



Tesina presentada con el objetivo de obtener el título de Licenciada en Bioquímica

Reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos por peroxirredoxina 3 humana

Giuliana Cardozo González

Orientador: Dr. Aníbal Marcelo Reyes

Co-orientadora: Dra. Madia Trujillo

Centro de Investigaciones Biomédicas y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2023

AGRADECIMIENTOS

A Madia, por darme la oportunidad de formar parte del proyecto de investigación en el que se enmarca esta tesina y apoyarme en mis primeros pasos en la vida académica, por tu continua generosidad y por el tiempo dedicado.

A Marcelo, por confiar en mí más de lo que yo confío, por tu paciencia y por sacarme sonrisas incluso en los días en los que las cosas no salían tan bien.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica y CEINBIO, por abrirme las puertas a un lugar de colaboración y construcción colectiva, donde siempre hay alguien dispuesto a ayudar, intercambiar ideas y discutir resultados. En especial a Mauri, por los ensayos de espectrometría de masa, a Ari, por las simulaciones computacionales, y a Nico V, por la ayuda diaria.

A mis compañeros de carrera y amigos, Lu, Marti, Marce, Isa y Santi, por las experiencias compartidas, por la compañía y la contención de siempre, y por enseñarme más que solo ciencia.

A mi tía, por alegrarse más que nadie con cada logro y motivarme a seguir adelante.

A papá, por bancarme en todas, por darme la libertad para ser y elegir, y las oportunidades para crecer en todo sentido.

A mamá, por tu apoyo incondicional e inquebrantable paciencia. Nada de esto sería posible sin tu sacrificio y amor.

A mi abue, por inspirarme a luchar por lo que quiero.

LISTA DE ABREVIATURAS

15(S)-HpEPE	Ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E, 17Z-eicosapentaenoico
15(S)-HpETE	Ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoico
β-ME	β-mercaptoetanol
AA	Ácido araquidónico
AG-OOH	Hidroperóxido de ácido graso
AhpE	Alquil hidroperóxido reductasa E
BHT	Butilhidroxitolueno
CAM	Carbamidometil
CMC	Concentración micelar crítica
COX	Ciclooxigenasa
C_P	Cisteína peroxidática
C_R	Cisteína resolutive
DTPA	Pentaacetato de dietilentriamina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EgTR	Tiorredoxina reductasa de <i>Echinococcus granulosus</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERNs	Especies reactivas del nitrógeno
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FE	1-estearoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
FE-15(S)-HpETE	1-estearoil-2-15(S)-HpETE- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
FF	Fully folded
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Disulfuro de glutación
hPrx3	Peroxirredoxina 3 humana
hTrx1	Tiorredoxina 1 humana
IA	2-iodoacetamida

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LOXs	Lipoxigenasas
LTs	Leucotrienos
LU	Locally unfolded
LXs	Lipoxinas
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NEM	N-etilmaleimida
NH₄HCO₃	Bicarbonato de amonio
PGG₂	Ácido 9 α ,11 α -epidioxi-15S-hidroperoxi-prosta-5Z,13E-dien-1-oico
PGs	Prostaglandinas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Prx	Peroxirredoxina
ROOH	Hidroperóxido
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
TEV	Tobacco Etch Virus
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TXNPx	Triparredoxina peroxidasa
TXs	Tromboxanos

RESUMEN

La peroxirredoxina 3 humana (hPrx3), una peroxidasa mitocondrial dependiente de tioles, juega un rol fundamental en la reducción de hidroperóxidos de relevancia biológica, tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito. Una serie de indicios sugieren que hPrx3 puede reducir también hidroperóxidos de ácidos grasos (AG-OOHs), especies que son formadas endógenamente a nivel mitocondrial así como importadas desde el citosol. La actividad reductora de AG-OOHs ha sido reportada para otras peroxirredoxinas (Prxs) y, considerando que el sitio activo de las mismas se encