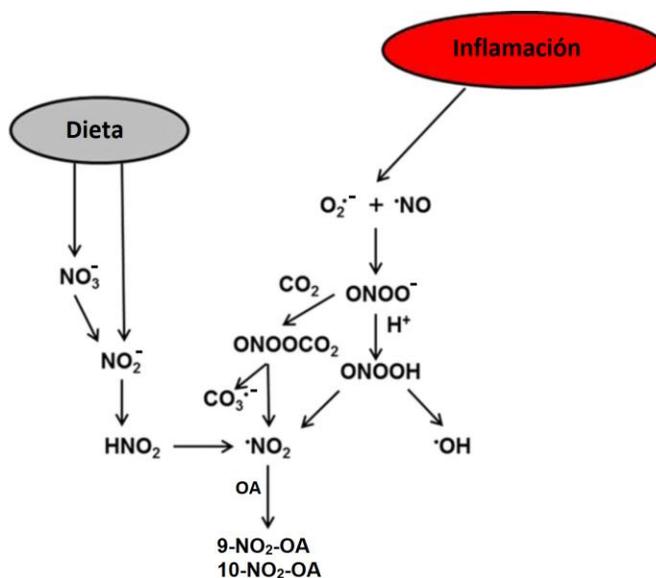
Los ácidos grasos insaturados forman parte de las membranas plasmática y de organelos, de lipoproteínas y alimentos. Son incorporados a través de la dieta y metabolizados a otros lípidos derivados, que ulteriormente pasarán a ser reserva energética, componentes de membranas, cofactores enzimáticos, transportadores de electrones, agentes emulsionantes, pigmentos y mensajeros intracelulares, entre otras funciones (95).

Generalmente, por lípidos insaturados se hace referencia a algún derivado de las series  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 u  $\omega$ -9, cuyos precursores son los ácidos grasos  $\alpha$ -linolénico (ALA), linoleico (LA) y oleico (OA), respectivamente. Estos tres lípidos tienen en común la extensión de su cadena hidrocarbonada de 18 carbonos y se diferencian en la cantidad y ubicación de las insaturaciones, permitiendo la existencia de varios regioisómeros y estereoisómeros. Así,

OA, LA y ALA tienen uno, dos y tres insaturaciones, lo cual se denota 18:1 (OA), 18:2 (LA) y 18:3 (ALA). De estos tres lípidos precursores, solo OA es sintetizado endógenamente en animales, mientras que LA y ALA deben incorporarse en la dieta y son por lo tanto son ácidos grasos esenciales (95).

El  $\text{NO}_2^-$  y el  $\text{NO}_3^-$  se incorporan a la dieta a través del consumo de carnes curadas y vegetales de hojas verdes. Los mamíferos no contamos con enzimas específicas que reduzcan eficientemente  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , pero las bacterias comensales de la cavidad oral, que utilizan  $\text{NO}_3^-$  como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia, sí catalizan dicha reducción. Esto genera una alta concentración de  $\text{NO}_2^-$  en la saliva, que puede protonarse a pH ácido en el estómago dando ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) que luego se puede descomponer en  $\cdot\text{NO}_2$ , el principal agente nitrante antes mencionado (Figura 16) (96).

El producto de la nitración *in vitro* de OA, el ácido nitrooleico ( $\text{NO}_2$ -OA), puede sintetizarse a partir de OA y  $\text{NaNO}_2$  en medio ácido, y detectarse por HPLC-MS/MS (97). A su vez, en condiciones similares al estómago, se pudo nitrar *in vitro* triglicéridos esterificados con OA y ácido linoleico conjugado (CLA) (98). En tanto, la formación de una cantidad significativa de ácido nitrolinoleico conjugado ( $\text{NO}_2$ -CLA) marcado radiactivamente, fue detectada en tejido de estómago de ratas alimentadas con CLA y  $\text{Na}^{[15]\text{N}}\text{O}_2$  (99). Tomados en conjunto, estos resultados apoyan la idea del estómago actuando como un biorreactor donde se da la formación de nitrolípidos (87).



**Figura 16. Vías que llevan a la formación del agente nitrante  $\cdot\text{NO}_2$ .** La microbiota de la cavidad oral y gastrointestinal reduce  $\text{NO}_3^-$  de la dieta a  $\text{NO}_2^-$ , que se protona a pH ácido a  $\text{HNO}_2$ , precursor del  $\cdot\text{NO}_2$ . Los procesos inflamatorios también generan  $\text{ONOO}^-$  de forma local, que se descompone en  $\cdot\text{NO}_2$ , fomentando la nitración de ácidos grasos como el OA. Adaptada de (88).

En condiciones de normoxia (nivel fisiológico de  $\text{O}_2$ ), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) cataliza la formación de  $\cdot\text{NO}$  a partir de L-arginina y  $\text{O}_2$ . Este radical con propiedades vasodilatadoras, tiene una vida media entre 1 y 10 segundos, es pequeño y levemente lipofílico, por eso, difunde a través de micelas, liposomas, membranas y lipoproteínas. En estos ambientes, donde el volumen que ocupan los lípidos es abruptamente menor al

volumen del citosol, se da un aumento local de  $\cdot\text{NO}$  que acelera tanto su autooxidación, es decir, la reacción entre dos moléculas de  $\cdot\text{NO}$ , como su reacción con  $\text{O}_2$ , cuya concentración también aumenta localmente en las membranas. Ambas reacciones forman  $\cdot\text{NO}_2$ , de vida media  $\sim 1 \mu\text{s}$ , que rápidamente puede nitrar u oxidar lípidos insaturados por mecanismos radicalarios (100, 101).

En condiciones patológicas que causan inflamación, aumenta la formación de radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que puede reaccionar con  $\cdot\text{NO}$  con una constante limitada por difusión ( $k \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), formando anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), en equilibrio con ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ,  $\text{pK}_a = 6.8$ ). El  $\text{ONOOH}$  difunde a través de las membranas y se escinde homolíticamente a nivel del enlace peroxo, produciendo  $\cdot\text{NO}_2$  y radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). El  $\text{ONOO}^-$  puede a su vez reaccionar con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para formar nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), cuya ruptura homolítica forma  $\cdot\text{NO}_2$  y radical anión carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) (Figura 16) (102, 103).

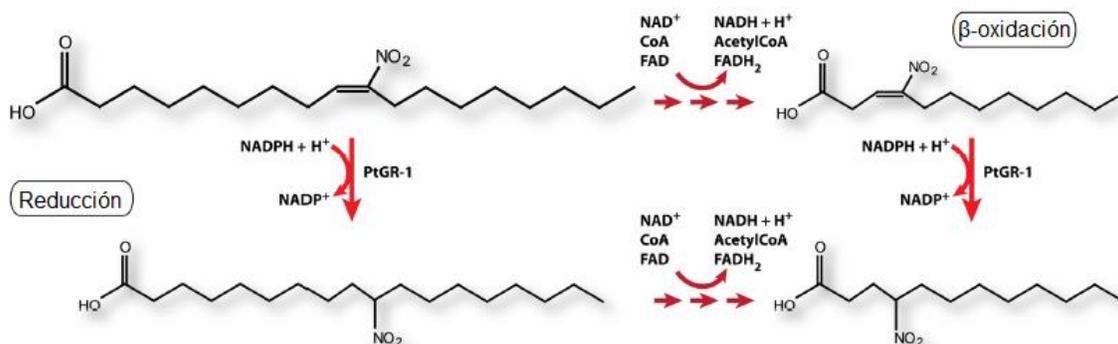
Cuando la tensión de oxígeno alta (ej.: procesos inflamatorios) se favorece la formación de hidroperóxidos lipídicos en liposomas y membranas celulares, vía  $\text{ONOO}^-$  (102). En cambio, cuando la tensión de oxígeno es baja, el  $\cdot\text{NO}$  reacciona rápidamente con radicales alcoxilo ( $\text{LO}\cdot$ ) y peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ) en liposomas, membranas y lipoproteínas, terminando las reacciones radicalarias de propagación en cadena, inhibiendo la peroxidación lipídica (104) y fomentando su nitración por  $\cdot\text{NO}_2$  (105). La capacidad nitrante del  $\text{ONOO}^-$  fue evaluada *in vitro*, infundiendo  $\text{ONOO}^-$  en soluciones micelares de OA. Los lípidos fueron extraídos y analizados por HPLC-MS/MS, detectando  $\text{NO}_2\text{-OA}$  entre los productos finales, utilizando como referencia un estándar de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  marcado radioactivamente (97).

### 1.6.2 Metabolismo y biodistribución del ácido nitrooleico

Las primeras mediciones de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  en plasma estimaron valores en el entorno de  $\sim 900 \text{ nM}$  (97). Sin embargo, gracias a los avances tecnológicos y mejoras en las técnicas de preparación de la muestra, los niveles de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  en plasma humano se redujeron a valores en el rango  $0.3\text{--}0.9 \text{ nM}$ . Las mejoras técnicas también han permitido la cuantificación de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  en otros tejidos y fluidos (106).

Mediante la administración de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  a ratones y utilizando HPLC-MS/MS para el análisis, se logró detectar y caracterizar distintos metabolitos del  $\text{NO}_2\text{-OA}$ . Se mostró la presencia de derivados de hasta 3 ciclos de  $\beta$ -oxidación de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  en sangre, con dos ( $\text{NO}_2\text{-18:2}$ ,  $\text{NO}_2\text{-16:2}$  y  $\text{NO}_2\text{-14:2}$ ), una ( $\text{NO}_2\text{-18:1}$ ,  $\text{NO}_2\text{-16:1}$ ,  $\text{NO}_2\text{-14:1}$  y  $\text{NO}_2\text{-12:1}$ ) o ninguna insaturación ( $\text{NO}_2\text{-18:0}$ ,  $\text{NO}_2\text{-16:0}$ ,  $\text{NO}_2\text{-14:0}$  y  $\text{NO}_2\text{-12:0}$ ) (107).

También se ha visto que, tras la administración de NO<sub>2</sub>-OA en ratones, su concentración en sangre aumenta rápidamente (0–5 min) y luego desciende en dos etapas; una primera etapa rápida (5–15 min), atribuida a su distribución hacia compartimentos extravasculares y su catabolismo por β-oxidación, y una segunda etapa lenta (15–90 min) donde se pierde la insaturación y se eliminan los metabolitos del NO<sub>2</sub>-OA (98, 107, 108). La enzima responsable de reducir el grupo alqueno del NO<sub>2</sub>-OA en ratón y humanos es la prostaglandina reductasa-1 (PtGR-1) (Figura 17). Como productos, se forman el derivado nitrado del ácido esteárico (NO<sub>2</sub>-SA o NO<sub>2</sub>-18:0) y sus subsecuentes metabolitos de uno, dos y tres ciclos de β-oxidación, lo cual modula la acción señalizadora del NO<sub>2</sub>-OA en células (109).



**Figura 17. Esquema de las principales rutas metabólicas del NO<sub>2</sub>-OA.** La β-oxidación es la principal vía catabólica de ácidos grasos, con cada ciclo la cadena hidrocarbonada pierde dos carbonos por la formación de acetyl-CoA. La vía reductiva implica la saturación del NO<sub>2</sub>-OA por la prostaglandina reductasa-1. Esto lleva a la pérdida del carbono electrofílico. Adaptada de (109).

Respecto al transporte, se propone que un mecanismo de transporte sistémico inmediato de NO<sub>2</sub>-OA tras su ingesta, sería a través de la formación de triacilglicéridos (TAGs) y sus productos de lipólisis (DAGs y MAGs). El estereoisómero mayoritario encontrado en TAGs es el (E)-10-NO<sub>2</sub>-OA, esterificado en la posición 2 del glicerol (110). Esto tiene implicancias fisiológicas, en tanto los lípidos esterificados en dicha posición son escindidos por la superfamilia de fosfolipasas A2 (PLA2), que incluye una isoforma citosólica (cPLA2) que se activa en respuesta a señales inflamatorias, vía activación de receptores tipo Toll (TLRs) (111).

Por otro lado, a mayor tiempo o dosis prolongadas, el NO<sub>2</sub>-OA dejaría de transportarse en TAGs (110), para hacerlo unido a la albúmina plasmática (HSA) de forma covalente y no covalente, o como aductos con GSH (107, 112, 113). El nivel de NO<sub>2</sub>-OA libre es mínimo debido a su reacción con tioles (108, 110).

Los principales órganos a los que se distribuyen el NO<sub>2</sub>-OA y sus metabolitos secundarios, son los riñones, el hígado, los tejidos adiposos pardo y blanco, el tejido estomacal y los

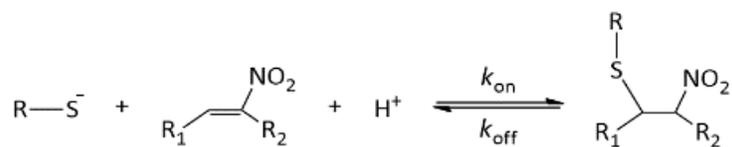
pulmones (108, 114). En el hígado, estos metabolitos aparecen formando aductos con coenzima A, lo cual afirma el ingreso del NO<sub>2</sub>-OA a la mitocondria para la β-oxidación. En conjunto, los resultados llevan a pensar que el catabolismo y distribución del NO<sub>2</sub>-OA no es muy diferente al de cualquier otro lípido (107).

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos y sus metabolitos son exportados fuera de la célula como aductos con GSH a través de transportadores MRP1 (del inglés *Multi-Drug Resistance Protein*) (115, 116). Posteriormente, son procesados por peptidasas renales y eliminados en la orina como aductos con Cys o N-acetilcisteína (NAC) (117–119). En orina humana se detectaron derivados de NO<sub>2</sub>-OA de β-oxidación y ω-carboxilación saturados e insaturados. En ratas se han observado metabolitos conjugados a taurina y sulfatados a nivel de un extremo carboxilo. Se propone que la conjugación a taurina y sulfatación son vías que actúan para eliminar nitroalquenos derivados de ácidos grasos no electrofílicos (como los derivados saturados) (119).

### 1.6.3 Reactividad del ácido nitrooleico con tioles

En el NO<sub>2</sub>-OA, el grupo nitro atrayente de electrones por efectos inductivo y resonante, confiere deficiencia electrónica al carbono β del doble enlace, volviéndolo un centro electrofílico, a través del cual

forma aductos de Michael reversibles con R-S<sup>-</sup>, tales como Cys proteicas (Figura 18). Esta reacción se encuentra en la base de la acción señalizadora de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos (120, 121).



**Figura 18. Esquema de reacción de adición/eliminación de Michael entre el grupo funcional nitroalqueno del NO<sub>2</sub>-OA y un tiolato (R-S<sup>-</sup>).** *k<sub>on</sub>* y *k<sub>off</sub>* representan las constantes cinéticas de la reacción directa y reversa, respectivamente.

La reversibilidad de la reacción de Michael implica una reacción de adición y otra de eliminación, en equilibrio. Para los nitroalquenos derivados de ácidos grasos reaccionando con tioles, el mecanismo de adición se da en dos pasos: primero el ataque nucleofílico (paso limitante) y luego la protonación del intermediario aniónico (122, 123).

Desde la óptica del R-S<sup>-</sup>, su nucleofilia, disponibilidad y capacidad como grupo saliente son propiedades que impactan en las velocidades de adición y eliminación con nitroalquenos. Estas tres variables pueden ser evaluadas en términos del p*K<sub>a</sub>* del tiolato (122, 123).

Desde el lado del nitroalqueno derivado de ácido graso, la concentración micelar crítica (CMC) es una propiedad que afecta su reactividad con tioles en solución acuosa. La

formación de micelas “protege” al nitroalqueno ya que disminuye la disponibilidad de la forma libre en solución (124).

Existen numerosos reportes de reacciones entre NO<sub>2</sub>-OA y distintos tioles no proteicos y proteicos, *in vitro* e *in vivo*, aunque pocos datos cinéticos. Las técnicas más utilizadas para estudiar la cinética de dichas reacciones son espectrofotometría UV-Vis, intercambio cinético isotópico y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS) (82, 107, 113, 117, 123–128). Desde la mecánica cuántica, se han estudiado las energías de los reactivos, algunos estados de transición, intermediarios y productos (112, 123, 129).

La reacción entre GSH ( $pK_a \sim 8.8$ ) y NO<sub>2</sub>-OA a pH 7.4 sigue una cinética monofásica con constantes cinéticas de segundo orden  $k \sim 64$  o  $180 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 25 o 37 °C, respectivamente (123, 124). Los carbonos  $\beta$ -electrofílicos de los regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA son equivalentes en cuanto a su reactividad con GSH, según se evaluó por estudios cinéticos (123–125) y computacionales (112, 129).

La reacción entre Cys ( $pK_a \sim 8.3$ ) y NO<sub>2</sub>-OA a pH 7.4 y 37 °C es más rápida ( $k \sim 270 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) que con GSH ( $k \sim 180 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) debido a la mayor disponibilidad del tiolato (124) y una menor energía del estado de transición con Cys que con GSH (129).

El GSH reacciona entre 140 y 260 veces más rápido con NO<sub>2</sub>-OA que con otros lípidos electrófilos como las prostaglandinas y 4-HNE, pero no tanto más diferente que con 4-oxononanal (4-ONE), lo cual subraya que el grupo carbonilo es un mayor atrayente de electrones que el grupo hidroxilo, pero no tan bueno como el grupo nitro (124).

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos también reaccionan con tioles proteicos. En el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de conejo (GAPDH) se detectaron aductos entre NO<sub>2</sub>-OA y residuos de Cys e His, aunque los últimos se observaron a tiempos de incubación largos entre la enzima y el nitrolípido. Esta modificación post-traduccional también ocurre *in vivo* en glóbulos rojos humanos, llevando a cambios en la hidrofobicidad de la enzima que podrían promover su asociación a membranas (125). Estudios cinéticos posteriores mostraron que la reacción es reversible y tiene constantes  $k_{on} = (389 \pm 64) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{off} = (3.2 \pm 0.9) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , a pH 7.4 y 25 °C (82).

La xantina oxidorreductasa (XOR) reacciona con NO<sub>2</sub>-OA, inhibiéndose su actividad enzimática de forma no competitiva, probablemente por interacción con el cofactor molibdeno (126). La 5-lipooxigenasa (ALOX5) humana es nitroalquilada por NO<sub>2</sub>-OA en una Cys (C418) y dos His (H367 y H372) críticas para la catálisis enzimática, provocando su inhibición (127).

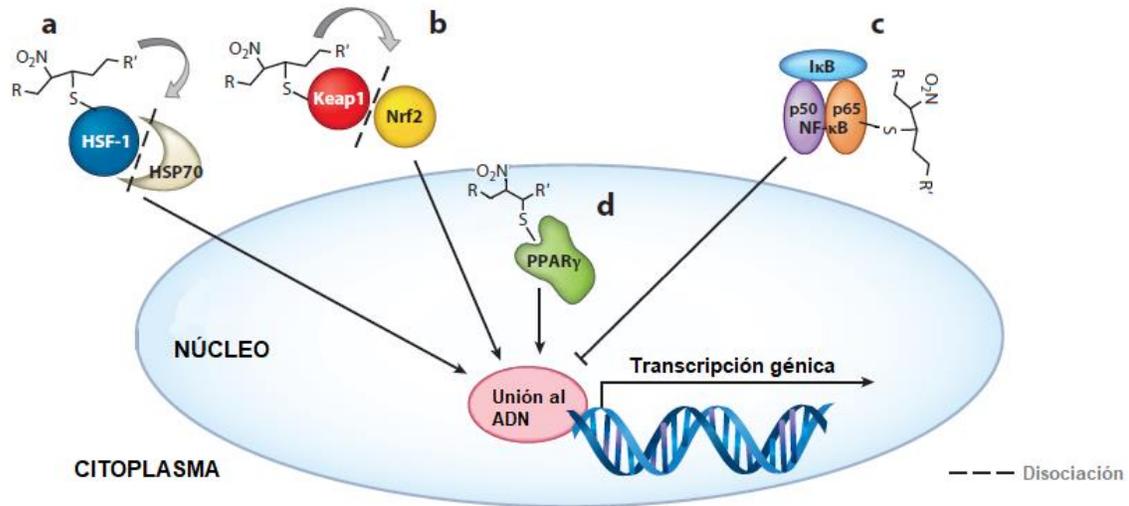
Por otro lado, se vio que la GR de *S. cerevisiae* es inhibida *in vitro* tras la reacción entre NO<sub>2</sub>-OA y el residuo C61. Dicha cisteína es parte del centro redox activo CX<sub>4</sub>C de la enzima y responsable de la reducción de GSSG a GSH. La reacción de Michael sigue una cinética monofásica con constantes directa  $k_{on} = (3.45 \pm 0.04) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y reversa  $k_{off} = (4.4 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , a pH 7.4 y 25 °C (82).

La peroxirredoxina Tsa1 de *S. cerevisiae* también es inhibida por NO<sub>2</sub>-OA, ya que se nitroalquilan la C47 (peroxidática) y C171 (resolutiva), cruciales para la actividad peroxidasa. En conjunto con la detección de NO<sub>2</sub>-OA endógeno en las levaduras, los autores proponen que esta modificación post-traduccional podría modular la actividad peroxidasa y chaperona de Tsa1 en condiciones de shock térmico *in vivo* (130).

#### 1.6.4 Acciones biológicas del ácido nitrooleico

La nitroalquilación proteica a través de reacciones de Michael reversibles, es una modificación post-traduccional que puede alterar la estructura, función y/o la distribución subcelular de la proteína blanco. Algunos ejemplos se mencionaron en la sección anterior. Existe un cuerpo importante de evidencias que indican que el NO<sub>2</sub>-OA modula funciones celulares asociadas a respuestas metabólicas e inflamatorias principalmente a través de la nitroalquilación de residuos de Cys proteicos, muchas veces con respuestas beneficiosas y reversibles (122). Sin embargo, en la literatura no hay información respecto a su reacción con Sec en proteínas y sus consecuencias biológicas.

A nivel molecular, muchas de las funciones anti-inflamatorias del NO<sub>2</sub>-OA se han explicado, principalmente, por su capacidad de formar aductos con factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (del inglés, *Nuclear Factor  $\kappa$ B*), Keap1 (*Kelch-like ECH-associating protein 1*) y HSF-1 (*Heat Shock Factor 1*). Por otra parte, la modulación del metabolismo lipídico y de la glucosa se correlaciona con la condición del nitrolípido de ser ligando activador de la familia de receptores nucleares conocida como PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), especialmente de PPAR $\gamma$  (Figura 19).

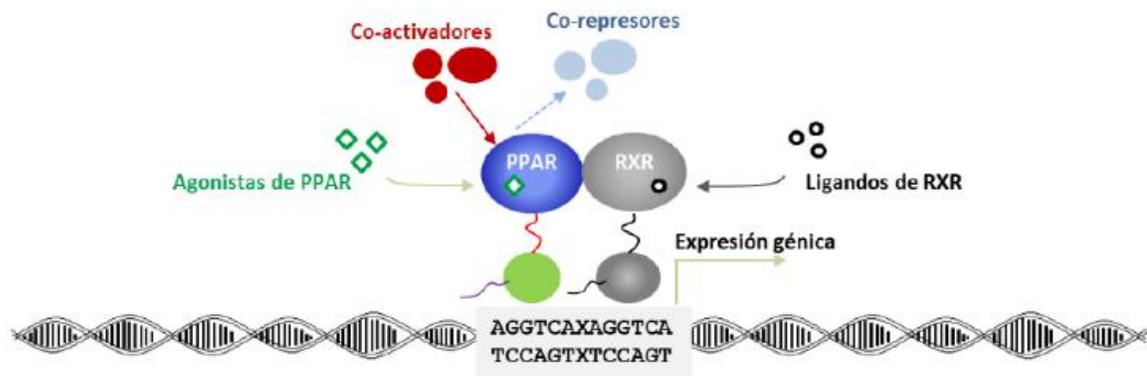


**Figura 19. Principales reguladores de la transcripción génica que son blancos moleculares del NO<sub>2</sub>-OA.** En el citoplasma, el NO<sub>2</sub>-OA puede unirse a: **(A)** HSF-1 y activar la respuesta de shock térmico, **(B)** formar aductos con Keap1 y activar genes de respuesta antioxidante vía Nrf2 o **(C)** unirse a la subunidad p65 de NF-κB, disminuyendo la transcripción de genes de respuesta inflamatoria. En el núcleo, **(D)** el NO<sub>2</sub>-OA se une a PPARγ y actúa como un agonista parcial de sus efectos metabólicos. Adaptada de (120).

#### 1.6.4.1 Activación de PPARγ

PPARγ es una isoforma de PPAR, que se expresa basalmente en tejidos adiposo, cardiovascular y pulmonar, y en macrófagos del sistema inmune innato. Es capaz de regular procesos de diferenciación y metabolismo celulares, en respuesta a estímulos que se transducen vía diversos ligandos de origen lipídico. Estos lípidos interactúan con un bolsillo hidrofóbico en el dominio de unión de ligandos (LBD, por sus siglas en inglés) de PPARγ, principalmente a través de interacciones no covalentes cuando el ligando no es electrofílico. Si el lípido es electrófilo, existe la posibilidad de formación de aductos con un residuo de cisteína (C285) en el LBD (120, 131, 132).

La diversidad de interacciones según los distintos ligandos desencadena cambios conformacionales diferentes donde se reclutan distintos sets de proteínas co-activadoras, o, alternativamente, se disocian proteínas co-represoras, fomentando la unión de PPARγ a elementos en el ADN, llamados PPREs (del inglés, *PPARγ Response Elements*) (Figura 20). Así, PPARγ actúa como un complejo factor de transcripción de genes, asociados sobre todo, al metabolismo de lípidos y glucosa, a respuestas inmunes y diferenciación de macrófagos (120, 131, 132).



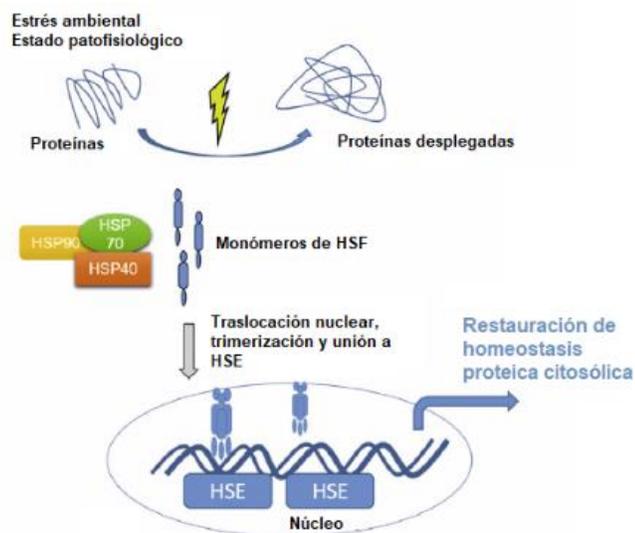
**Figura 20. Activación de PPAR $\gamma$  por agonistas como NO<sub>2</sub>-OA.** PPAR $\gamma$  forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR). La unión de ligandos activadores (agonistas totales o parciales) genera cambios conformacionales que promueven la asociación de proteínas co-activadoras y la disociación de proteínas co-represoras. Esto hace que PPAR $\gamma$  se una al ADN en los PPRES en los promotores de genes blanco para iniciar la transcripción. Adaptada de (132).

El NO<sub>2</sub>-OA aumenta la expresión de PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$  en células eucariotas, aunque en mayor medida de PPAR $\gamma$ , induciendo adipogénesis en células pre-adipocitarias (97). Por otro lado, el NO<sub>2</sub>-OA reacciona con la C285 del LBD formando un aducto reversible de Michael, de modo que el NO<sub>2</sub>-OA funciona como agonista parcial de PPAR $\gamma$  (128). El NO<sub>2</sub>-OA actuando vía PPAR $\gamma$  aumenta la expresión de FABP4 (del inglés, *Fatty Acid Binding Protein 4*), que podría actuar como proteína transportadora intracelular de NO<sub>2</sub>-OA (133).

#### 1.6.4.2 Activación de HSF-1

En humanos, HSF-1 es un factor de transcripción redox activo que regula la transcripción de genes vinculados a la respuesta de shock térmico (HSR), inducida por cambios fisiológicos y/o ambientales de temperatura, pH, estrés oxidativo y condiciones inflamatorias. La respuesta involucra la producción de proteínas chaperonas llamadas HSPs (del inglés, *Heat Shock Proteins*), que, a través de cisteínas redox activas, regulan el plegamiento, tráfico y degradación de proteínas (120, 134).

En condiciones basales, HSF-1 se encuentra en el citoplasma asociada



**Figura 21. Activación de HSR.** En presencia de electrófilos como el NO<sub>2</sub>-OA, se nitroalquilan tioles críticos del complejo inhibitorio HSP70–40–90, que se disocia liberando HSF-1. Estas proteínas trimerizan y traslocan al núcleo uniéndose a HSE en el ADN, activando la expresión de genes que restauran la homeostasis de proteínas citosólicas. Adaptada de (134).

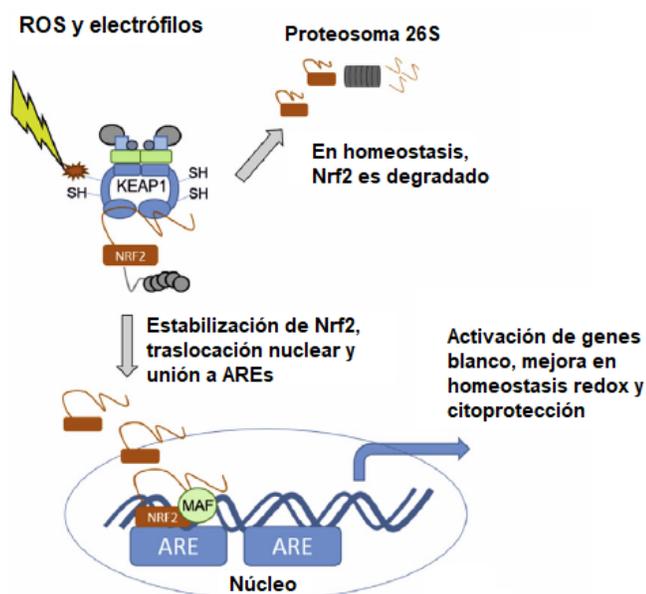
a HSP70, HSP90 y HSP40 formando un complejo inhibitorio. Diversos estímulos, como la oxidación de tioles o la formación de aductos con electrófilos, en residuos de HSP70–90, provocan la liberación de HSF-1, su homotrimerización, fosforilación, traslocación al núcleo y unión al ADN en potenciadores, llamados elementos de shock térmico (HSEs) (Figura 21). Así, se activa la HSR para disminuir la acumulación de proteínas oxidadas y desnaturalizadas incrementando la supervivencia celular (120, 134).

El tratamiento de células con NO<sub>2</sub>-OA aumenta la unión de HSF-1 al ADN activando una respuesta a shock térmico, evaluada por el aumento dosis dependiente en la expresión de tres isoformas de HSP, entre ellas HSP70 (135).

### 1.6.4.3 Activación de Nrf2

La vía de señalización Keap1–Nrf2 (del inglés, *Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2*) regula la respuesta celular a estrés oxidativo y electrofílico, constituyendo un importante mecanismo de desintoxicación y protección de células. Keap1 posee múltiples residuos de cisteína sensibles a electrófilos que, tras la reacción, impulsan cambios conformacionales en Keap1 y liberan a Nrf2 (120, 134).

En homeostasis, Nrf2 es degradado en el proteasoma 26S. En cambio, en condiciones de estrés oxidativo y electrofílico, Nrf2 se transloca entonces al núcleo, donde se une al ADN en elementos ARE (del inglés, *Antioxidant Response Elements*), recluta al resto de la maquinaria transcripcional y activa la transcripción de ~100 genes antioxidantes (Figura 22). Entre ellos, la hemo oxigenasa-1 (HO-1), SOD de Mn, GSTs, NADPH quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), la subunidad reguladora glutamato-cisteína ligasa (GCLM), GPx y sulfirredoxina-1 (Srxn1) (120, 134).



**Figura 22. Activación de vía Nrf2.** En condiciones de estrés electrofílico o presencia de NO<sub>2</sub>-OA, tioles críticos de Keap1 son nitroalquilados, Nrf2 se estabiliza, trasloca al núcleo y se une a AREs en el ADN, junto con la proteína accesoria MAF. Esto activa la transcripción de genes con funciones antioxidantes. Adaptada de (134).

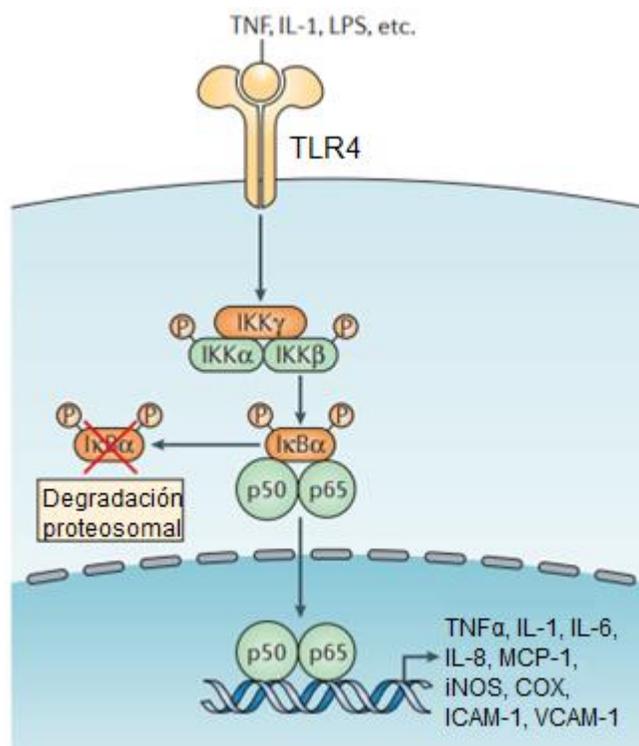
En particular, el NO<sub>2</sub>-OA es capaz de formar aductos con Keap1. Esta proteína posee seis tioles (C38, C226, C257, C273, C288 Y C489) muy susceptibles a nitroalquilarse, siendo los de mayor importancia funcional para la

represión de Nrf2, C273 y C288 (136). En macrófagos, la activación de Nrf2/Keap1 por NO<sub>2</sub>-OA inhibe la captación de LDL oxidada, aumenta el eflujo de colesterol y promueve la autofagia de LDL oxidada. En conjunto, esto podría evitar la formación de placa de ateroma por células espumosas (macrófagos sobrecargados de lípidos modificados) (137).

#### 1.6.4.4 Inhibición de NF-κB

La familia de NF-κB consiste en cinco proteínas de unión al ADN que forman distintos homodímeros y heterodímeros que actúan como factores de transcripción. Están involucrados en respuestas celulares de proliferación, supervivencia y pro-inflamatorias. Es responsable de la producción de citoquinas (TNFα, IL-1, IL-6), quimioquinas (IL-8, MCP-1), enzimas que producen mediadores inflamatorios (iNOS, COX) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1). En la vía clásica de activación, NF-κB consiste en un heterodímero formado por p50 y p65. En homeostasis, NF-κB se expresa de forma basal, pero asociada a una proteína inhibidora (IκB) en el citosol que impide su traslocación al núcleo (120, 131, 138).

Bajo estímulos pro-inflamatorios (por ejemplo, antígenos virales o bacterianos), se activa la quinasa de IκB (IKK) que fosforila IκB, provocando su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. Así, se libera NF-κB, que trasloca libremente al núcleo, donde se une a sus potenciadores en el ADN y activa la transcripción génica. Cuando la acción de NF-κB se bloquea, se producen respuestas antiinflamatorias. Esto puede ocurrir tras la reacción entre electrófilos y cisteínas de p50 y p65, o por la inactivación de IKK corriente arriba (Figura 23) (120, 131, 138).



**Figura 23. Esquema de la activación de NF-κB por ligandos de TLR.** Tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos como el LPS por los TLRs, la enzima IKK fosforila la proteína inhibidora IκB, liberando NF-κB que trasloca al núcleo y desencadena la respuesta inflamatoria. El NO<sub>2</sub>-OA interactúa con la subunidad p65, aboliendo esta respuesta. Adaptada de (138).

En el caso de NO<sub>2</sub>-OA, se ha visto que forma aductos con p65, evitando su unión al ADN. Esto disminuye la producción de citoquinas (IL-6, TNF-α y MCP-1) y moléculas de adhesión

(VCAM-1) en células del sistema inmune (139) y en ratones modelos de lesiones cardíaca (140) y pulmonar (141).

#### 1.6.4.5 Potencial farmacológico en humanos

Como se puede ver, las acciones del NO<sub>2</sub>-OA a través de la nitroalquilación, principalmente de tioles de proteínas blanco, son fenómenos muy estudiados en la literatura. La relevancia de los efectos antiinflamatorios y citoprotectores mencionados anteriormente, se evidencia por el hecho de que el 10-NO<sub>2</sub>-OA fue evaluado como fármaco en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de glomeruloesclerosis focal y segmentaria (*National Clinical Trial Number*, NCT: 03422510), hipertensión arterial pulmonar (NCT: 03449524, 04053543 y 04125745) y actualmente está siendo evaluado para el tratamiento de asma en pacientes obesos (NCT: 03762395).

Entonces, la reacción de tioles con NO<sub>2</sub>-OA está bien documentada, pero con pocos datos cinéticos. Por otro lado, no existe al momento información sobre su reacción con selenoles proteicos. El potencial farmacológico del NO<sub>2</sub>-OA sumado al hecho de que la *EgTGR* es un blanco atractivo de fármacos contra la hidatidosis y que se ha visto que algunas prostaglandinas pueden interactuar con su residuo de Sec, nos motiva a evaluar si el NO<sub>2</sub>-OA también puede tener un efecto sobre esta enzima, a través de la nitroalquilación de la Sec. De esta forma, no solo se podría visualizar al NO<sub>2</sub>-OA como potencial fármaco contra la hidatidosis, sino que también se echaría luz sobre su reactividad con selenoles en proteínas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Estudiar la reacción entre la selenoenzima tiorredoxina reductasa de *Echinococcus granulosus* (*EgTR*, forma trunca de la *EgTGR*) y ácido nitrooleico.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Determinar propiedades fisicoquímicas de interés del NO<sub>2</sub>-OA.
2. Caracterizar la cinética de la reacción entre NO<sub>2</sub>-OA y *EgTR*<sub>wt</sub>.
3. Generar una *EgTR* mutante de Cys por Sec (*EgTR*<sub>U596C</sub>).
4. Evaluar la cinética de la reacción entre NO<sub>2</sub>-OA y *EgTR*<sub>U596C</sub> en comparación con la *EgTR*<sub>wt</sub>.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos

El fosfato de sodio dibásico ( $\text{HNa}_2\text{PO}_4$ ), ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico (DTNB), medio LB, triptona, extracto de levadura, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), cloranfenicol, kanamicina, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), cloruro de potasio (KCl) y fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) fueron adquiridos de Applichem (Darmstadt, Alemania). El fosfato de sodio monobásico ( $\text{H}_2\text{NaPO}_4$ ), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agar, L-cisteína, L-metionina, riboflavina, niacinamida, piridoxina, imidazol, selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), lisozima, DNasa I, aprotinina, pepstatina A, tritón e iodoacetamida (IAM) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). El ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) fue de Acros Organics (Waltham, USA). El sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) fue de J. T. Baker (Radnor, USA). El bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) fue de Honeywell (Charlotte, USA). La tripsina (calidad para proteómica) fue de Promega (Madison, USA). El cloruro de sodio, dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (MeOH) fueron adquiridos de Carlo Erba Reagents (Cornaredo, Italia). Las células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron adquiridas en Invitrogen (Waltham, USA) y hechas quimiocompetentes en el Laboratorio.

El DTNB se preparó en etanol 99%. Las demás soluciones fueron hechas en agua destilada o purificada por ósmosis reversa en un equipo RiOs™.

El stock de  $\text{NO}_2$ -OA puro (aceite) consiste en una mezcla equimolar de los regioisómeros 9- $\text{NO}_2$ -OA y 10- $\text{NO}_2$ -OA sintetizada, purificada y caracterizada en el Laboratorio del Dr. Francisco Schopfer (Departamento de Farmacología y Química Biológica de la Universidad de Pittsburgh, Pensilvania, USA) como se hizo previamente (84). Para manipular el  $\text{NO}_2$ -OA se evitó el uso de material de plástico debido a su adsorción al mismo. La solución madre se preparó disolviendo 0.0072 g de  $\text{NO}_2$ -OA (aceite) en DMSO utilizando material aforado a volumen final 5 mL. La solución madre de  $\text{NO}_2$ -OA, 4.4 mM, se almacenó en viales de vidrio color caramelo a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. Las diluciones de trabajo se prepararon en metanol en el momento de ser usadas y luego se descartaron.

### 3.2 Cálculo del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) del $\text{NO}_2$ -OA por espectrofotometría UV-Vis

A partir de la solución madre de  $\text{NO}_2$ -OA en DMSO almacenada a  $-80^\circ\text{C}$ , se prepararon diluciones de trabajo frescas de  $\text{NO}_2$ -OA en metanol (22, 44, 66, 88 y 110  $\mu\text{M}$ ) o amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4, EDTA 1.0 mM (10.12, 19.80, 29.92, 40.04 y 50.16  $\mu\text{M}$ ). En paralelo, se preparó para cada concentración de  $\text{NO}_2$ -OA ensayada, un blanco de

absorbancia con un volumen de DMSO (vehículo) igual al de NO<sub>2</sub>-OA, en metanol o amortiguador. Los tubos con las diluciones de trabajo y los blancos se termostataron por 5 min en baño de agua a 25 °C. Se obtuvieron espectros UV-Vis (220 – 450 nm) con un espectrofotómetro Cary Varian 50 (Agilent Technologies) en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las líneas de base se realizaron con los respectivos blancos. De los datos de absorbancia en función de [NO<sub>2</sub>-OA] se obtuvieron los coeficientes de absorptividad molar en ambos solventes.

### 3.3 Análisis del stock de NO<sub>2</sub>-OA por HPLC

La muestra se preparó diluyendo el stock madre (mezcla equimolar de regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA en DMSO) a concentración final 44 μM en amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH, 7.4 con acetonitrilo 20% y ácido fórmico 7%. La separación se realizó en un HPLC Agilent 1260 Infinity utilizando una columna Phenomenex Luna C18(2) (10 cm largo, 2.1 mm de diámetro interno y partículas de 5 μm), a un flujo de 0.65 mL/min, usando H<sub>2</sub>O con ácido fórmico 0.1% (fase móvil A) y acetonitrilo con ácido fórmico 0.1% (fase móvil B). La muestra (100 μL) se inyectó con la columna equilibrada con un 20% de fase móvil B y se mantuvo por 0.5 min, seguido de un gradiente hasta 85% de fase móvil B en 13 min. Luego se lavó la columna con 100% de fase móvil B por 5 min. Adicionalmente se inyectó un blanco (100 μL) sin NO<sub>2</sub>-OA para descartar contaminantes del amortiguador y de los solventes.

### 3.4 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del NO<sub>2</sub>-OA por dispersión de luz

A partir de una solución madre de NO<sub>2</sub>-OA en DMSO almacenada a -80 °C, se prepararon diluciones de trabajo frescas de NO<sub>2</sub>-OA (0 – 128 μM) en amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM, filtrado y desgaseado. La solución madre de NO<sub>2</sub>-OA en DMSO se cuantificó en el día por espectrofotometría UV-Vis, a partir de una dilución en metanol utilizando el coeficiente de extinción molar determinado en esta Tesina. En paralelo, para cada dilución de trabajo se preparó un blanco de absorbancia en igual volumen final de amortiguador con un volumen de DMSO (vehículo) igual al de NO<sub>2</sub>-OA. Se registró la dispersión de luz de las diluciones de trabajo ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ ) a 25 °C utilizando un fluorímetro Chronos FD (ISS) y cubetas de cuarzo. Se graficó la intensidad de la luz dispersada en función de la concentración de NO<sub>2</sub>-OA. Se obtuvo la CMC a partir de n = 3 experimentos independientes (142).

## 3.5 Expresión y purificación del módulo tiorredoxina reductasa (*EgTR*) de la tiorredoxina glutatión reductasa de *Echinococcus granulosus* (*EgTGR*)

En esta Tesina se trabajó con una *EgTR*<sub>wt</sub> previamente expresada y purificada en el Laboratorio por alguien más. Aquí se expresó y purificó la *EgTR*<sub>U596C</sub> a partir de un plásmido diseñado en el Laboratorio. Los protocolos de producción de ambas enzimas se tomaron de (61). En el caso de *EgTR*<sub>U596C</sub> el protocolo se adaptó para la expresión de una proteína sin selenocisteína. Se describirá el método utilizado para la *EgTR*<sub>U596C</sub> y se mencionarán las diferencias respecto a la *EgTR*<sub>wt</sub>. Las proteínas se expresaron utilizando plásmidos pET-28a(+) que confieren resistencia a kanamicina, ambas con etiqueta de poli-histidina. El plásmido de *EgTR*<sub>wt</sub> fue donado por la Dra. Mariana Bonilla y el Dr. Gustavo Salinas (Instituto Pasteur de Montevideo), mientras que el plásmido para la expresión de *EgTR*<sub>U596C</sub> fue diseñado para esta Tesina y sintetizado por Genscript (Piscataway, USA).

### 3.5.1 Expresión

Para la expresión de *EgTR*<sub>U596C</sub>, se transformaron células *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes con el plásmido el pET-28a(+) conteniendo la secuencia de la *EgTR*<sub>U596C</sub> clonada entre sitios para las enzimas de restricción BamHI y Sall ([ADN]<sub>final</sub> = 9.81 ng/μL). Las bacterias se transformaron por shock térmico, se plaquearon en LB agar con kanamicina (50 μg/mL) y se crecieron a 37 °C por 16 h. Se seleccionó una colonia aislada, se inocularon 10 mL de LB líquido conteniendo el antibiótico y se dejó crecer a 37 °C por 15 h y agitación a 200 rpm. Se escalaron 10 mL de precultivo a 1.0 L de LB enriquecido (triptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, NaCl 28 mM, KCl 58 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mM) con kanamicina 50 μg/mL, suplementado con cisteína 0.1 g/L y metionina 0.37 g/L a 37 °C por 6 h y agitación a 200 rpm. Al llegar a la fase exponencial tardía ( $Abs_{600\text{ nm}} = 2.2$ ), se inició la inducción de la expresión con IPTG 100 μM, se suplementó el medio con riboflavina 20 μg/mL, niacina 20 μg/mL y piridoxina 20 μg/mL (todas las concentraciones se refieren al volumen final en el medio) y luego se incubó por 24 h a 24 °C y agitación a 200 rpm.

Las células se cosecharon por centrifugación (4420 g por 20 min a 4 °C) y el sedimento bacteriano (15.63 g) se almacenó a -80 °C hasta su purificación.

Para la expresión de *EgTR*<sub>wt</sub> se siguió el mismo protocolo descrito para *EgTR*<sub>U596C</sub>, pero cotransformando con los plásmidos pET-28a(+) con la secuencia de la *EgTR*<sub>wt</sub> ([ADN]<sub>final</sub> = 2.88 ng/μL) y el plásmido pSUABC ([ADN]<sub>final</sub> = 3.01 ng/μL). Este último confiere resistencia a cloranfenicol y tiene la secuencia de los genes *selA*, *selB* y *selC*, lo cual aumenta la síntesis de selenoproteínas (143). El medio de selección contuvo kanamicina (50 μg/mL) y cloranfenicol (38 μg/mL). Se adicionó selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 2.5 μM en dos etapas: en

el medio de escalado (sumado a las vitaminas) y al momento de inducir con IPTG. El resto del protocolo de expresión se mantuvo igual.

### 3.5.2 Purificación

El sedimento bacteriano se resuspendió (30 min a 4 °C) en amortiguador de lisis (fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM, lisozima 1 mg/mL, DNasa 10 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, pepstatina A 5 µM, PMSF 50 µM y tritón 1.0 %) a razón de 5 mL/g de sedimento. La suspensión de bacterias se sonicó por 1 h (pulsos de 2 s con pausas de 3 s a 4 °C), se centrifugó (18900 g por 45 min a 4 °C), se colectó el sobrenadante, se filtró con filtros de 0.22 µm y se conservó a 4 °C.

El sobrenadante se purificó en dos pasos. El primer paso de purificación fue por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) en columna con resina de cobalto TALON® Superflow™ de GE Healthcare (Chicago, USA). Este procedimiento se realizó de manera manual. Se utilizaron tres amortiguadores de fosfato de sodio (50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM) conteniendo distintas concentraciones de imidazol. Se llamó a los amortiguadores, IMAC A (imidazol 10 mM), IMAC B (imidazol 20 mM) e IMAC C (imidazol 250 mM). Se equilibró la columna con amortiguador IMAC A, se sembró el sobrenadante, se lavó con amortiguador IMAC B y se eluyó con amortiguador IMAC C. Para remover el imidazol en la primera producción de *EgTR<sub>U596C</sub>* se hicieron dos pasajes por columnas de desalinización PD-10 rellenas con resina Sephadex G-25 de GE Healthcare (Chicago, USA) utilizando amortiguador sin imidazol (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM). En cambio, en la segunda producción de enzima se hizo una diálisis contra amortiguador fosfato de sodio (50 mM, pH 7.2 y NaCl 150 mM) utilizando membranas de tamaño de poro 14 kDa (18 h a 4 °C con agitación).

El segundo paso de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna preparativa HiLoad 16/60 Superdex 200 de Cytiva (Marlborough, USA) en un equipo ÄKTA Prime Plus de GE Healthcare (Chicago, USA). La columna se calibró utilizando estándares de proteínas globulares a concentración final 1.25 mg/mL en amortiguador SEC (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM). Los estándares fueron tiroglobulina (660 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (160 kDa), conalbúmina (76 kDa) y ribonucleasa A (13.7 kDa). Para la purificación se sembró la muestra con proteína recombinante en la columna previamente equilibrada con amortiguador SEC y se eluyó con el mismo amortiguador, a un flujo de 1.0 mL/min.

En el caso de la *EgTR<sub>wt</sub>*, que ya estaba purificada al inicio de este trabajo, se removió el imidazol en dos pasajes por columnas de desalinización PD-10 rellenas con resina Sephadex

G-25 utilizando amortiguador sin imidazol (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM). Para esta proteína no se realizó SEC.

La pureza de las proteínas recombinantes se analizó por SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol), teñidos con Coomassie. Las fracciones con *EgTR*<sub>U596C</sub> se almacenaron a -80 °C, mientras que las de *EgTR*<sub>wt</sub> se almacenaron a -20 °C.

La concentración de *EgTR*<sub>U596C</sub> se midió por absorbancia a 460 nm correspondiente al FAD oxidado ( $\epsilon = 14600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). En el caso de la *EgTR*<sub>wt</sub> se midió la concentración de FAD y se corrigió por el contenido de selenio en la muestra. Previamente se determinó que en estas condiciones de expresión solo el ~10% de *EgTR*<sub>wt</sub> incorpora Sec (61).

### 3.6 Medidas de actividad tiorredoxina reductasa por ensayo de DTNB

En el ensayo de DTNB (144, 145), las enzimas *EgTR*<sub>wt</sub> y *EgTR*<sub>U596C</sub> se preincubaron con NADPH 50  $\mu\text{M}$  por 10 min a 25 °C para reducir el sitio activo. Luego se mezclaron con DTNB 1.0 mM y NADPH 50  $\mu\text{M}$  en amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4 con EDTA 1.0 mM. Se siguió la formación del producto ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 412 nm ( $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (146, 147), a 25 °C, por 30–180 s, en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 (Agilent Technologies) (61). La estequiometría de la reacción indica que por cada mol de DTNB consumido, se producen dos mol de TNB. A partir de los cursos primarios de absorbancia a 412 nm en función del tiempo se obtuvo la velocidad en condiciones de estado estacionario como la pendiente de la recta en los primeros segundos de reacción (siempre correspondiente a un consumo menor del 10% del reactivo limitante, el NADPH).

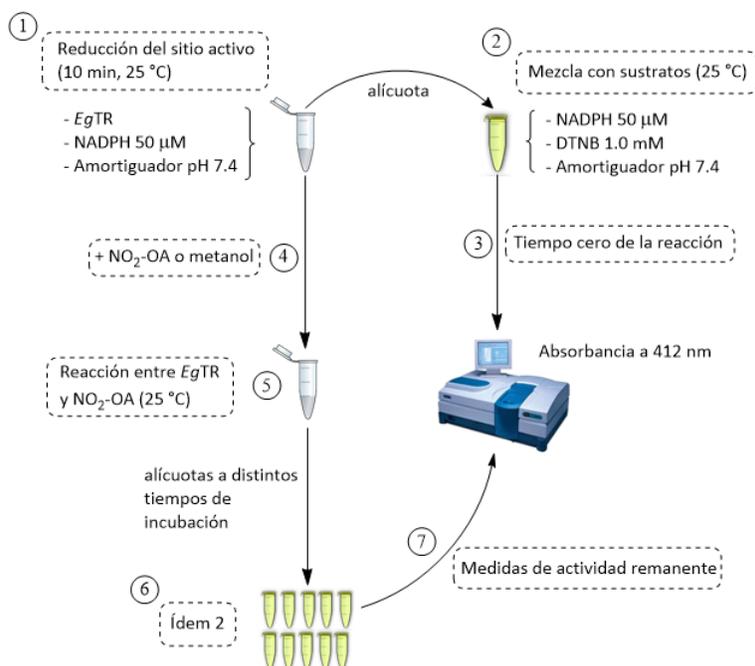
### 3.7 Determinación de constantes catalíticas ( $k_{\text{cat}}$ ) aparentes

Se incubaron concentraciones crecientes de *EgTR*<sub>wt</sub> (1.53 – 7.66 nM) o *EgTR*<sub>U596C</sub> (0.1 – 0.5  $\mu\text{M}$ ) con NADPH 50  $\mu\text{M}$  por 10 min a 25 °C y se midió la actividad enzimática por el ensayo de DTNB. Se debe usar más concentración de *EgTR*<sub>U596C</sub> que de *EgTR*<sub>wt</sub> debido a la baja catálisis de la primera. A partir de los cursos temporales se construyó el gráfico de velocidades iniciales en función de la concentración de cada enzima y se determinaron las  $k_{\text{cat}}$  aparentes a partir de las pendientes de los ajustes lineales de dichos gráficos.

### 3.8 Reacción entre *EgTR* y NO<sub>2</sub>-OA

*EgTR*<sub>wt</sub> (10 – 40 nM) o *EgTR*<sub>U596C</sub> (0.5  $\mu\text{M}$ ) se redujeron previamente con NADPH 50  $\mu\text{M}$  en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, EDTA 1.0 mM), por 10 min a 25 °C. Se midió actividad TR sin NO<sub>2</sub>-OA por ensayo de DTNB. Esta medida se consideró como la velocidad a tiempo cero de incubación entre enzimas y NO<sub>2</sub>-OA (Figura 24). Luego, se agregó NO<sub>2</sub>-OA en

concentraciones finales variables (0.77 – 6.40  $\mu\text{M}$  al tubo con  $EgTR_{wt}$ , o 5 – 20  $\mu\text{M}$  al tubo con  $EgTR_{U596C}$ ) y se midió la actividad enzimática remanente a medida que aumentaba el tiempo de incubación de la enzima con  $\text{NO}_2\text{-OA}$ .



**Figura 24. Esquema del método usado para estudiar la reacción entre  $EgTR$  y  $\text{NO}_2\text{-OA}$ .** El control sin  $\text{NO}_2\text{-OA}$  (paso 3) se consideró como el tiempo cero de la reacción entre  $EgTR$  y  $\text{NO}_2\text{-OA}$ .

Los controles de metanol se hicieron incubando  $EgTR_{wt}$  con un volumen de metanol equivalente al de la máxima concentración de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  ensayada para una concentración de enzima dada.

A partir de los cursos temporales de absorbancia a  $412 \text{ nm}$  en función del tiempo, se calcularon las velocidades de estado estacionario y se graficaron en función del tiempo de incubación con  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , a concentración fija del mismo. Se realizó el mismo gráfico de velocidad en función del tiempo de incubación para cada concentración de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  ensayada.

Para la  $EgTR_{wt}$  los datos ajustaron a una doble caída exponencial:

$$v_0 = \text{Amplitud}_{\text{rápida}} \times e^{-\left(k_{\text{obs}}^{\text{rápida}} \times \text{tiempo}\right)} + \text{Amplitud}_{\text{lenta}} \times e^{-\left(k_{\text{obs}}^{\text{lenta}} \times \text{tiempo}\right)} + \text{offset}$$

Se graficaron las  $k_{obs}$  de la fase lenta de la reacción entre  $EgTR_{wt}$  y  $NO_2$ -OA en función de las concentraciones del mismo. A partir del ajuste lineal se estimaron las constantes cinéticas directa ( $k_{on}$ ) y reversa ( $k_{off}$ ) de la fase lenta de la reacción.

### 3.9 Análisis de modificaciones en $EgTR_{wt}$ por reacción con $NO_2$ -OA mediante espectrometría de masas

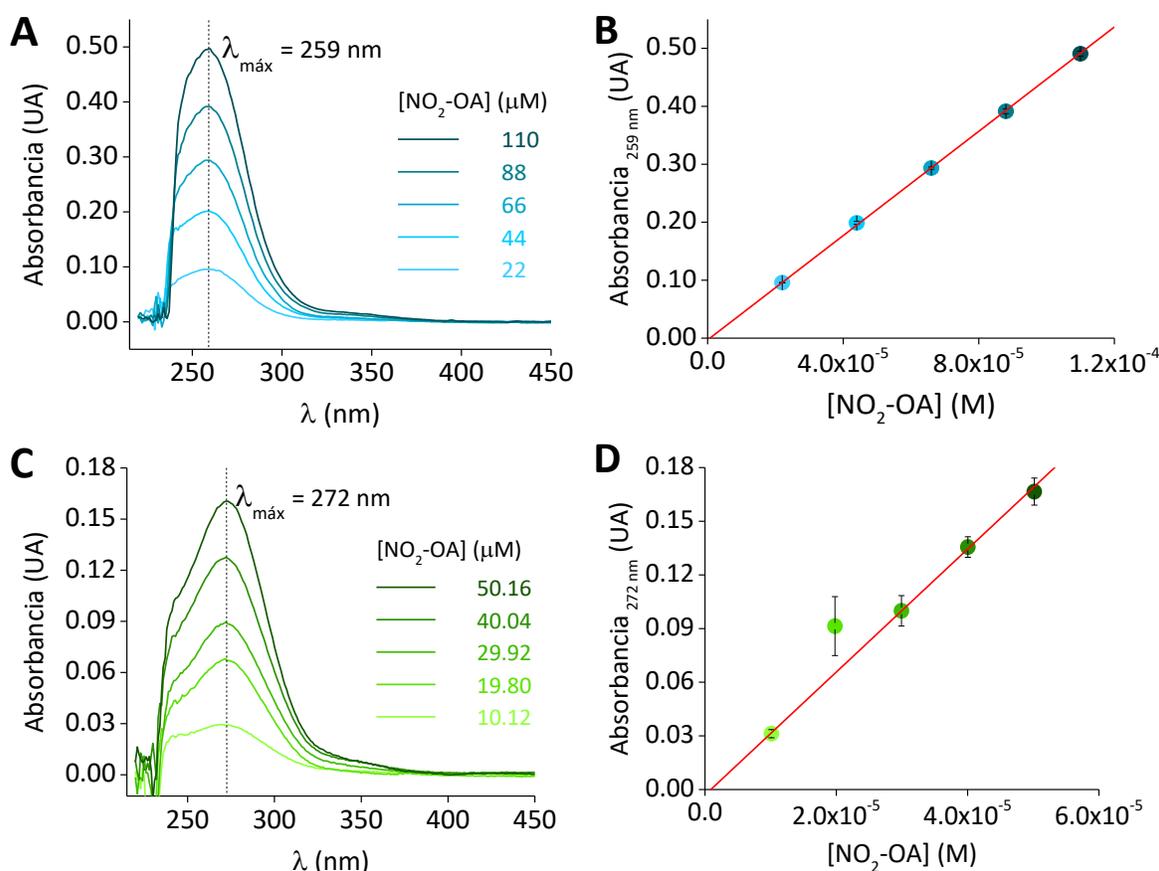
Se incubó la  $EgTR_{wt}$  2.5  $\mu$ M (200  $\mu$ g totales; ~20  $\mu$ g de enzima con Sec) con NADPH 50  $\mu$ M por 10 min a 25 °C. Se agregó  $NO_2$ -OA (27  $\mu$ M concentración final) o el mismo volumen de metanol (control vehículo) y se dejó reaccionar por 30 min a 25 °C. Se adicionó iodoacetamida (IAM) 10 mM, se incubó por 10 min a 25 °C y se pasó la mezcla por microcolumnas de gel filtración (Sephadex G25) previamente equilibrados con amortiguador bicarbonato de sodio (0.1 M, pH 8.0) para eliminar el  $NO_2$ -OA y la IAM remanente.

Luego se digirió la  $EgTR_{wt}$  con tripsina (1:50 tripsina: $EgTR_{wt}$ , considerando los 200  $\mu$ g totales) por 3 h a 37 °C. La mezcla se acidificó con ácido fórmico y se analizó por HPLC-MS/MS en un espectrómetro de masa Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Scientific) de alta resolución. Esto se realizó en el servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización espectral UV-Vis del NO<sub>2</sub>-OA

Se obtuvieron espectros de absorbancia de soluciones de NO<sub>2</sub>-OA de concentración conocida en metanol (Figura 25A) y en amortiguador fosfato 0.1 M a pH 7.4 (Figura 25C). De su análisis se aprecian máximos de absorbancia a  $\lambda = 259$  nm para metanol y  $\lambda = 272$  nm en amortiguador, que se le atribuyen a la absorción de fotones por los electrones  $\pi$  del grupo funcional nitro. El ruido observado a longitudes de onda debajo de los 250 nm en amortiguador fosfato proviene de las líneas de base, y también se aprecia en la literatura (97, 124).



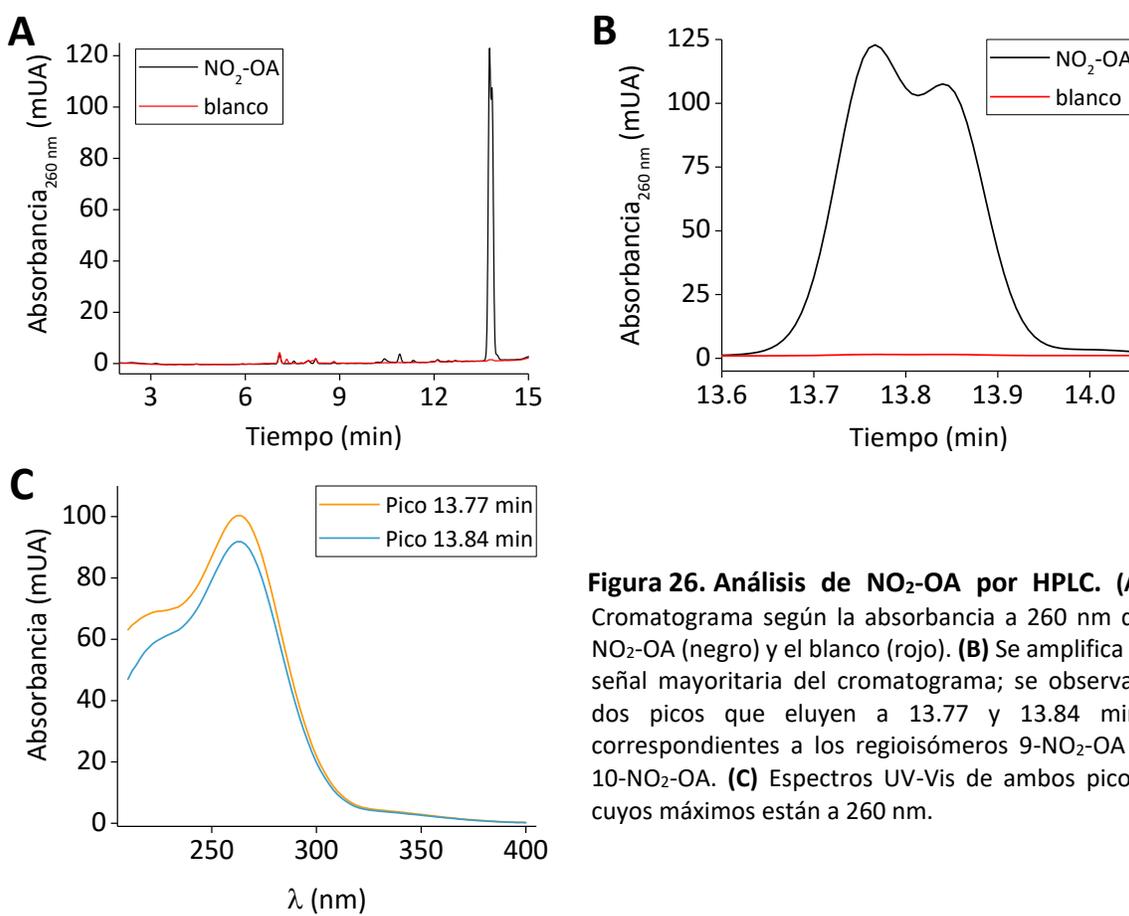
**Figura 25. Espectros UV-Vis y determinación de los coeficientes de absorptividad molar del NO<sub>2</sub>-OA a 25 °C.** Se muestran espectros representativos de NO<sub>2</sub>-OA en (A) metanol y (C) amortiguador fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 con EDTA 1.0 mM. Se construyeron las curvas de calibración en ambos solventes. Se obtuvo: (B)  $\epsilon_{259 \text{ nm}} = 4498 \pm 28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para metanol y (D)  $\epsilon_{272 \text{ nm}} = 3437 \pm 141 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en amortiguador. Los datos corresponden al promedio y desvío estándar ( $n = 3$ ).

A partir de la absorbancia a los respectivos  $\lambda_{\text{máx}}$ , se construyeron los gráficos de absorbancia en función de la concentración de NO<sub>2</sub>-OA y se realizaron los ajustes lineales según la ecuación de Lambert-Beer, con una excelente correlación entre los datos ( $R^2 = 0.99$  en

ambos casos). De las pendientes se obtuvieron los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) a 25 °C, resultando  $\epsilon_{259\text{ nm}} = 4498 \pm 28\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  en metanol (Figura 25B) y  $\epsilon_{272\text{ nm}} = 3437 \pm 141\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  en amortiguador (Figura 25D).

En la literatura se hallan absorptividades molares distintas a las medidas en este trabajo. En amortiguador fosfato (0.02 o 0.1 M, pH 7.4, con o sin DTPA 0.1 mM), el máximo de absorbancia se reporta a 270 nm con un  $\epsilon_{270\text{ nm}} = 8220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (97, 117). En cuanto a metanol, se reportan valores de  $\epsilon_{257\text{ nm}} = 7000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (84) o  $7500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (110), aunque ningún artículo muestra espectros UV-Vis ni la curva de calibración.

Las distintas formas de sintetizar NO<sub>2</sub>-OA producen mezclas de regio y estereoisómeros, y subproductos minoritarios que podrían interferir en las medidas (86). El análisis por HPLC siguiendo la absorbancia a 260 nm mostró un pico mayoritario y unos contaminantes mínimos a 10–12 min que no aparecen en el blanco (Figura 26A). El pico mayoritario está formado por dos picos que no se resuelven bien, con tiempos de retención de 13.77 y 13.84 min (Figura 26B). Ambos picos tienen el mismo espectro UV-Vis con un máximo a 260 nm y prácticamente la misma intensidad de absorbancia (Figura 26C).



**Figura 26. Análisis de NO<sub>2</sub>-OA por HPLC.** (A) Cromatograma según la absorbancia a 260 nm de NO<sub>2</sub>-OA (negro) y el blanco (rojo). (B) Se amplifica la señal mayoritaria del cromatograma; se observan dos picos que eluyen a 13.77 y 13.84 min, correspondientes a los regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA. (C) Espectros UV-Vis de ambos picos, cuyos máximos están a 260 nm.

Esto es un resultado esperable para una mezcla equimolar de los regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA, ya que la posición del grupo nitro cambia mínimamente su interacción a la columna C18 y no modifica sus propiedades espectrales.

Para confirmar la identidad de la mezcla, una muestra de ~30 mg de NO<sub>2</sub>-OA (aceite puro) fue analizada por resonancia magnética nuclear (RMN) en el servicio que ofrece el Laboratorio de Espectroscopía y Fisicoquímica Orgánica del Departamento de Química del Litoral (Centro Universitario Regional Litoral Norte, sede Paysandú, Universidad de la República).

Brevemente, la muestra se disolvió en 0.7 mL de cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) y se analizó por <sup>1</sup>H RMN en un equipo Bruker AVANCE III 500 y <sup>13</sup>C RMN en un Bruker AVANCE III 400, a 25 °C. Los espectros obtenidos (no se muestran) resultaron idénticos a los reportados anteriormente (97). Se detectaron mínimas impurezas provenientes de los reactivos de partida de la síntesis, que podrían ser los observados en el cromatograma entre 10–12 min (Figura 26A). La pureza de la mezcla regioisomérica fue mayor a 96%.

Se confirmó entonces que nuestro stock consiste una mezcla equimolar de los regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA, principalmente como estereoisómeros E (isómeros geométricos del grupo funcional alqueno). En suma, confiamos en la pureza y concentración de nuestra solución madre y por lo tanto en los coeficientes de extinción molar determinados en este trabajo.

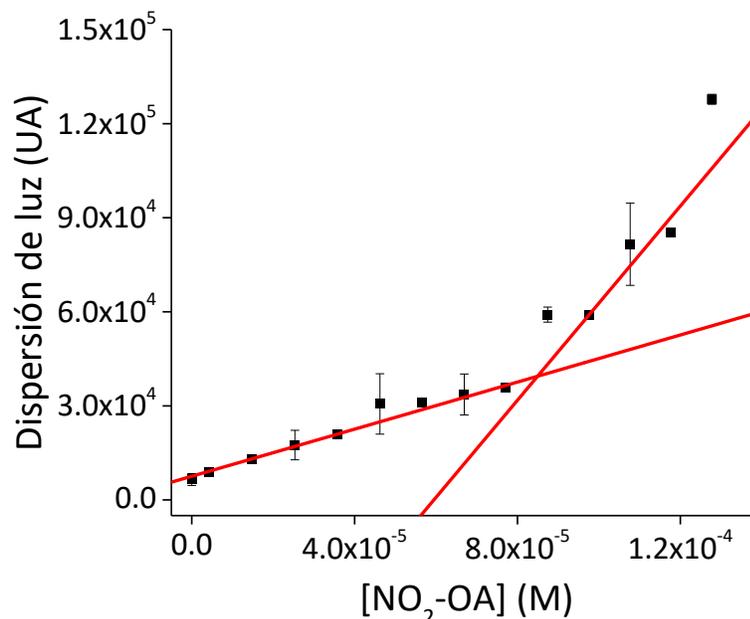
## 4.2 Determinación de la CMC por dispersión de luz

Por las características anfipáticas del NO<sub>2</sub>-OA, este se comporta como un surfactante cuando se encuentra en solución acuosa, auto ensamblándose en estructuras ordenadas como micelas, vesículas o liposomas a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares del ácido graso y el agua, así como por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas de varias moléculas. Este proceso depende del pH, la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto y la temperatura (148).

La formación de micelas puede apreciarse siguiendo la dispersión de luz a una longitud de onda a la que no interfieran cromóforos o fluoróforos de la muestra, por ejemplo, en el rango de 500 a 900 nm. La formación de micelas en función de la concentración del surfactante se evidencia por el cambio repentino en la dispersión de luz, que da lugar a dos rectas con pendientes distintas (142).

De esta forma, en la literatura se reportó que la CMC del NO<sub>2</sub>-OA es 10.6 μM (149). No obstante, el método experimental de dicho reporte implica tiempos de incubación de ~1 h con NaOH 100 mM, lo cual propicia la hidrólisis del nitrolípido, haciendo que su concentración disminuya y por ende se subestime su CMC.

En este trabajo se midió la dispersión de luz a 500 nm de distintas diluciones de NO<sub>2</sub>-OA en amortiguador fosfato a pH 7.4. Se obtuvieron dos rectas con pendientes diferentes de cuya intersección se determinó que la CMC = 65 ± 14 μM (n = 4) (Figura 27). El método empleado aquí es más directo y no utiliza ningún otro reactivo que pudiera degradar el NO<sub>2</sub>-OA.



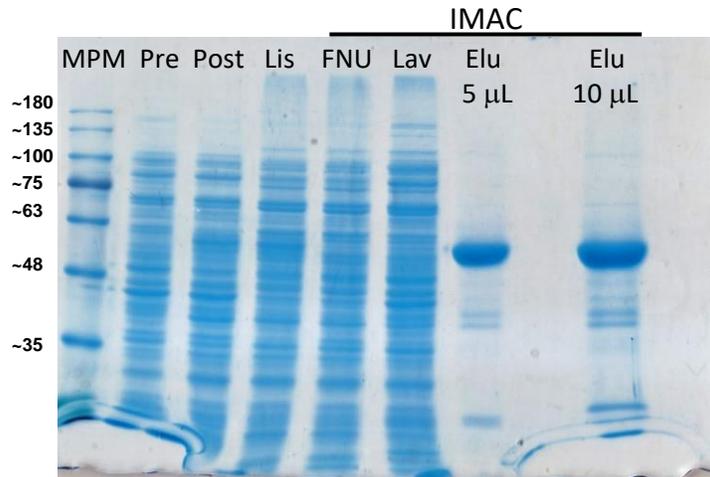
**Figura 27. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del NO<sub>2</sub>-OA.** Se midió la dispersión de luz ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ ) a 25 °C en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM. Se muestra un gráfico representativo. Los datos corresponden al promedio y las barras de error al desvío estándar (n = 2) con sus respectivos ajustes lineales en rojo.

### 4.3 Expresión y purificación de *EgTR*<sub>U596C</sub>

La proteína con etiqueta de His se expresó de forma recombinante en *E. coli* BL21(DE3) y se purificó en dos pasos de cromatografía en columna, primero por IMAC a partir de los lisados bacterianos y luego por SEC. Las restricciones impuestas por la emergencia sanitaria en Uruguay impidieron un flujo de trabajo continuo para la purificación de la *EgTR*<sub>U596C</sub>. El eluato de la IMAC se almacenó a -20 °C por ~3 meses antes de realizar el paso de purificación por SEC, lo cual afectó la estabilidad de la proteína haciendo que precipitara en el tubo. Por esto, la *EgTR*<sub>U596C</sub> se produjo en dos oportunidades independientes, llamadas primera y segunda expresión.

### 4.3.1 Primera expresión

La purificación se evaluó por SDS-PAGE. Si bien las diferencias entre los carriles pre y post inducción son sutiles, la expresión de la proteína de interés se hace evidente luego de finalizar el primer paso de purificación (IMAC) (Figura 28), entonces, se observa que hubo inducción. El eluido de la IMAC presenta una banda mayoritaria entre ~63 kDa y ~48 kDa, que se corresponde con el peso de los monómeros de *EgTR*<sub>U596C</sub> de ~57 kDa, y tres bandas minoritarias de proteínas contaminantes que no fueron caracterizadas.

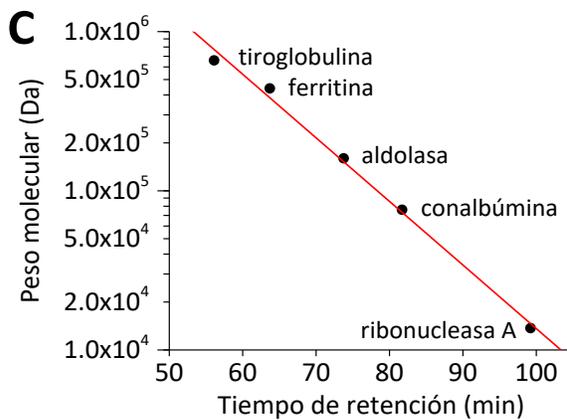
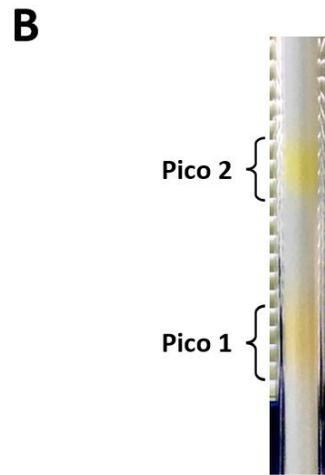
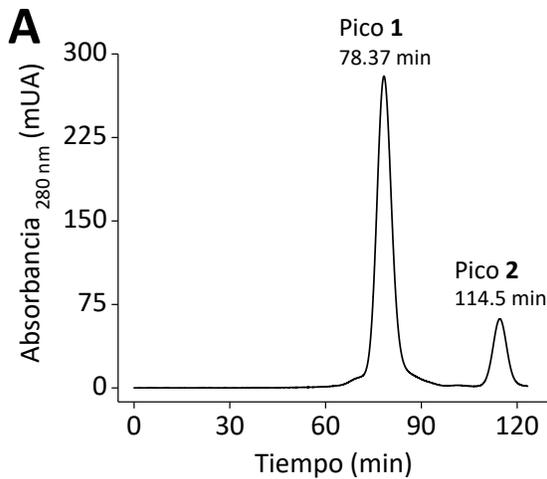


**Figura 28. Comparación de los pasos de purificación por IMAC por SDS-PAGE (10%) reductor.** MPM: marcador de peso molecular (kDa), Pre: pre-inducción, Post: post-inducción, Lis: lisado, FNU: fracción no unida, Lav: lavado, Elu: eluido.

Las muestras con la proteína de interés se purificaron por SEC. En el cromatograma de la SEC (Figura 29A) se observan dos picos de absorbancia a 280 nm, llamados 1 y 2, a 78.37 min y 114.5 min, respectivamente. Estos picos se correspondieron con dos bandas de color amarillo a la vista, derivadas de la muestra sembrada inicialmente (Figura 29B).

La columna de la SEC fue calibrada (Figura 29C) y la curva resultante fue  $\log(\text{PM}) = -0.03995 \times \text{tiempo retención} + 8.12882$ , con un  $R^2 = 0.99$ . Utilizando la curva de calibración se calculó que el peso molecular del pico 1 fue de 99.5 kDa, mientras que el del pico 2 no pudo calcularse por estar fuera del rango lineal de la curva de calibración (mayor tiempo de retención que la proteína más pequeña).

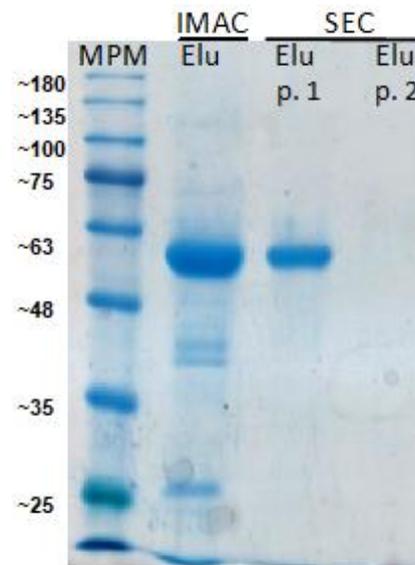
La forma funcional de la *EgTR* es un dímero, cuyo peso molecular se calculó en 114.7 kDa utilizando la herramienta ProtParam del sitio web Expasy. La diferencia de ~15 kDa entre el peso teórico y el obtenido de la curva de calibración se atribuye principalmente a que la columna de exclusión molecular utilizada es preparativa y no analítica.



**Figura 29. Purificación de la primera expresión de *EgTR<sub>U596C</sub>* por SEC. (A) Cromatograma de SEC. (B) Elución de los picos 1 y 2 vistos como dos bandas amarillas en la columna. (C) Curva de calibración de la columna utilizando estándares de proteínas globulares.**

La presencia de proteína en los picos 1 y 2 se evaluó por electroforesis SDS-PAGE (Figura 30). Para el pico 1 se observa una única banda entre ~63 kDa y ~48 kDa, correspondiente a la *EgTR<sub>U596C</sub>*. Los contaminantes de pesos moleculares menores presentes luego de la IMAC fueron removidos con éxito en la SEC. El pico 2 sin embargo, no reveló la presencia de proteína a pesar de tener absorbancia a 280 nm en el cromatograma (Figura 29A).

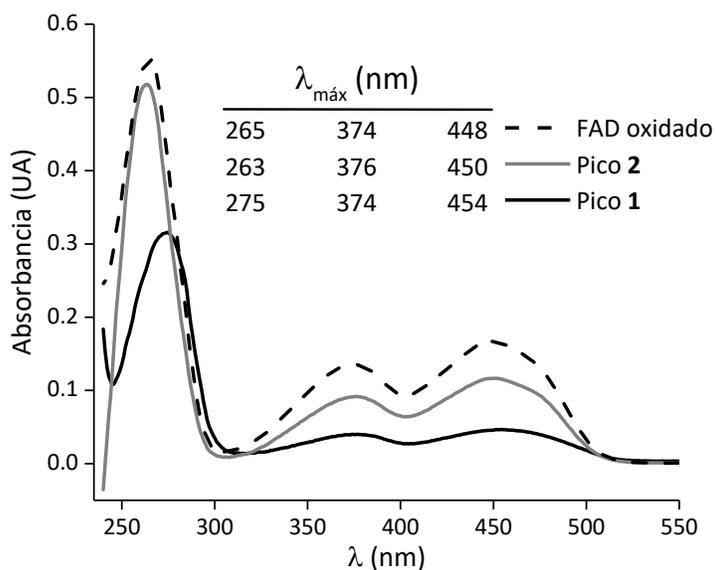
Para profundizar en la naturaleza del pico 2, se realizaron espectros UV-Vis de los picos 1 y 2, y de una solución de FAD oxidado (Figura 31). Como se observa, los espectros del pico 2 ( $\lambda_{\text{máx}} = 265, 374 \text{ y } 448$



**Figura 30. Comparación de los pasos de purificación por IMAC y por SEC por SDS-PAGE (10%) reductor. MPM: marcador de peso molecular (kDa), Elu: eluido, p. 1: pico 1, p. 2: pico 2.**

nm) y del FAD oxidado ( $\lambda_{\text{máx}} = 263, 376$  y  $450$  nm) presentan el mismo perfil de  $\lambda_{\text{máx}}$ . Por lo tanto, podemos concluir que la señal de absorbancia a  $280$  nm observada en el cromatograma del pico 2 (Figura 29A) se debe a la contribución del máximo a  $265$  nm del FAD oxidado libre (que no se unió a la *EgTR*<sub>U596C</sub>).

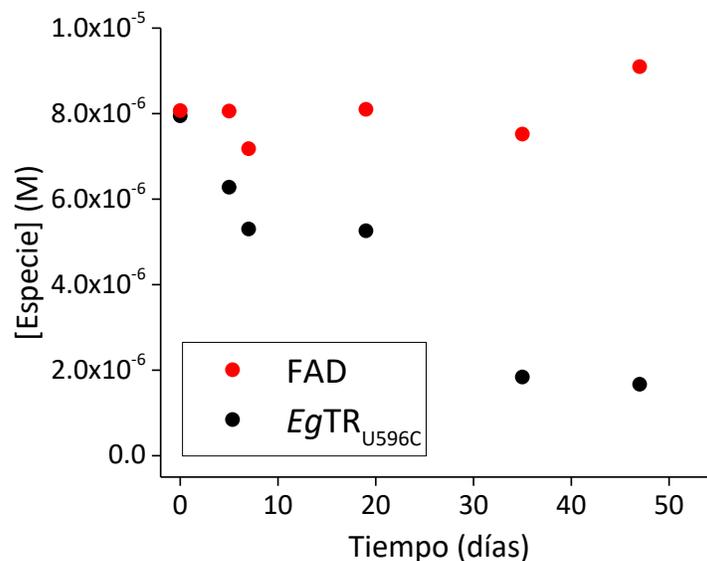
Por su parte, el pico 1 ( $\lambda_{\text{máx}} = 275, 374$  y  $454$  nm) muestra un máximo de absorbancia a  $275$  nm. Esto implica un corrimiento de  $\sim 10$  nm respecto al espectro del FAD oxidado ( $263$  nm) y del pico 2 ( $265$  nm). Este corrimiento es producto del solapamiento de la absorbancia del FAD oxidado a  $265$  nm y de la *EgTR*<sub>U596C</sub> a  $280$  nm. Es de esperar que el FAD se una a la proteína como cofactor enzimático y que, como consecuencia del entorno proteico, su espectro UV-Vis cambie en la región  $320$ - $520$  nm en comparación al FAD oxidado en solución ( $150$ ). En nuestro caso, este cambio espectral no ocurre.



**Figura 31. Espectros UV-Vis entre 240-550 nm.** Se muestran espectros del FAD oxidado ( $14.7 \mu\text{M}$ ) y de los picos 1 y 2. Las medidas se realizaron en amortiguador fosfato de sodio  $0.1$  M, pH  $7.4$  con EDTA  $1.0$  mM. El factor de dilución (FD) del pico 1 fue 2.

La *EgTR* es una flavoenzima con el cofactor FAD unido de forma no covalente (71). Ya vimos que la proteína puede liberar FAD al sobrenadante en condiciones subóptimas de almacenamiento, lo cual ocurrió entre la IMAC y la SEC. Luego de la SEC, es posible que la *EgTR*<sub>U596C</sub> haya continuado liberando FAD y perdiendo estabilidad estructural, lo cual explicaría la ausencia de cambios en la región  $320 - 520$  nm.

La presencia de FAD libre en el stock de *EgTR*<sub>U596C</sub> representa un problema a la hora de cuantificar la proteína por absorbancia a  $460$  nm, ya que se sobreestimaría la concentración de proteína activa, por estar cuantificando FAD libre en lugar de FAD unido a la enzima. Para evaluar el estado de la proteína se estimó la concentración de proteína y FAD en el lote, almacenado por  $47$  días a  $-20$  °C (Figura 32). Restando la contribución del FAD a la absorbancia a  $280$  nm y utilizando el  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  de *EgTR*<sub>U596C</sub> calculado teóricamente en ProtParam, se pudo estimar la concentración de enzima y FAD separadamente. La concentración de *EgTR*<sub>U596C</sub> disminuyó desde  $\sim 8 \mu\text{M}$  a  $\sim 2 \mu\text{M}$  por precipitación, pero no así la del FAD, que se mantuvo en torno al valor inicial de  $\sim 8 \mu\text{M}$ .



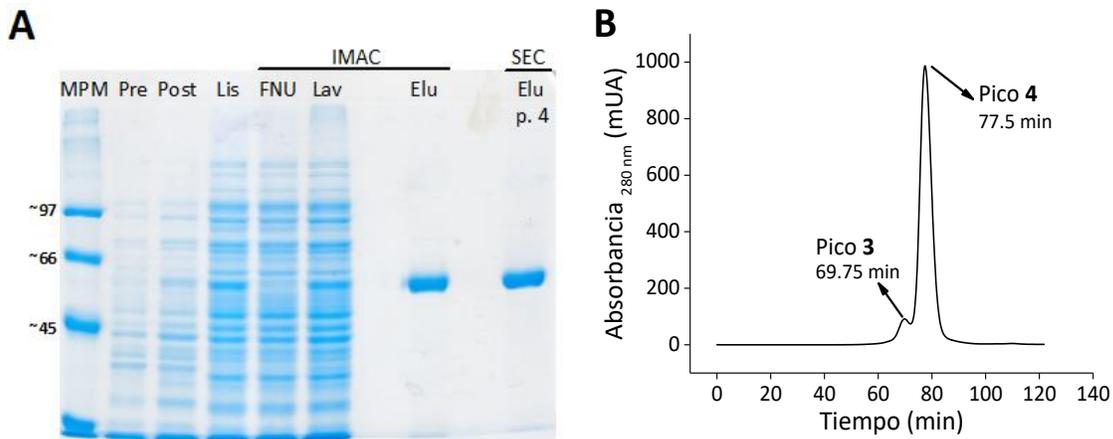
**Figura 32. Estabilidad de *EgTR*<sub>U596C</sub> (primera expresión) durante su almacenamiento a -20 °C.** Las especies (proteína y FAD) se cuantificaron por absorbancia a partir de espectros UV-Vis del pico 1.

En conclusión, las condiciones de almacenamiento subóptimas hicieron que esta enzima sufriera alteraciones que hicieron inviable su utilización en los experimentos de cinética.

#### 4.3.2 Segunda expresión

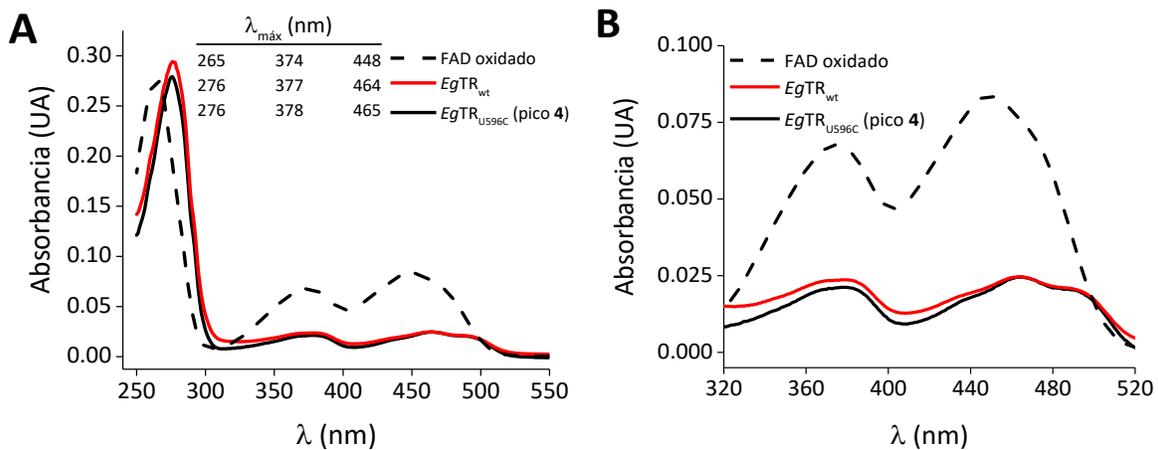
En esta nueva expresión se sustituyó el pasaje por PD-10 para remover el imidazol residual de la IMAC por una diálisis por 18 h a 4 °C contra amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM. La SEC fue realizada inmediatamente luego de la diálisis y la proteína se almacenó a -80 °C en el amortiguador de la diálisis con el agregado de EDTA 1.0 mM.

La proteína mayoritaria después de la IMAC se corresponde con una banda entre ~66 kDa y ~45 kDa, semejante al monómero de ~57 kDa de *EgTR*<sub>U596C</sub> (Figura 33A). En el transcurso de la SEC (Figura 33B) la muestra no se separó en dos bandas amarillas en la columna y tampoco se detectó el pico 2 observado en la purificación anterior (Figura 29A). En esta nueva purificación, se observaron dos picos llamados 3 y 4, con tiempos de retención de 69.75 min y 77.5 min, respectivamente. Utilizando la curva de calibración de la columna, se calculó que el pico 3 tiene un peso molecular de ~220 kDa, semejante al de un tetrámero de *EgTR*<sub>U596C</sub>, y el pico 4 de ~108 kDa, próximo al del dímero.



**Figura 33. Purificación de la segunda expresión de *EgTR*<sub>U596C</sub>.** (A) SDS-PAGE 10% reductor. MPM: marcador de peso molecular (kDa), Pre: pre-inducción, Post: post-inducción, Lis: lisado, FNU: fracción no unida, Lav: lavado, Elu: eluído, p. 4 (pico 4): proteína mayoritaria del cromatograma de SEC. (B) Cromatograma de SEC. El pico 3 tiene un peso de ~220 kDa y el pico 4 de ~108 kDa.

Para confirmar la presencia de *EgTR*<sub>U596C</sub> con FAD unido se analizaron comparativamente espectros UV-Vis del pico 4, del lote de *EgTR*<sub>wt</sub> a utilizar en experimentos de cinética y de FAD oxidado en solución (Figura 34A). El pico 4 presenta el corrimiento esperado para FAD unido a la proteína ( $\lambda_{\text{máx}} = 276, 378$  y  $465$  nm). Este mismo perfil espectral fue observado para la *EgTR*<sub>wt</sub>, con  $\lambda_{\text{máx}} = 276, 377$  y  $464$  nm (Figura 34B), y también fue reportado en la literatura para *EgTGR* (71), *SmTGR* (65), TGR humana (151), TR de nemátodos (73) y de otros mamíferos (45, 143). Esto sugiere que el FAD está correctamente unido a la proteína.

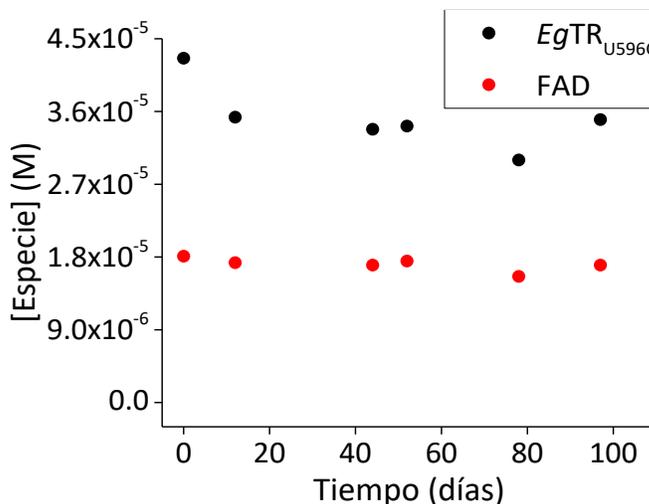


**Figura 34. Caracterización UV-Vis de *EgTR*<sub>wt</sub> y *EgTR*<sub>U596C</sub>.** (A) Se muestra el espectro de FAD oxidado  $7.39 \mu\text{M}$  (trazo punteado), *EgTR*<sub>wt</sub> (trazo rojo) y *EgTR*<sub>U596C</sub> (trazo negro). Las medidas se realizaron en amortiguador fosfato de sodio  $0.1 \text{ M}$ , pH  $7.4$  con EDTA  $1.0 \text{ mM}$  (línea de base). Los factores de dilución (FD) son  $12$  (*EgTR*<sub>wt</sub>) y  $10$  (*EgTR*<sub>U596C</sub>). (B) Región  $320\text{-}520$  nm ampliada.

Para este nuevo lote, se estimó  $[\text{FAD}]_{\text{stock}} \sim 18 \mu\text{M}$  y  $[\text{EgTR}_{\text{U596C}}]_{\text{stock}} \sim 43 \mu\text{M}$ , lo cual era esperable en base a la experiencia previa (comunicación personal con M. Bonilla). En esta segunda expresión se obtuvo una concentración mucho mayor de FAD y enzima que en la

primera expresión, en la cual las concentraciones de FAD y  $EgTR_{U596C}$  fueron  $\sim 8 \mu M$  (al tiempo de almacenamiento 0 días) (Figura 32).

El monitoreo de la concentración de proteína y FAD de la segunda expresión (Figura 35) muestra mayor estabilidad tras su almacenamiento en amortiguador con EDTA a  $-80^\circ C$  respecto al almacenamiento en amortiguador sin EDTA a  $-20^\circ C$  (Figura 32). Esta nueva  $EgTR_{U596C}$  se mantuvo estable por  $\sim 3$  meses, sin verse afectada la concentración de FAD. Por ende, para los demás ensayos se optó por cuantificar la proteína pura por su absorbancia a 460 nm, sabiendo que todo el FAD está asociado a la  $EgTR_{U596C}$ .



**Figura 35. Estabilidad de  $EgTR_{U596C}$  (segunda expresión) durante su almacenamiento a  $-80^\circ C$ .** Las especies (enzima y FAD) se cuantificaron por absorbancia a partir de espectros UV-Vis de  $EgTR_{U596C}$ . Los datos representan una única medida a cada tiempo ( $n = 1$ ).

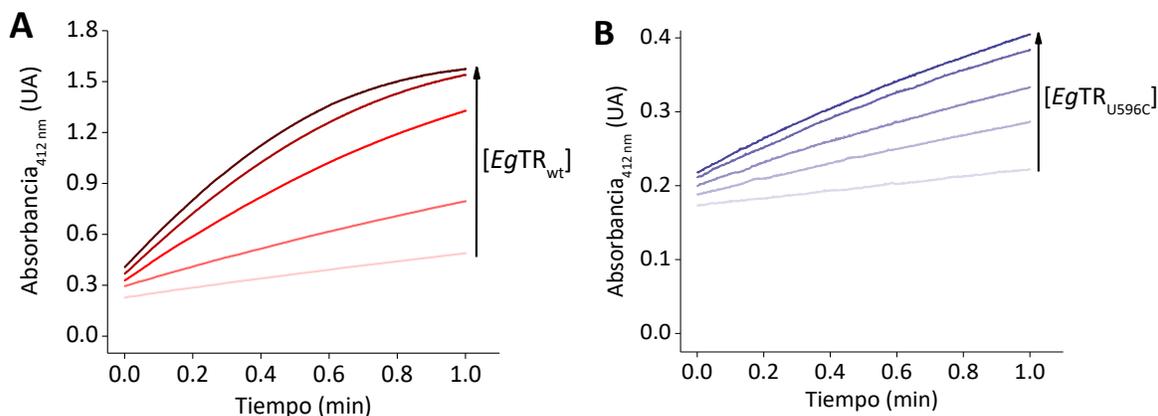
Los experimentos subsiguientes de actividad enzimática fueron realizados con este nuevo lote de  $EgTR_{U596C}$  y con un lote de  $EgTR_{wt}$  producido anteriormente en el Laboratorio.

#### 4.4 Determinación de $k_{cat}$ para $EgTR_{wt}$ y $EgTR_{U596C}$

La  $EgTR$  es una enzima bisustrática que utiliza NADPH como poder reductor. Para estudiar la cinética de estado estacionario de las enzimas salvaje y mutante, se hicieron ensayos de reducción de DTNB (sustrato no natural), siguiendo la formación del producto TNB a 412 nm (144), según la Reacción 1:



Las concentraciones de sustrato utilizadas se eligieron en base a los  $K_m$  reportados en la literatura. En general, el  $K_m$  para NADPH es menor a  $\sim 10 \mu M$  (66, 67, 152) y para DTNB está entre 100 – 300  $\mu M$  (65, 66, 74). Se observa que los cursos temporales pierden linealidad a tiempos de reacción largos, debido al agotamiento del reactivo limitante de la reacción; NADPH (Figura 36).



**Figura 36. Cursos temporales representativos de *EgTR* en ensayos de DTNB.** Se incubó (A) *EgTR*<sub>wt</sub> (2.24 – 11.2 nM) o (B) *EgTR*<sub>U596C</sub> (0.1 – 0.5 μM), con NADPH 50 μM por 10 min a 25 °C en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M, EDTA 1.0 mM, pH 7.4. Al cabo de los 10 min se inició la reacción agregando DTNB 1.0 mM en las mezclas. Se siguió la formación del producto TNB por absorbancia a 412 nm. Los tazos se oscurecen a mayores concentraciones de enzima.

Se controló la hidrólisis espontánea del DTNB en ausencia y presencia de NADPH (no se muestra), resultando despreciable en los 60 segundos del registro temporal, según lo esperado (146, 147). Se hicieron ajustes lineales a los cursos temporales en los primeros segundos de reacción, correspondientes a un consumo menor al 10% de NADPH. La velocidad de estado estacionario ( $v_0$ ) se obtuvo a partir de la pendiente de los ajustes lineales según la Ecuación 1.

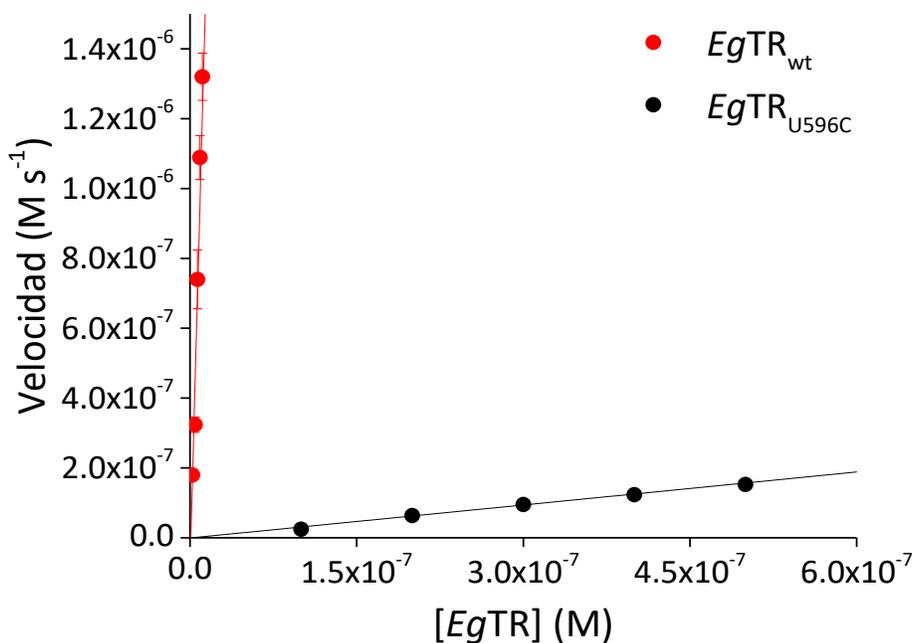
$$v_0 = \frac{1}{2} \frac{\Delta[\text{TNB}]}{\Delta\text{tiempo}} = \frac{1}{2} \frac{\Delta A_{412}}{\Delta\text{tiempo} \times \epsilon_{412}^{\text{TNB}}} = \frac{1}{2} \frac{\text{pendiente}}{\epsilon_{412}^{\text{TNB}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dado que la mutación afecta directamente al sitio activo, esta diferencia en la catálisis entre *EgTR*<sub>wt</sub> y *EgTR*<sub>U596C</sub> en ensayos de DTNB es esperable. Además, se condice con el comportamiento reportado en otros artículos para *EgTGR* (61), *SmTGR* (65) y *HsTGR* (151) en sus formas con Sec o mutante por Cys, en condiciones similares.

A partir de las velocidades iniciales obtenidas a distintas concentraciones de enzima se calculó la  $k_{\text{cat}}$  aparente, para la *EgTR*<sub>wt</sub> y *EgTR*<sub>U596C</sub> (Figura 37). La  $k_{\text{cat}}$  es una constante de primer orden que indica el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por sitio activo, por segundo. Se relaciona con las propiedades de los complejos enzima-sustrato, incluyendo enzima-intermediario y enzima-producto. Se interpreta como el límite inferior de las constantes cinéticas de los pasos de reacción que llevan al sustrato a transformarse en producto.

Para la forma salvaje se obtuvo una  $k_{\text{cat}}$  aparente de  $116 \pm 17 \text{ s}^{-1}$ , y para la forma mutante de  $0.31 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ , es decir, ~375 veces menos. En la literatura se reporta una  $k_{\text{cat}}$  aparente de  $60 \pm 3 \text{ s}^{-1}$  para *EgTR*<sub>wt</sub> (61), medida que es aproximadamente la mitad que la reportada

aquí. Esta diferencia puede deberse a que estamos subestimando la concentración de enzima activa al asumir que la incorporación de Sec es del 10% (61) y el 90% restante se traduce en enzima trunca. Esto se debe a que, como se comentó en la introducción, el codón UGA en el ARNm que codifica para la Sec se puede interpretar como un codón de parada por el ribosoma. En el caso de la  $EgTR_{U596C}$  este es el primer reporte de  $k_{cat}$  aparente y está en el orden de lo reportado para  $EgTGR_{U596C}$  (61).



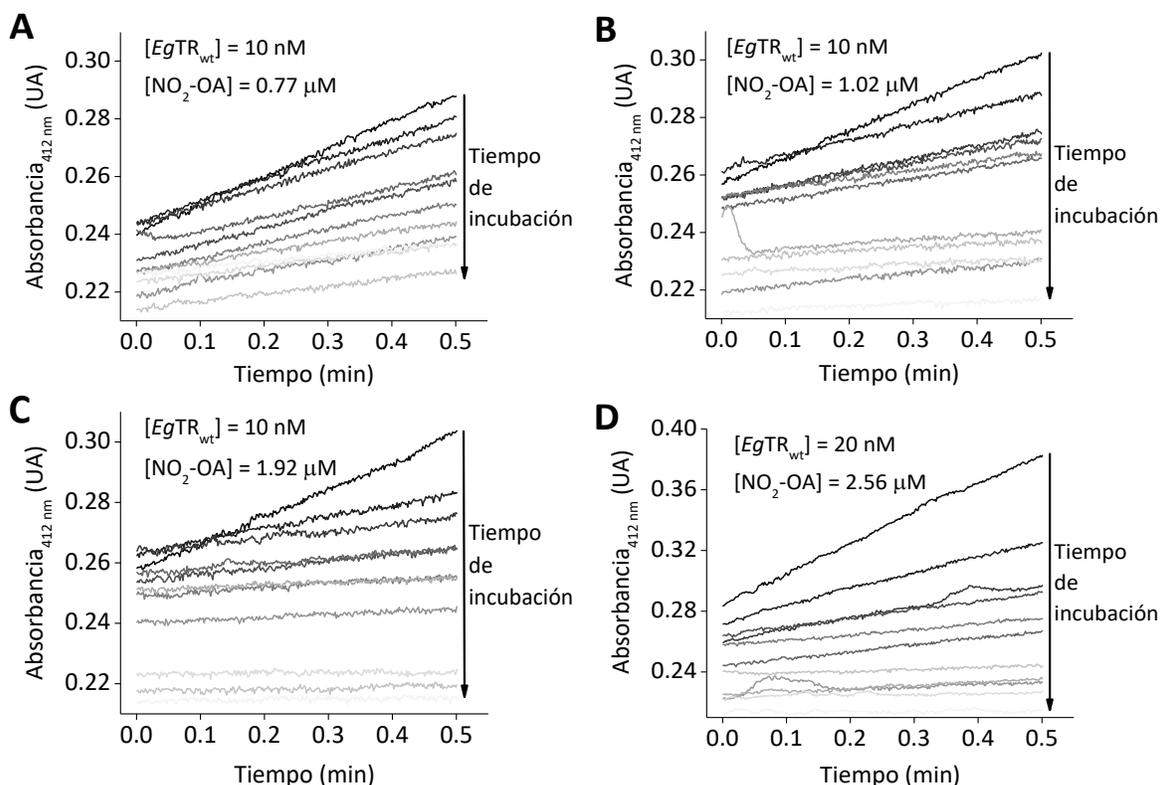
**Figura 37. Determinación de  $k_{cat}$  aparente para  $EgTR_{wt}$  y  $EgTR_{U596C}$ .** Velocidades de estado estacionario determinadas en la Figura 36, en función de la concentración de  $EgTR_{wt}$  (círculos rojos) o  $EgTR_{U596C}$  (círculos negros). Los datos representan el promedio y las barras de error los desvíos estándar ( $n = 3$ ) para cada concentración de enzima (las barras de error de  $EgTR_{U596C}$  no se ven por la escala). Se muestran los ajustes lineales a los datos ( $R^2 > 0.92$  en ambos casos). De las pendientes de los ajustes se obtuvo  $k_{cat} = 116 \pm 17 \text{ s}^{-1}$  para la  $EgTR_{wt}$  y  $k_{cat} = 0.31 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  para la  $EgTR_{U596C}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH 7.4.

## 4.5 Reacción entre $EgTR_{wt}$ y $\text{NO}_2\text{-OA}$

Para evaluar la cinética de la reacción entre  $\text{NO}_2\text{-OA}$  y  $EgTR_{wt}$  se incubó el nitrolípido con la enzima previamente reducida con NADPH y se midió la actividad enzimática remanente de sucesivas alícuotas tomadas a distintos tiempos de incubación, por ensayos con DTNB y NADPH. La actividad enzimática de la  $EgTR_{wt}$  sin  $\text{NO}_2\text{-OA}$  fue considerada como el tiempo cero de incubación. En las corridas donde se utilizaron mayores concentraciones de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  también se utilizaron mayores concentraciones de enzima para poder medir velocidades

apreciables. En todos los casos, se mantuvo un exceso de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  de  $\sim 30$  veces respecto a la  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$ .

En la Figura 38 se muestran corridas representativas, donde se observa que la pendiente de los cursos temporales decrece a medida que el tiempo de incubación entre la enzima y el nitroalqueno crece, lo cual es un indicio de que la  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  se inhibe en presencia de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  de forma dependiente con el tiempo de incubación. Este tipo de inhibición dependiente del tiempo fue observado para la GR de *S. cerevisiae* en presencia de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  (82).



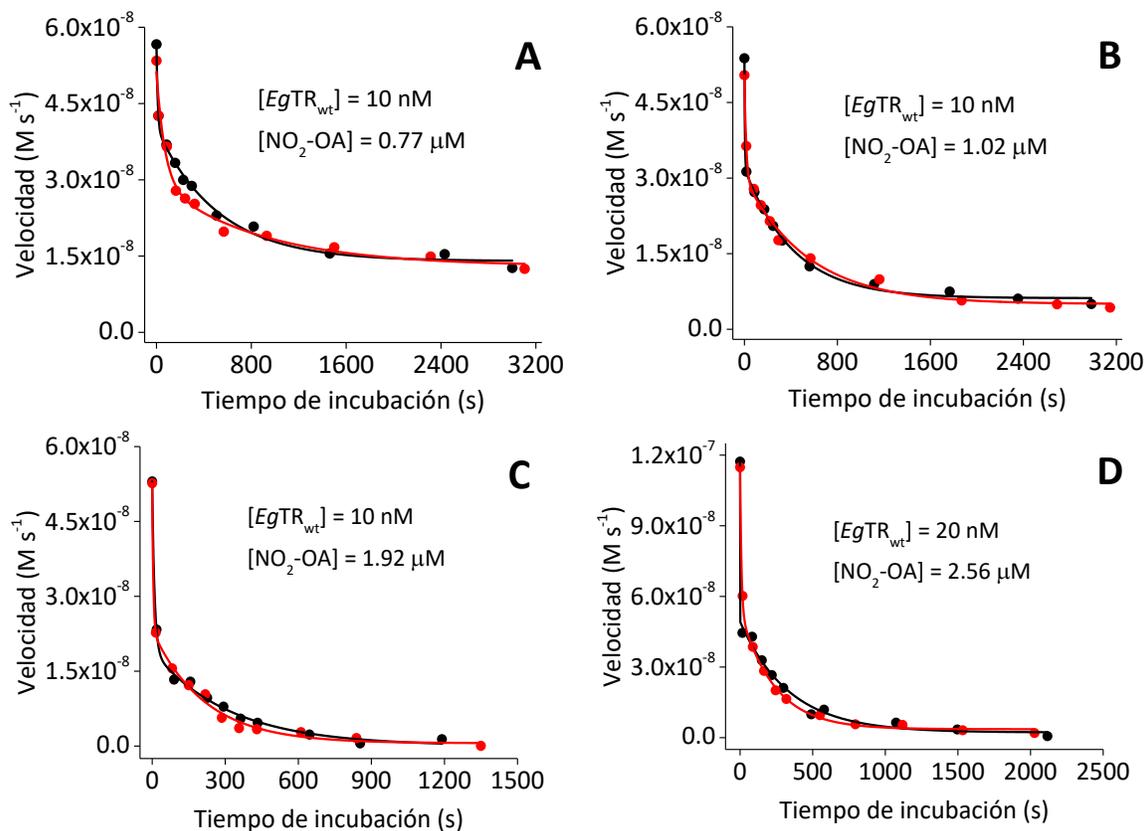
**Figura 38. Cursos temporales de la actividad TR de la  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  en presencia de  $\text{NO}_2\text{-OA}$ .** Se muestran cursos temporales representativos de formación de TNB para  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  10 nM incubada con  $\text{NO}_2\text{-OA}$  (A) 0.77  $\mu\text{M}$ , (B) 1.02  $\mu\text{M}$  y (C) 1.92  $\mu\text{M}$ , y (D)  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  20 nM incubada con  $\text{NO}_2\text{-OA}$  2.56  $\mu\text{M}$ . Se mezclaron alícuotas de enzima tomadas a distintos tiempos de incubación con  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , con NADPH 50  $\mu\text{M}$  y DTNB 1.0 mM en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, EDTA 1.0 mM. Se registró la formación de TNB por absorbancia a 412 nm (25 °C). En todos los casos, el trazo más oscuro representa la reacción en ausencia de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  (el tiempo cero de incubación entre  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  y  $\text{NO}_2\text{-OA}$ ).

De las pendientes iniciales de los cursos temporales (Figura 38) se obtuvieron las velocidades de estado estacionario para cada tiempo de incubación entre  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  y  $\text{NO}_2\text{-OA}$  (Figura 39). Los datos por duplicado indican que la  $\text{EgTR}_{\text{wt}}$  reacciona con  $\text{NO}_2\text{-OA}$  siguiendo una cinética bifásica, donde hay una primera fase rápida seguida de una fase lenta. Para el análisis cinético nuestros datos se ajustaron a una ecuación doble exponencial, según la Ecuación 2:

$$v_0 = \text{Amplitud}_{\text{rápida}} \times e^{-\left(k_{\text{obs}}^{\text{rápida}} \times \text{tiempo}\right)} + \text{Amplitud}_{\text{lenta}} \times e^{-\left(k_{\text{obs}}^{\text{lenta}} \times \text{tiempo}\right)} + \text{offset} \quad \text{Ecuación 2}$$

A tiempos largos, la reacción llega a una velocidad de estado estacionario constante que es distinta de cero, sobre todo para concentraciones bajas de NO<sub>2</sub>-OA (Figura 39). Esto se puede explicar en términos de la reversibilidad de la reacción.

Con este abordaje experimental no es posible estudiar la fase rápida. Las constantes de pseudo-primer orden ( $k_{\text{obs}}$  rápida) que se obtienen del ajuste tienen un error mayor al propio valor, ya que la primera exponencial de la Ecuación 2 tiene pocos datos. En cambio, las  $k_{\text{obs}}$  de la fase lenta determinadas en función de distintas concentraciones de NO<sub>2</sub>-OA sí se obtuvieron de la ajuste a la Ecuación 2.

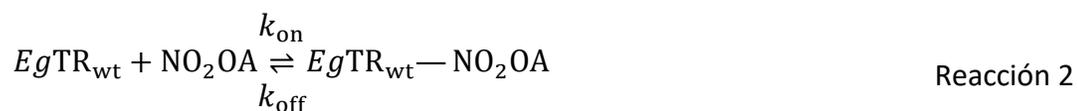


**Figura 39. Inhibición de *EgTR<sub>wt</sub>* por NO<sub>2</sub>-OA.** Las velocidades iniciales se obtuvieron de las pendientes de los cursos temporales en condiciones de estado estacionario a 25 °C y pH 7.4 (Figura 38) y se graficaron en función del tiempo de incubación con NO<sub>2</sub>-OA. Se muestran los gráficos obtenidos para *EgTR<sub>wt</sub>* 10 nM con NO<sub>2</sub>-OA (A) 0.77 μM, (B) 1.02 μM y (C) 1.92 μM, y (D) *EgTR<sub>wt</sub>* 20 nM con NO<sub>2</sub>-OA 2.56 μM. El tiempo de incubación cero equivale a un control sin NO<sub>2</sub>-OA. Los datos se ajustaron a una ecuación doble exponencial (Ecuación 2). Los trazos rojo y negro corresponden a dicho ajuste para dos experimentos independientes (n = 2). En todos los casos, R<sup>2</sup> ≥ 0.96.

Dado que el NO<sub>2</sub>-OA posee un solo centro electrofílico (carbono β) con la misma reactividad en ambos regioisómeros (112, 123–125, 129), este comportamiento bifásico podría explicarse por la presencia de más de un residuo nucleofílico con distinta reactividad, involucrado en la catálisis enzimática. El residuo de Sec del sitio activo podría reaccionar más rápido con NO<sub>2</sub>-OA que las Cys e His, ya que combina de mejor manera la disponibilidad del R–Se<sup>–</sup> a pH fisiológico y su capacidad como grupo saliente (32). Además, como ya se mencionó, la mayor polarizabilidad del átomo de Se le confiere una mayor nucleofilia que al átomo de S (28). En efecto, la reacción de un nitrolípido con un R–Se<sup>–</sup> debería ser más rápida que con un R–S<sup>–</sup>.

Este mismo perfil bifásico se apreció para la reacción entre TR1 de rata y 4-HNE, un lípido electrófilo que posee un carbonilo α,β-insaturado, que forma aductos de Michael reversibles con la Cys y la Sec del centro redox activo GCUG. Los autores del artículo conjeturaron que la fase rápida podría ser por la reacción de 4-HNE con Sec y la fase lenta con Cys (78).

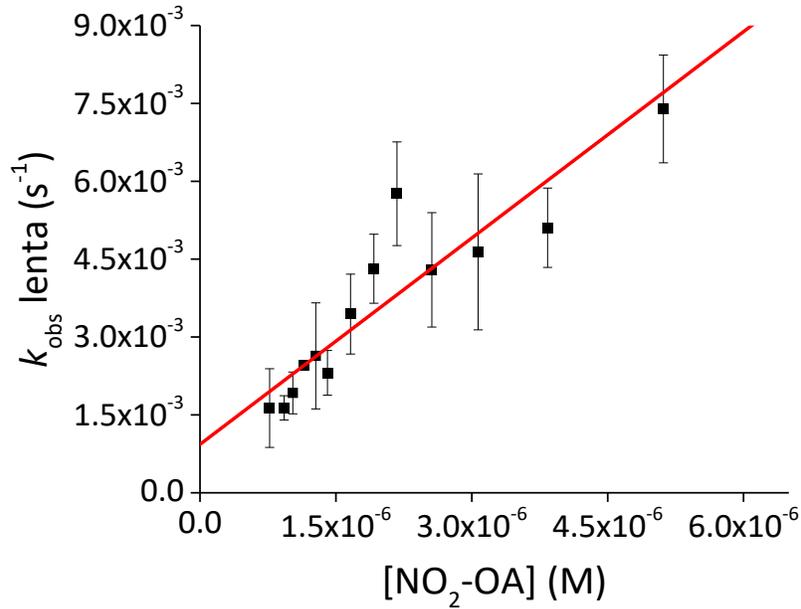
Para analizar la cinética de la fase lenta, se asumió una reacción reversible de Michael entre el NO<sub>2</sub>-OA y un residuo de la *EgTR<sub>wt</sub>* (Reacción 2, Ecuación 3). Según nuestra hipótesis, dicho residuo sería algún tiol de la *EgTR<sub>wt</sub>*. Considerando que la cinética es de pseudo primer orden (NO<sub>2</sub>-OA en exceso), la *k<sub>obs</sub>* lenta debería aumentar linealmente con la concentración de NO<sub>2</sub>-OA (Ecuación 4) (153).



$$\frac{d[NO_2OA]}{dt} = -k_{on}[EgTR_{wt}][NO_2OA] + k_{off}[EgTR_{wt}-NO_2OA] \quad \text{Ecuación 3}$$

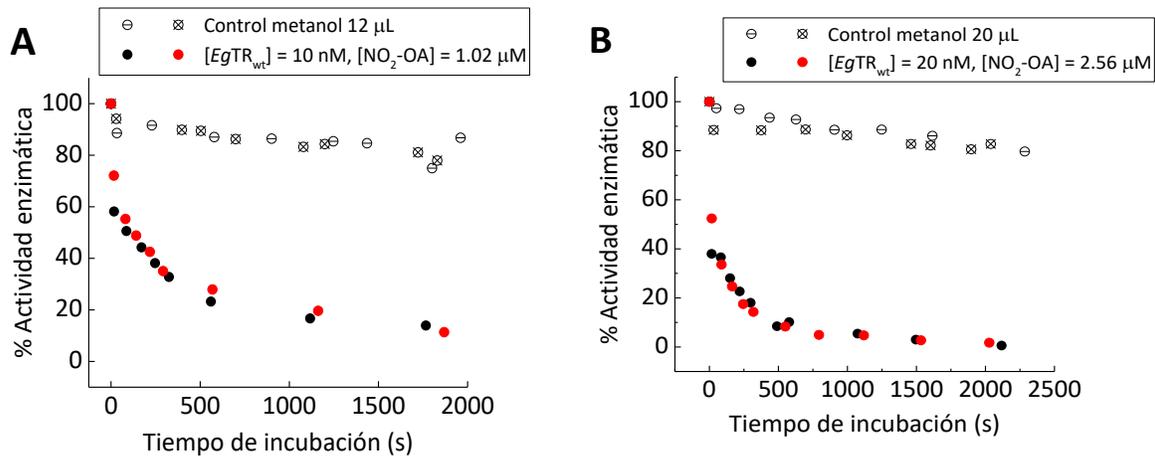
$$k_{obs} = k_{on}[NO_2OA] + k_{off} \quad \text{Ecuación 4}$$

Efectivamente, los datos mostraron que la *k<sub>obs</sub>* depende linealmente de la concentración de NO<sub>2</sub>-OA (Figura 40), confirmando que este paso de la reacción entre *EgTR<sub>wt</sub>* y NO<sub>2</sub>-OA es de primer orden para NO<sub>2</sub>-OA. De la pendiente del gráfico secundario (Ecuación 4) se calculó la constante de segundo orden de adición de Michael (*k<sub>on</sub>*), resultando en (1.3 ± 0.2) × 10<sup>3</sup> M<sup>–1</sup> s<sup>–1</sup> y de la ordenada en el origen se obtuvo la constante de eliminación de Michael (*k<sub>off</sub>*), obteniendo un valor de (9 ± 2) × 10<sup>–4</sup> s<sup>–1</sup>. Del cociente *k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>* se puede calcular la constante de inhibición (*K<sub>i</sub>* = 0.7 ± 0.2 μM).



**Figura 40. Dependencia de  $k_{obs}$  de la fase lenta con la concentración del inhibidor ( $\text{NO}_2\text{-OA}$ ).** Las concentraciones de  $EgTR_{wt}$  fueron: 10 nM para 0.77 – 2.17  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , 20 nM para 2.56 – 3.07  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , 29.5 nM para 3.84  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  y 40 nM para 5.11  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2\text{-OA}$ . Los datos representan el promedio y el desvío estándar de al menos  $n = 3$  experimentos independientes. El trazo rojo es el ajuste lineal a la Ecuación 4 ( $R^2 = 0.79$ ).

Se controló que el metanol, vehículo del  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , no inhiba a la  $EgTR_{wt}$ . Los controles muestran un  $\sim 20\%$  de pérdida de actividad enzimática en el transcurso de  $\sim 30$  min de reacción, lo cual no explica la inhibición observada por  $\text{NO}_2\text{-OA}$  (Figura 41).



**Figura 41. Controles de metanol.** Se muestra la actividad enzimática remanente como porcentaje respecto a la velocidad de estado estacionario sin  $\text{NO}_2\text{-OA}$  o metanol. **(A)** Control con 12  $\mu\text{L}$  de metanol ( $n = 2$ ), comparado con la inhibición por 6.4  $\mu\text{L}$  de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  en metanol ( $n = 2$ ), para  $EgTR_{wt}$  10 nM. **(B)** Control con 20  $\mu\text{L}$  de metanol ( $n = 2$ ), comparado con la inhibición por 14  $\mu\text{L}$  de  $\text{NO}_2\text{-OA}$  en metanol ( $n = 2$ ), para  $EgTR_{wt}$  20 nM.

Como perspectiva del estudio de esta reacción se realizarán controles análogos al de metanol, pero con ácido oleico en lugar de NO<sub>2</sub>-OA, para descartar que la inhibición sea por interacciones hidrofóbicas de la cadena hidrocarbonada del ácido graso, o iónicas del grupo carboxilato, con la enzima.

Existen pocos datos cinéticos de la reacción entre NO<sub>2</sub>-OA y tioles proteicos, y ninguno sobre selenoles proteicos. En la Tabla 1 se comparan algunas constantes cinéticas de adición y eliminación de Michael reportadas en la literatura. La *EgTR<sub>wt</sub>* reacciona ~3 veces más rápido con NO<sub>2</sub>-OA que la GAPDH, aunque no tan rápido como la GR de *S. cerevisiae*. Por su parte, la *K<sub>i</sub>* es una constante termodinámica de equilibrio, de disociación del complejo enzima-inhibidor. La *K<sub>i</sub>* nos indica la fuerza de unión entre el inhibidor y la enzima. Se puede ver que el NO<sub>2</sub>-OA se une con más fuerza a la GR que a la *EgTR<sub>wt</sub>*, y con más fuerza a la *EgTR<sub>wt</sub>* que a la GAPDH.

**Tabla 1: Constantes cinéticas de adición y eliminación de Michael entre proteínas y NO<sub>2</sub>-OA a pH 7.4 y 25 °C.**

Proteína	$k_{on} (M^{-1} s^{-1}) \times 10^3$	$k_{off} (s^{-1}) \times 10^{-4}$	$K_i (\mu M)$	Referencia
<i>EgTR<sub>wt</sub></i>	1.3 ± 0.2	9 ± 2	0.7 ± 0.2	Este trabajo
GAPDH	0.39 ± 0.06	32 ± 9	8 ± 4	(82)
ScGR	3.45 ± 0.04	4.4 ± 0.4	0.13 ± 0.01	(82)

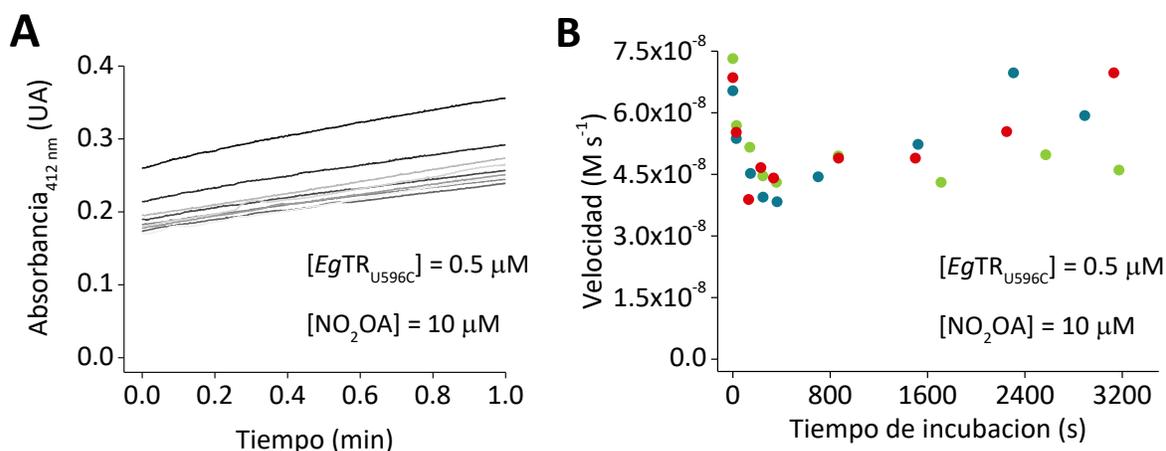
Por otra parte, el valor de *K<sub>i</sub>* obtenido en esta Tesina es comparable a los *K<sub>i</sub>* reportados para la inhibición de TR de rata por 4-HNE (0.8 ± 0.1 μM) y PGA<sub>2</sub> (4.5 ± 0.6 μM) (78), considerando solo la fase lenta de la reacción. Esto implica que la interacción entre la TR y el NO<sub>2</sub>-OA ocurre con una afinidad similar a la de otros lípidos electrófilos.

## 4.6 Reacción entre *EgTR<sub>U596C</sub>* y NO<sub>2</sub>-OA

Para probar nuestra hipótesis respecto a que la fase rápida de inhibición corresponde a la reacción del NO<sub>2</sub>-OA con la Sec, se midió la actividad enzimática remanente de la *EgTR<sub>U596C</sub>* preincubada con el nitroalqueno, como se hizo con la *EgTR<sub>wt</sub>*. Al mutar el residuo de Sec por Cys, se espera que la fase rápida de la cinética bifásica (Figura 39) se pierda.

Para los experimentos se utilizó *EgTR<sub>U596C</sub>* 0.5 μM, que fue la concentración más alta utilizada en la determinación de la *k<sub>cat</sub>* de la enzima (Figura 37), y se evaluó la reacción con NO<sub>2</sub>-OA 5, 10, 15 y 20 μM, para trabajar en condiciones de pseudo primer orden. Las concentraciones de NADPH (50 μM) y DTNB (1 mM) fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos con *EgTR<sub>wt</sub>*.

La velocidad inicial de la reacción fue obtenida de la pendiente de los cursos temporales en los primeros segundos de reacción, como se muestra para NO<sub>2</sub>-OA 10 μM (Figura 42A). La misma tiende a decaer exponencialmente hasta ~400 s, pero a mayor tiempo de incubación parece recuperarse hasta niveles similares a los del control sin NO<sub>2</sub>-OA, desviándose del ajuste esperado a exponencial simple (Figura 42B). Resultados similares se obtuvieron para NO<sub>2</sub>-OA 5, 15 y 20 μM (no se muestran), con lo cual, no se pudieron determinar las  $k_{obs}$  en estas condiciones de trabajo.



**Figura 42. Cinética de la reacción entre *EgTR*<sub>U596C</sub> y NO<sub>2</sub>-OA.** (A) Cursos temporales representativos de formación de TNB. Los trazos se aclaran a mayores tiempos de incubación con NO<sub>2</sub>-OA, el trazo más oscuro representa la reacción en ausencia de NO<sub>2</sub>-OA (el tiempo cero de incubación entre *EgTR*<sub>U596C</sub> y NO<sub>2</sub>-OA). Se mezclaron alícuotas de *EgTR*<sub>U596C</sub> (0.5 μM) tomadas a distintos tiempos de incubación con NO<sub>2</sub>-OA (10 μM), con NADPH 50 μM y DTNB 1.0 mM en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, EDTA 1.0 mM a 25 °C. (B) Velocidad inicial en función del tiempo de incubación con NO<sub>2</sub>-OA. Los datos representan tres experimentos independientes (n = 3).

El hecho de que no se pierda más actividad puede deberse a una reacción artefactual del DTNB con tioles de la *EgTR*<sub>U596C</sub>. Cuando se trabaja con la enzima mutante se debe aumentar la concentración de enzima ~5 veces respecto a la *EgTR*<sub>wt</sub> (considerando el total de enzima salvaje cuantificada por FAD, no solamente el ~10% de enzima activa), para apreciar la formación de TNB en tiempos de reacción similares. Cada monómero de la *EgTR*<sub>U596C</sub> tiene 14 tioles, por lo tanto, al agregar más enzima, también aumenta la concentraciones de tioles en la mezcla de reacción. Este aumento en la concentración de tioles hace que la reacción secundaria con DTNB deje de ser despreciable, como en el caso de la enzima salvaje.

Para descartar esto, se debe realizar un control en el que se exponga la enzima previamente reducida a DTNB. Para ello es necesario, luego de la reducción, eliminar el NADPH remanente para evitar que la enzima muestre actividad catalítica.

Si bien no es posible determinar constantes a partir de estos experimentos preliminares, sí es posible afirmar que se observan diferencias en la cinética respecto a la *EgTR*<sub>wt</sub>. Esta

diferencia podría ser debida a la falta del residuo de Sec, más sensible que la Cys a la nitroalquilación.

## 4.7 Análisis de sitios de nitroalquilación en *EgTR<sub>wt</sub>* por espectrometría de masas

Las modificaciones post-traduccionales de la *EgTR<sub>wt</sub>* por NO<sub>2</sub>-OA fueron analizadas por HPLC-MS/MS. La *EgTR<sub>wt</sub>* tiene 13 residuos de Cys y 15 de His. La incubación de *EgTR<sub>wt</sub>* con NO<sub>2</sub>-OA (27 μM) por 30 min a 25 °C resultó en la nitroalquilación de 6 Cys y 10 His (Tabla 2). Las 15 Met estaban oxidadas a metionina sulfóxido en la muestra control (con metanol) y problema. Luego de la incubación con NO<sub>2</sub>-OA se bloquearon los tioles con IAM. Todas las Cys se marcaron con IAM en el control y en la muestra problema (menos las que aparecieron nitroalquiladas). Si bien se vio el residuo de Sec en los péptidos de la digestión con tripsina, no estaba modificada por NO<sub>2</sub>-OA. Ninguna de las 6 Cys modificadas pertenece a los centros redox activos CX<sub>4</sub>C o GCUG que se sabe participan en la transferencia de electrones (60, 65).

No obstante, se ha propuesto que la Cys573 (que aparece nitroalquilada) podría estabilizar el extremo C-terminal flexible, donde está el centro redox GCUG, para que ocurra la catálisis (71). A su vez, la His570 es el residuo de la triada catalítica Glu/His/Sec, que actúa como catalizador ácido-base estabilizando el selenolato a través del catión imidazolio en la TR humana (32, 47) y la *EgTGR* (71). En nuestro caso, la His570 apareció nitroalquilada.

**Tabla 2: Análisis por HPLC–MS/MS de los residuos de *EgTR<sub>wt</sub>* modificados por NO<sub>2</sub>-OA.** El péptido líder que surge del clonado está subrayado ondeado. La etiqueta de poli-histidinas está en azul. Los centros redox activos están subrayados en negrita, y se indica la numeración de las Cys catalíticas. Los residuos modificados con NO<sub>2</sub>-OA se muestran resaltados. Los que están resaltados y en negrita cumplen una función importante en la catálisis. La numeración de los residuos se basa en la secuencia de la *EgTGR* cristalizada, PDB: 5W1J.

---

GSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSH<sub>105</sub>MKYDYDMVIIGGSGG  
LALAKESAKSGAKVALLDFVPTPMGTTWGLGGT**C<sub>156</sub>VNVGC<sub>161</sub>IPKCLMH<sub>168</sub>QA**  
ALLNH<sub>175</sub>YMEDAKSFGWDVDKGP**H<sub>192</sub>DWVKMVEGIQDH<sub>204</sub>IH<sub>206</sub>ALNFGYRSS**  
MMNANVKYLNALGEIVDP**H<sub>234</sub>TIKTTNKQGIVKNITNTIIVATGERPRYPPIPGAK**  
EYGITSDDLFLDHNP**PKTLCV**GASYVSLE**CAGFLSSIGCDVTVMVRSIFLRGFDQQ**  
MAGLVSDYMAKYGVK**FVRP****C<sub>347</sub>VPTSVRC<sub>354</sub>LEEYDPESGKLAIYEVEGKHEDGTP**  
FKDTFNTVLFVGRDP**C<sub>396</sub>TTNIGLQNV**DVKT**TNGRVVVDDEERTNVPNIYAIGDV**  
NNAGYQLTPLAIQAGK**NLARRLYTADD****C<sub>461</sub>RTDYTNVPTTVFTPLEYGC<sub>480</sub>IGLSEE**  
NAISKFGEDNIEVFHSYFQPLEWTV**PHRPDNTCYAKLIINKQDDNRVVGFH<sub>537</sub>VFG**  
PNAGEVTQGYAVAM**H<sub>555</sub>LGARKEDFDR**TIGI**H<sub>570</sub>PT****C<sub>573</sub>SETFTTLRVTKSSGASA**  
TVT**GC<sub>595</sub>U<sub>596</sub>G**

---

El abordaje utilizado podría mejorarse para detectar selectivamente si la Sec es nitroalquilada. La opción más sencilla es disminuir el pH de la reacción entre *EgTR<sub>wt</sub>* y NO<sub>2</sub>-OA a valores más cercanos al  $pK_a$  de la Sec (~5.2). De esta forma, las Cys tendrían su tiol protonado, con una baja reactividad, mientras que la Sec estaría completamente ionizada como selenolato, con alta reactividad hacia electrófilos (154). Igualmente, esto no reproduciría la condición de pH 7.4 de los ensayos cinéticos, invalidando asociaciones con la cinética bifásica observada (según la hipótesis inicial, que la fase rápida fuera la reacción con Sec y la fase lenta con Cys o His).

Para esto, se podría pensar en un método donde el tiempo de incubación entre *EgTR<sub>wt</sub>* y NO<sub>2</sub>-OA antes de bloquear los tioles con IAM sea menor, o incluso variar dicho tiempo para ver si hay diferencias en los sitios modificados por NO<sub>2</sub>-OA.

Una dificultad inherente a la reversibilidad de la reacción de Michael es que, al digerir la muestra con tripsina, el aducto *EgTR<sub>wt</sub>*-NO<sub>2</sub>-OA puede liberar NO<sub>2</sub>-OA, que a su vez puede volver a reaccionar con otros residuos nucleofílicos en la mezcla de péptidos, dando falsos positivos. Para solucionarlo, se podría optar por alquilar con dos agentes diferentes, uno que bloquee los tioles luego de la reacción con NO<sub>2</sub>-OA (como IAM) y otro que bloquee irreversiblemente los tioles que sufran la reacción de eliminación de Michael, liberando NO<sub>2</sub>-OA. La diferencia de masa entre los agentes delataría los residuos que estuvieron nitroalquilados. Otra alternativa es intercambiar los sitio nitroalquilados por polietilenglicol ("*PEG-switch assay*") y luego visualizar en un gel el cambio en la movilidad electroforética (155). Este último estudio indica cuántos residuos fueron modificados por NO<sub>2</sub>-OA, pero no cuáles son.

## 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se caracterizó el stock de NO<sub>2</sub>-OA con el que se trabajó por espectroscopía UV-Vis, RMN y HPLC. El mismo consiste en una mezcla equimolar de los regioisómeros 9-NO<sub>2</sub>-OA y 10-NO<sub>2</sub>-OA. Se determinaron los coeficientes de absorptividad molar en metanol ( $\epsilon_{259\text{ nm}} = 4498 \pm 28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y amortiguador fosfato a pH 7.4 ( $\epsilon_{272\text{ nm}} = 3437 \pm 141 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Asimismo, se determinó la concentración micelar crítica del NO<sub>2</sub>-OA en amortiguador fosfato pH 7.4 (CMC =  $65 \pm 17 \mu\text{M}$ ); propiedad importante que determina hasta qué concentración llegar en los experimentos de cinética para evitar la formación de micelas.

Por otro lado, se expresó la *EgTR*<sub>U596C</sub> de forma recombinante en *E. coli* a partir de un plásmido diseñado en el Laboratorio. Se logró optimizar la purificación de la proteína a partir de la fracción soluble por IMAC y SEC. Se determinó su  $k_{\text{cat}}$  aparente ( $0.31 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  a pH 7.4 y 25 °C) en condiciones de estado estacionario por ensayos con NADPH y DTNB como sustratos. Se comparó este resultado con la  $k_{\text{cat}}$  aparente de la *EgTR*<sub>wt</sub> ( $116 \pm 17 \text{ s}^{-1}$ ) determinada aquí, dando una diferencia catalítica de ~375 veces a favor de la forma salvaje. Esto muestra la importancia del residuo de Sec para la catálisis enzimática.

Evaluamos el NO<sub>2</sub>-OA como inhibidor de la *EgTR*<sub>wt</sub> en condiciones de pseudo-primer orden, con NADPH y DTNB como sustratos. Observamos que el NO<sub>2</sub>-OA inhibe la enzima de forma reversible y dependiente con el tiempo. La dependencia de la velocidad de estado estacionario con el tiempo de incubación con NO<sub>2</sub>-OA tiene una cinética bifásica, donde hay una primera fase rápida seguida de una fase lenta. Hipotetizamos que la fase rápida podría deberse a la reacción del NO<sub>2</sub>-OA con el residuo de Sec, y la fase lenta a la reacción con alguna Cys. Esto tiene lógica dada la mayor nucleofilia de la Sec en comparación con las Cys.

Para comprobar la hipótesis, se estudió la cinética de la reacción entre *EgTR*<sub>U596C</sub> y NO<sub>2</sub>-OA. Los datos de velocidad inicial en función del tiempo de incubación con NO<sub>2</sub>-OA no se pudieron ajustar, y, por tanto, no se obtuvieron constantes cinéticas, pero sí se observaron diferencias en el perfil cinético en comparación con la *EgTR*<sub>wt</sub>.

Para determinar los sitios de nitroalquilación en la *EgTR*<sub>wt</sub> se hizo HPLC-MS/MS. Se detectaron 6/13 Cys nitroalquiladas y 10/15 His. Dentro de los residuos nitroalquilados, la His570 y la Cys573 se plantea que cumplen una función en la catálisis. Se detectó el residuo de Sec pero no estaba modificado por NO<sub>2</sub>-OA.

En las perspectivas de este trabajo, se plantea estudiar la cinética de la fase rápida y determinar la constante de reacción entre *EgTR*<sub>wt</sub> y NO<sub>2</sub>-OA utilizando un equipo de flujo detenido. Para esto, se explorarán medidas de fluorescencia intrínseca, ya que la enzima

tiene cuatro residuos de triptófano, de los cuales el Trp185 y Trp509 están próximos al sitio activo donde está la Sec596.

En relación a la inhibición de la *EgTR*<sub>U596C</sub> se realizarán los controles para evaluar si la actividad observada se debe a un artefacto por reacción del DTNB con tioles. En caso que esto se confirme, se evaluarán otros métodos de determinación de la actividad enzimática. Por último, se repetirán los experimentos de HPLC–MS/MS con la *EgTR*<sub>wt</sub> y NO<sub>2</sub>-OA, mejorando el protocolo para evaluar si la Sec es nitroalquilada y se incluirán experimentos con la *EgTR*<sub>U596C</sub>.

## 6 REFERENCIAS

1. Alvarez, B., and Salinas, G. (2022) Chapter 1 - Basic concepts of thiol chemistry and biology. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols* (Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G., and Trujillo, M. eds), pp. 1–18, Academic Press, 10.1016/B978-0-323-90219-9.00026-1
2. Nagy, P., and Winterbourn, C. C. (2010) Redox Chemistry of Biological Thiols. in *Advances in Molecular Toxicology*, pp. 183–222, Elsevier, **4**, 183–222
3. Ferrer-Sueta, G. (2022) Chapter 2 - Chemical basis of cysteine reactivity and specificity: Acidity and nucleophilicity. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols* (Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G., and Trujillo, M. eds), pp. 19–58, Academic Press, 10.1016/B978-0-323-90219-9.00014-5
4. Ulrich, K., and Jakob, U. (2019) The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic. Biol. Med.* **140**, 14–27
5. Trujillo, M., Alvarez, B., and Radi, R. (2016) One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates. *Free Radic. Res.* **50**, 150–171
6. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 434–450
7. Zeida, A., and Radi, R. (2022) Chapter 5 - Thiol oxidation by biologically-relevant reactive species. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols* (Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G., and Trujillo, M. eds), pp. 99–113, Academic Press, 10.1016/B978-0-323-90219-9.00028-5
8. Carballal, S., Alvarez, B., Turell, L., Botti, H., Freeman, B. A., and Radi, R. (2007) Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids.* **32**, 543–551
9. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide-Reducing Enzymes in the Regulation of Free-Radical Processes. *Biochem. Mosc.* **86**, 1256–1274
10. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature.* **425**, 980–984
11. Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2021) The Enigma of 2-Cys Peroxiredoxins: What Are Their Roles? *Biochem. Mosc.* **86**, 84–91
12. Akter, S., Fu, L., Jung, Y., Conte, M. L., Lawson, J. R., Lowther, W. T., Sun, R., Liu, K., Yang, J., and Carroll, K. S. (2018) Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 995–1004
13. Radzinski, M., Oppenheim, T., Metanis, N., and Reichmann, D. (2021) The Cys Sense: Thiol Redox Switches Mediate Life Cycles of Cellular Proteins. *Biomolecules.* **11**, 469
14. Pinsent, J. (1954) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the *Coli-aerogenes* group of bacteria. *Biochem. J.* **57**, 10–16
15. Cone, J. E., Del Rio, R. M., Davis, J. N., and Stadtman, T. C. (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 2659–2663

16. Günzler, W. A., Steffens, G. J., Grossmann, A., Kim, S.-M. A., Ötting, F., Wendel, A., and Flohé, L. (1984) The Amino-Acid Sequence of Bovine Glutathione Peroxidase. **365**, 195–212
17. Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the ‘termination’ codon, TGA. *EMBO J.* **5**, 1221–1227
18. Zinoni, F., Birkmann, A., Leinfelder, W., and Bock, A. (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 3156–3160
19. Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C., and Bock, A. (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 4650–4654
20. Stadtman, T. C. (1987) Specific occurrence of selenium in enzymes and amino acid tRNAs. *FASEB J.* **1**, 375–379
21. Leinfelder, W., Zehelein, E., MandrandBerthelot, M., and Bock, A. (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature.* **331**, 723–725
22. Palioura, S., Sherrer, R. L., Steitz, T. A., Söll, D., and Simonović, M. (2009) The Human SepSecS-tRNA<sup>Sec</sup> Complex Reveals the Mechanism of Selenocysteine Formation. *Science.* **325**, 321–325
23. Howard, M. T., and Copeland, P. R. (2019) New Directions for Understanding the Codon Redefinition Required for Selenocysteine Incorporation. *Biol. Trace Elem. Res.* **192**, 18–25
24. Serrão, V. H. B., and Scortecci, J. F. (2020) Why Selenocysteine Is Unique? *Front. Mol. Biosci.* **7**, 2
25. Itoh, Y., Bröcker, M. J., Sekine, S., Hammond, G., Suetsugu, S., Söll, D., and Yokoyama, S. (2013) Decameric SelA•tRNA<sup>Sec</sup> Ring Structure Reveals Mechanism of Bacterial Selenocysteine Formation. *Science.* **340**, 75–78
26. Serrão, V. H. B., Fernandes, A. de F., Basso, L. G. M., Scortecci, J. F., Crusca Júnior, E., Cornélio, M. L., de Souza, B. M., Palma, M. S., de Oliveira Neto, M., and Thiemann, O. H. (2021) The Specific Elongation Factor to Selenocysteine Incorporation in *Escherichia coli*: Unique tRNA<sup>Sec</sup> Recognition and its Interactions. *J. Mol. Biol.* **433**, 167279
27. Chung, C. Z., Miller, C., Söll, D., and Krahn, N. (2021) Introducing Selenocysteine into Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Protoc.* 10.1002/cpz1.54
28. Wessjohann, L. A., Schneider, A., Abbas, M., and Brandt, W. (2007) Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biol. Chem.* 10.1515/BC.2007.138
29. Pleasants, J. C., Guo, W., and Rabenstein, D. L. (1989) A comparative study of the kinetics of selenol/diselenide and thiol/disulfide exchange reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6553–6558
30. Huber, R. E., and Criddle, R. S. (1967) Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 164–173

31. Nauser, T., Steinmann, D., and Koppenol, W. H. (2012) Why do proteins use selenocysteine instead of cysteine? *Amino Acids*. **42**, 39–44
32. Hondal, R. J., and Ruggles, E. L. (2011) Differing views of the role of selenium in thioredoxin reductase. *Amino Acids*. **41**, 73–89
33. Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M., and Sies, H. (2003) Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 4742–4758
34. Nauser, T., Steinmann, D., Grassi, G., and Koppenol, W. H. (2014) Why Selenocysteine Replaces Cysteine in Thioredoxin Reductase: A Radical Hypothesis. *Biochemistry*. **53**, 5017–5022
35. Snider, G. W., Ruggles, E., Khan, N., and Hondal, R. J. (2013) Selenocysteine Confers Resistance to Inactivation by Oxidation in Thioredoxin Reductase: Comparison of Selenium and Sulfur Enzymes. *Biochemistry*. **52**, 5472–5481
36. Ste. Marie, E. J., Wehrle, R. J., Haupt, D. J., Wood, N. B., van der Vliet, A., Previs, M. J., Masterson, D. S., and Hondal, R. J. (2020) Can Selenoenzymes Resist Electrophilic Modification? Evidence from Thioredoxin Reductase and a Mutant Containing  $\alpha$ -Methylselenocysteine. *Biochemistry*. **59**, 3300–3315
37. Arnér, E. S. J. (2020) Common modifications of selenocysteine in selenoproteins. *Essays Biochem.* **64**, 45–53
38. Bindoli, A., Fukuto, J. M., and Forman, H. J. (2008) Thiol Chemistry in Peroxidase Catalysis and Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1549–1564
39. Sies, H., and Ursini, F. (2022) Homeostatic control of redox status and health. *IUBMB Life*. **74**, 24–28
40. Mohammadi, F., Soltani, A., Ghahremanloo, A., Javid, H., and Hashemy, S. I. (2019) The thioredoxin system and cancer therapy: a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **84**, 925–935
41. Zhang, Y., Roh, Y. J., Han, S.-J., Park, I., Lee, H. M., Ok, Y. S., Lee, B. C., and Lee, S.-R. (2020) Role of Selenoproteins in Redox Regulation of Signaling and the Antioxidant System: A Review. *Antioxidants*. **9**, 383
42. Arnér, E. S. J. (2022) Chapter 10 - Thioredoxin and glutathione reductases. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols* (Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G., and Trujillo, M. eds), pp. 197–218, Academic Press, 10.1016/B978-0-323-90219-9.00009-1
43. Yi, M. C., and Khosla, C. (2016) Thiol–Disulfide Exchange Reactions in the Mammalian Extracellular Environment. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **7**, 197–222
44. Jenny, K. A., Mose, G., Haupt, D. J., and Hondal, R. J. (2022) Oxidized Forms of Ergothioneine Are Substrates for Mammalian Thioredoxin Reductase. *Antioxidants*. **11**, 185
45. Zhong, L., and Holmgren, A. (2000) Essential Role of Selenium in the Catalytic Activities of Mammalian Thioredoxin Reductase Revealed by Characterization of Recombinant Enzymes with Selenocysteine Mutations. *J. Biol. Chem.* **275**, 18121–18128
46. Brandt, W., and Wessjohann, L. A. (2005) The Functional Role of Selenocysteine (Sec) in the Catalysis Mechanism of Large Thioredoxin Reductases: Proposition of a Swapping Catalytic Triad Including a Sec-His-Glu State. *ChemBioChem*. **6**, 386–394

47. Gromer, S., Wessjohann, L. A., Eubel, J., and Brandt, W. (2006) Mutational Studies Confirm the Catalytic Triad in the Human Selenoenzyme Thioredoxin Reductase Predicted by Molecular Modeling. *ChemBioChem*. **7**, 1649–1652
48. Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M.-E., and Cuperlovic-Culf, M. (2020) Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. **10**, 1429
49. Casulli, A., Siles-Lucas, M., and Tamarozzi, F. (2019) Echinococcus granulosus sensu lato. *Trends Parasitol*. **35**, 663–664
50. Brehm, K., and Koziol, U. (2017) Echinococcus–Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. in *Advances in Parasitology*, pp. 147–212, Elsevier, **95**, 147–212
51. Holcman, B., Heath, D. D., and Shaw, R. J. (1994) Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestode development of Echinococcus granulosus. *Int. J. Parasitol*. **24**, 623–635
52. Irabedra, P., Ferreira, C., Sayes, J., Elola, S., Rodríguez, M., Morel, N., Segura, S., Santos, E. dos, and Guisantes, J. A. (2016) Control programme for cystic echinococcosis in Uruguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **111**, 372–377
53. Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M. K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D. P., Chen, Z., Zhou, Y., and Wang, S. (2013) The genome of the hydatid tapeworm Echinococcus granulosus. *Nat. Genet*. **45**, 1168–1175
54. Brunetti, E., Kern, P., and Vuitton, D. A. (2010) Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop*. **114**, 1–16
55. Purriel, P., Schantz, P. M., Beovide, H., and Mendoza, G. (1973) Human echinococcosis (hydatidosis) in Uruguay: a comparison of indices of morbidity and mortality, 1962–71. *Bull. World Health Organ*. **49**, 395–402
56. Williams, D. L., Bonilla, M., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2012) Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent Redox Networks in Platyhelminth Parasites. *Antioxid. Redox Signal*. **19**, 735–745
57. Salinas, G., Selkirk, M. E., Chalar, C., Maizels, R. M., and Fernández, C. (2004) Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol*. **20**, 340–346
58. Allen, J. E., and Maizels, R. M. (2011) Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol*. **11**, 375–388
59. Cancela, M., Paes, J. A., Moura, H., Barr, J. R., Zaha, A., and Ferreira, H. B. (2019) Unraveling oxidative stress response in the cestode parasite Echinococcus granulosus. *Sci. Rep*. **9**, 15876
60. Bonilla, M., Denicola, A., Marino, S. M., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2011) Linked Thioredoxin-Glutathione Systems in Platyhelminth Parasites. *J. Biol. Chem*. **286**, 4959–4967
61. Bonilla, M., Denicola, A., Novoselov, S. V., Turanov, A. A., Protasio, A., Izmendi, D., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2008) Platyhelminth Mitochondrial and Cytosolic Redox Homeostasis Is Controlled by a Single Thioredoxin Glutathione Reductase and Dependent on Selenium and Glutathione. *J. Biol. Chem*. **283**, 17898–17907

62. Agorio, A., Chalar, C., Cardozo, S., and Salinas, G. (2003) Alternative mRNAs Arising from Trans-splicing Code for Mitochondrial and Cytosolic Variants of *Echinococcus granulosus* Thioredoxin Glutathione Reductase. *J. Biol. Chem.* **278**, 12920–12928
63. Otero, L., Bonilla, M., Protasio, A. V., Fernández, C., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2010) Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths. *BMC Genomics.* **11**, 237
64. Prast-Nielsen, S., Huang, H.-H., and Williams, D. L. (2011) Thioredoxin glutathione reductase: Its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1810**, 1262–1271
65. Huang, H.-H., Day, L., Cass, C. L., Ballou, D. P., Williams, C. H., and Williams, D. L. (2011) Investigations of the Catalytic Mechanism of Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry.* **50**, 5870–5882
66. Kuntz, A. N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A. A., Califf, L. L., Dessolin, J., Arnér, E. S. J., and Williams, D. L. (2007) Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. *PLoS Med.* **4**, 1071–1086
67. Rendón, J. (2004) Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol. Biochem. Parasitol.* **133**, 61–69
68. Sun, Q.-A., Kirnarsky, L., Sherman, S., and Gladyshev, V. N. (2001) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3673–3678
69. Kalita, P., Shukla, H., Shukla, R., and Tripathi, T. (2018) Biochemical and thermodynamic comparison of the selenocysteine containing and non-containing thioredoxin glutathione reductase of *Fasciola gigantica*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1862**, 1306–1316
70. Angelucci, F., Dimastrogiovanni, D., Boumis, G., Brunori, M., Miele, A. E., Saccoccia, F., and Bellelli, A. (2010) Mapping the Catalytic Cycle of *Schistosoma mansoni* Thioredoxin Glutathione Reductase by X-ray Crystallography. *J. Biol. Chem.* **285**, 32557–32567
71. Salinas, G., Gao, W., Wang, Y., Bonilla, M., Yu, L., Novikov, A., Virginio, V. G., Ferreira, H. B., Vieites, M., Gladyshev, V. N., Gambino, D., and Dai, S. (2017) The Enzymatic and Structural Basis for Inhibition of *Echinococcus granulosus* Thioredoxin Glutathione Reductase by Gold(I). *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 1491–1504
72. Angelucci, F., Sayed, A. A., Williams, D. L., Boumis, G., Brunori, M., Dimastrogiovanni, D., Miele, A. E., Pauly, F., and Bellelli, A. (2009) Inhibition of *Schistosoma mansoni* Thioredoxin-glutathione Reductase by Auranofin. *J. Biol. Chem.* **284**, 28977–28985
73. Fata, F., Gencheva, R., Cheng, Q., Lullo, R., Ardini, M., Silvestri, I., Gabriele, F., Ippoliti, R., Bulman, C. A., Sakanari, J. A., Williams, D. L., Arnér, E. S. J., and Angelucci, F. (2022) Biochemical and structural characterizations of thioredoxin reductase selenoproteins of the parasitic filarial nematodes *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus*. *Redox Biol.* **51**, 102278
74. Angelucci, F., Miele, A. E., Boumis, G., Dimastrogiovanni, D., Brunori, M., and Bellelli, A. (2008) Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: The structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase: Structure of SmTGR from *Schistosoma mansoni*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **72**, 936–945

75. Gencheva, R., Cheng, Q., and Arnér, E. S. J. (2022) Thioredoxin reductase selenoproteins from different organisms as potential drug targets for treatment of human diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **190**, 320–338
76. Ross, F., Hernández, P., Porcal, W., López, G. V., Cerecetto, H., González, M., Basika, T., Carmona, C., Fló, M., Maggioli, G., Bonilla, M., Gladyshev, V. N., Boiani, M., and Salinas, G. (2012) Identification of Thioredoxin Glutathione Reductase Inhibitors That Kill Cestode and Trematode Parasites. *PLoS ONE*. **7**, e35033
77. Pickering, I. J., Cheng, Q., Rengifo, E. M., Nehzati, S., Dolgova, N. V., Kroll, T., Sokaras, D., George, G. N., and Arnér, E. S. J. (2020) Direct Observation of Methylmercury and Auranofin Binding to Selenocysteine in Thioredoxin Reductase. *Inorg. Chem.* **59**, 2711–2718
78. Cassidy, P. B., Edes, K., Nelson, C. C., Parsawar, K., Fitzpatrick, F. A., and Moos, P. J. (2006) Thioredoxin reductase is required for the inactivation of tumor suppressor p53 and for apoptosis induced by endogenous electrophiles. *Carcinogenesis*. **27**, 2538–2549
79. Sauerland, M. B., and Davies, M. J. (2022) Electrophile versus oxidant modification of cysteine residues: Kinetics as a key driver of protein modification. *Arch. Biochem. Biophys.* **727**, 109344
80. Moos, P. J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E., and Fitzpatrick, F. A. (2003) Electrophilic Prostaglandins and Lipid Aldehydes Repress Redox-sensitive Transcription Factors p53 and Hypoxia-inducible Factor by Impairing the Selenoprotein Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Chem.* **278**, 745–750
81. Fang, J., and Holmgren, A. (2006) Inhibition of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase by 4-Hydroxy-2-nonenal in Vitro and in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1879–1885
82. Jobbagy, S., Vitturi, D. A., Salvatore, S. R., Turell, L., Pires, M. F., Kansanen, E., Batthyany, C., Lancaster, J. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2019) Electrophiles modulate glutathione reductase activity via alkylation and upregulation of glutathione biosynthesis. *Redox Biol.* **21**, 1–15
83. Freeman, B. A., O'Donnell, V. B., and Schopfer, F. J. (2018) The discovery of nitro-fatty acids as products of metabolic and inflammatory reactions and mediators of adaptive cell signaling. *Nitric Oxide*. **77**, 106–111
84. Woodcock, S. R., Bonacci, G., Gelhaus, S. L., and Schopfer, F. J. (2013) Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **59**, 14–26
85. Woodcock, S. R., Salvatore, S. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2021) Synthesis of 9- and 12-nitro conjugated linoleic acid: Regiospecific isomers of naturally occurring conjugated nitrodienes. *Tetrahedron Lett.* **81**, 153371
86. Woodcock, S. R., Marwitz, A. J. V., Bruno, P., and Branchaud, B. P. (2006) Synthesis of Nitrolipids. All Four Possible Diastereomers of Nitrooleic Acids: ( *E* )- and ( *Z* )-, 9- and 10-Nitro-octadec-9-enoic Acids. *Org. Lett.* **8**, 3931–3934
87. Khoo, N. K., and Schopfer, F. J. (2019) Nitrated fatty acids: from diet to disease. *Curr. Opin. Physiol.* **9**, 67–72
88. Delmastro-Greenwood, M., Hughan, K. S., Vitturi, D. A., Salvatore, S. R., Grimes, G., Potti, G., Shiva, S., Schopfer, F. J., Gladwin, M. T., Freeman, B. A., and Gelhaus Wendell, S. (2015) Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 333–341

89. Hansen, A. L., Buchan, G. J., Rühl, M., Mukai, K., Salvatore, S. R., Ogawa, E., Andersen, S. D., Iversen, M. B., Thielke, A. L., Gunderstofte, C., Motwani, M., Møller, C. T., Jakobsen, A. S., Fitzgerald, K. A., Roos, J., Lin, R., Maier, T. J., Goldbach-Mansky, R., Miner, C. A., Qian, W., Miner, J. J., Rigby, R. E., Rehwinkel, J., Jakobsen, M. R., Arai, H., Taguchi, T., Schopfer, F. J., Olagnier, D., and Holm, C. K. (2018) Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E7768–E7775
90. Fazzari, M., Vitturi, D., Valderrama, R., Barroso, J. B., Radi, R., Freeman, B. A., and Rubbo, H. (2014) Olives and Olive Oil Are Sources of Electrophilic Fatty Acid Nitroalkenes. *PLOS ONE*. **9**, 9
91. Sánchez-Calvo, B., Mastrogiovanni, M., Santos, M., Petingi, S., Conde-Innamorato, P., Arias-Sibillotte, M., Ibáñez, F., Trostchansky, A., and Rubbo, H. (2022) Detection of Nitro-Conjugated Linoleic Acid and Nitro-oleic Acid in Virgin Olive Oil under Gastric Conditions: Relationship to Cultivar, Fruit Ripening, and Polyphenol Content. *ACS Food Sci. Technol.* 10.1021/acsfoodscitech.1c00477
92. Buchan, G. J., Bonacci, G., Fazzari, M., Salvatore, S. R., and Gelhaus Wendell, S. (2018) Nitro-fatty acid formation and metabolism. *Nitric Oxide*. **79**, 38–44
93. Vitturi, D. A., Minarrieta, L., Salvatore, S. R., Postlethwait, E. M., Fazzari, M., Ferrer-Sueta, G., Lancaster, J. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2015) Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 504–510
94. O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P., Chumley, P. H., Jablonsky, M. J., Krishna, N. R., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V. M., and Freeman, B. A. (1999) Nitration of Unsaturated Fatty Acids by Nitric Oxide-Derived Reactive Nitrogen Species Peroxynitrite, Nitrous Acid, Nitrogen Dioxide, and Nitronium Ion. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 83–92
95. Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M., and Nowak, J. (2015) PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv. Clin. Exp. Med.* **24**, 931–941
96. Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Gladwin, M. T. (2008) The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 156–167
97. Baker, P. R. S., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M. S., Branchaud, B. P., Chen, Y. E., and Freeman, B. A. (2005) Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: *MULTIPLE NITRATED UNSATURATED FATTY ACID DERIVATIVES EXIST IN HUMAN BLOOD AND URINE AND SERVE AS ENDOGENOUS PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR LIGANDS*. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464–42475
98. Fazzari, M., Khoo, N., Woodcock, S. R., Li, L., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2015) Generation and esterification of electrophilic fatty acid nitroalkenes in triacylglycerides. *Free Radic. Biol. Med.* **87**, 113–124
99. Bonacci, G., Baker, P. R. S., Salvatore, S. R., Shores, D., Khoo, N. K. H., Koenitzer, J. R., Vitturi, D. A., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Cole, M. P., Watkins, S., St. Croix, C., Batthyany, C. I., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2012) Conjugated Linoleic Acid Is a Preferential Substrate for Fatty Acid Nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082
100. Mastrogiovanni, M., Trostchansky, A., and Rubbo, H. (2020) Fatty acid nitration in human low-density lipoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **679**, 108190

101. Möller, M. N., Li, Q., Lancaster, J. R., and Denicola, A. (2007) Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB Life*. **59**, 243–248
102. Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* **269**, 26066–26075
103. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49–58
104. Rubbo, H., Parthasarathy, S., Barnes, S., Kirk, M., Kalyanaraman, B., and Freeman, B. A. (1995) 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
105. Trostchansky, A., and Rubbo, H. (2008) Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1887–1896
106. Tsikas, D., Zoerner, A. A., Mitschke, A., and Gutzki, F.-M. (2009) Nitro-fatty Acids Occur in Human Plasma in the Picomolar Range: a Targeted Nitro-lipidomics GC–MS/MS Study. *Lipids*. **44**, 855–865
107. Rudolph, V., Schopfer, F. J., Khoo, N. K. H., Rudolph, T. K., Cole, M. P., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Groeger, A. L., Golin-Bisello, F., Chen, C.-S., Baker, P. R. S., and Freeman, B. A. (2009) Nitro-fatty Acid Metabolome: Saturation, Desaturation,  $\beta$ -Oxidation, and Protein Adduction\*. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461–1473
108. Fazzari, M., Khoo, N. K. H., Woodcock, S. R., Jorkasky, D. K., Li, L., Schopfer, F. J., and Freeman, B. A. (2017) Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. *J. Lipid Res.* **58**, 375–385
109. Vitturi, D. A., Chen, C.-S., Woodcock, S. R., Salvatore, S. R., Bonacci, G., Koenitzer, J. R., Stewart, N. A., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2013) Modulation of Nitro-fatty Acid Signaling: *PROSTAGLANDIN REDUCTASE-1 IS A NITROALKENE REDUCTASE*. *J. Biol. Chem.* **288**, 25626–25637
110. Fazzari, M., Vitturi, D. A., Woodcock, S. R., Salvatore, S. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2019) Electrophilic fatty acid nitroalkenes are systemically transported and distributed upon esterification to complex lipids. *J. Lipid Res.* **60**, 388–399
111. Dennis, E. A., and Norris, P. C. (2015) Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 511–523
112. Zatloukalova, M., Mojovic, M., Pavicevic, A., Kabelac, M., Freeman, B. A., Pekarova, M., and Vacek, J. (2019) Redox properties and human serum albumin binding of nitro-oleic acid. *Redox Biol.* **24**, 101213
113. Schopfer, F. J., Batthyany, C., Baker, P. R. S., Bonacci, G., Cole, M. P., Rudolph, V., Groeger, A. L., Rudolph, T. K., Nadtochiy, S., Brookes, P. S., and Freeman, B. A. (2009) Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1250–1259

114. Schopfer, F. J., and Khoo, N. K. H. (2019) Nitro-Fatty Acid Logistics: Formation, Biodistribution, Signaling, and Pharmacology. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 505–519
115. Alexander, R. L., Bates, D. J. P., Wright, M. W., King, S. B., and Morrow, C. S. (2006) Modulation of Nitrated Lipid Signaling by Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1): Glutathione Conjugation and MRP1-Mediated Efflux Inhibit Nitrooleic Acid-Induced, PPAR $\gamma$ -Dependent Transcription Activation. *Biochemistry.* **45**, 7889–7896
116. Bates, D. J. P., Lively, M. O., Gorczynski, M. J., King, S. B., Townsend, A. J., and Morrow, C. S. (2009) Noncatalytic Interactions between Glutathione S-Transferases and Nitroalkene Fatty Acids Modulate Nitroalkene-Mediated Activation of Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ . *Biochemistry.* **48**, 4159–4169
117. Salvatore, S. R., Vitturi, D. A., Baker, P. R. S., Bonacci, G., Koenitzer, J. R., Woodcock, S. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2013) Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J. Lipid Res.* **54**, 1998–2009
118. Salvatore, S. R., Rowart, P., and Schopfer, F. J. (2021) Mass spectrometry-based study defines the human urine nitrolipidome. *Free Radic. Biol. Med.* **162**, 327–337
119. Salvatore, S. R., Vitturi, D. A., Fazzari, M., Jorkasky, D. K., and Schopfer, F. J. (2017) Evaluation of 10-Nitro Oleic Acid Bio-Elimination in Rats and Humans. *Sci. Rep.* **7**, 39900
120. Delmastro-Greenwood, M., Freeman, B. A., and Wendell, S. G. (2014) Redox-Dependent Anti-Inflammatory Signaling Actions of Unsaturated Fatty Acids. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 79–105
121. Schopfer, F. J., and Vitturi, D. A. (2022) Chapter 9 - Thiol modification and signaling by biological electrophiles. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols* (Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G., and Trujillo, M. eds), pp. 177–196, Academic Press, 10.1016/B978-0-323-90219-9.00027-3
122. Turell, L., Steglich, M., and Alvarez, B. (2018) The chemical foundations of nitroalkene fatty acid signaling through addition reactions with thiols. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **78**, 161–169
123. Turell, L., Vitturi, D. A., Coitiño, E. L., Lebrato, L., Möller, M. N., Sagasti, C., Salvatore, S. R., Woodcock, S. R., Alvarez, B., and Schopfer, F. J. (2017) The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid. *J. Biol. Chem.* **292**, 1145–1159
124. Baker, L. M. S., Baker, P. R. S., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R., and Freeman, B. A. (2007) Nitro-fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine: Kinetic Analysis of Thiol Alkylation by a Michael Addition Reaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 31085–31093
125. Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R. S., Durán, R., Baker, L. M. S., Huang, Y., Cerveñansky, C., Branchaud, B. P., and Freeman, B. A. (2006) Reversible Post-translational Modification of Proteins by Nitrated Fatty Acids in Vivo. **281**, 20450–20463
126. Kelley, E. E., Batthyany, C. I., Hundley, N. J., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Del Rio, J. M., Schopfer, F. J., Lancaster, J. R., Freeman, B. A., and Tarpey, M. M. (2008) Nitro-oleic Acid, a Novel and Irreversible Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **283**, 36176–36184

127. Awwad, K., Steinbrink, S. D., Frömel, T., Lill, N., Isaak, J., Häfner, A.-K., Roos, J., Hofmann, B., Heide, H., Geisslinger, G., Steinhilber, D., Freeman, B. A., Maier, T. J., and Fleming, I. (2014) Electrophilic Fatty Acid Species Inhibit 5-Lipoxygenase and Attenuate Sepsis-Induced Pulmonary Inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2667–2680
128. Schopfer, F. J., Cole, M. P., Groeger, A. L., Chen, C.-S., Khoo, N. K. H., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Motanya, U. N., Li, Y., Zhang, J., Garcia-Barrío, M. T., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Bonacci, G., Baker, P. R. S., Xu, H. E., Batthyany, C. I., Chen, Y. E., Hallis, T. M., and Freeman, B. A. (2010) Covalent Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Adduction by Nitro-fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–12333
129. Chen, J.-H., and Hu, C.-H. (2019) Electrophilic additions of nitrated fatty acids with biological thiols: comparison with type-2 alkenes. *Theor. Chem. Acc.* **138**, 1–7
130. Aranda-Caño, L., Valderrama, R., Pedrajas, J. R., Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Padilla, M. N., Melguizo, M., López-Jaramillo, F. J., and Barroso, J. B. (2022) Nitro-Oleic Acid-Mediated Nitroalkylation Modulates the Antioxidant Function of Cytosolic Peroxiredoxin Tsa1 during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants.* **11**, 972
131. Rom, O., Khoo, N. K. H., Chen, Y. E., and Villacorta, L. (2018) Inflammatory signaling and metabolic regulation by nitro-fatty acids. *Nitric Oxide.* **78**, 140–145
132. Lamas Bervejillo, M., and Ferreira, A. M. (2019) Understanding Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From the Structure to the Regulatory Actions on Metabolism. in *Bioactive Lipids in Health and Disease* (Trostchansky, A., and Rubbo, H. eds), pp. 39–57, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer International Publishing, Cham, **1127**, 39–57
133. Lamas Bervejillo, M., Bonanata, J., Franchini, G. R., Richeri, A., Marqués, J. M., Freeman, B. A., Schopfer, F. J., Coitiño, E. L., Córscico, B., Rubbo, H., and Ferreira, A. M. (2020) A FABP4-PPAR $\gamma$  signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol.* **29**, 101376
134. Deen, A. J., Sihvola, V., Härkönen, J., Patinen, T., Adinolfi, S., and Levonen, A.-L. (2018) Regulation of stress signaling pathways by nitro-fatty acids. *Nitric Oxide.* **78**, 170–175
135. Kansanen, E., Jyrkkänen, H.-K., Volger, O. L., Leinonen, H., Kivelä, A. M., Häkkinen, S.-K., Woodcock, S. R., Schopfer, F. J., Horrevoets, A. J., Ylä-Herttuala, S., Freeman, B. A., and Levonen, A.-L. (2009) Nrf2-dependent and -independent Responses to Nitro-fatty Acids in Human Endothelial Cells: IDENTIFICATION OF HEAT SHOCK RESPONSE AS THE MAJOR PATHWAY ACTIVATED BY NITRO-OLEIC ACID. *J. Biol. Chem.* **284**, 33233–33241
136. Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Ylä-Herttuala, S., Freeman, B. A., and Levonen, A.-L. (2011) Electrophilic Nitro-fatty Acids Activate Nrf2 by a Keap1 Cysteine 151-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 14019–14027
137. Vazquez, M. M., Gutierrez, M. V., Salvatore, S. R., Puiatti, M., Dato, V. A., Chiabrando, G. A., Freeman, B. A., Schopfer, F. J., and Bonacci, G. (2020) Nitro-oleic acid, a ligand of CD36, reduces cholesterol accumulation by modulating oxidized-LDL uptake and cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. *Redox Biol.* **36**, 101591

138. Taniguchi, K., and Karin, M. (2018) NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 309–324
139. Cui, T., Schopfer, F. J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker Paul, R. S., Batthyany, C., Chacko, B. K., Feng, X., Patel, R. P., Agarwal, A., Freeman, B. A., and Chen, Y. E. (2006) Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-inflammatory Signaling Mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–35698
140. Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R. S., Ramani, R., and Freeman, B. A. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166
141. Reddy, A. T., Lakshmi, S. P., and Reddy, R. C. (2012) The Nitrated Fatty Acid 10-Nitrooleate Diminishes Severity of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *PPAR Res.* **2012**, 1–12
142. Mabrouk, M. M., Hamed, N. A., and Mansour, F. R. (2021) Spectroscopic methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants; a comprehensive review. *Appl. Spectrosc. Rev.* **56**, 1–29
143. Arnér, E. S. J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Holmgren, A., and Böck, A. (1999) High-level expression in *Escherichia coli* of selenocysteine-containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterial-type SECIS elements and co-expression with the selA, selB and selC genes<sup>11</sup>Edited by M. Gottesman. *J. Mol. Biol.* **292**, 1003–1016
144. Arnér, E. S. J., Zhong, L., and Holmgren, A. (1999) Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. in *Methods in Enzymology*, pp. 226–239, Elsevier, **300**, 226–239
145. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77
146. Riddles, P. W., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1979) Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Anal. Biochem.* **94**, 75–81
147. Riener, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 266–276
148. Fameau, A.-L., Arnould, A., and Saint-Jalmes, A. (2014) Responsive self-assemblies based on fatty acids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **19**, 471–479
149. Grippo, V., Mojovic, M., Pavicevic, A., Kabelac, M., Hubatka, F., Turanek, J., Zatloukalova, M., Freeman, B. A., and Vacek, J. (2021) Electrophilic characteristics and aqueous behavior of fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol.* **38**, 101756
150. Macheroux, P. (1999) UV-Visible Spectroscopy as a Tool to Study Flavoproteins. in *Flavoprotein Protocols*, pp. 1–8, Humana Press, New Jersey, **131**, 1–8
151. Brandstaedter, C., Fritz-Wolf, K., Weder, S., Fischer, M., Hecker, B., Rahlfs, S., and Becker, K. (2018) Kinetic characterization of wild-type and mutant human thioredoxin glutathione reductase defines its reaction and regulatory mechanisms. *FEBS J.* **285**, 542–558
152. Rendón, J. L., Miranda-Leyva, M., Guevara-Flores, A., Martínez-González, J. de J., del Arenal, I. P., Flores-Herrera, O., and Pardo, J. P. (2018) Insight into the Mechanistic Basis

- of the Hysteretic-Like Kinetic Behavior of Thioredoxin-Glutathione Reductase (TGR). *Enzyme Res.* **2018**, 1–17
153. Espenson, J. H. (1981) *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, McGraw-Hill
154. Bak, D. W., Gao, J., Wang, C., and Weerapana, E. (2018) A Quantitative Chemoproteomic Platform to Monitor Selenocysteine Reactivity within a Complex Proteome. *Cell Chem. Biol.* **25**, 1157-1167.e4
155. Burgoyne, J. R., Oviolu, O., and Eaton, P. (2013) The PEG-switch assay: A fast semi-quantitative method to determine protein reversible cysteine oxidation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **68**, 297–301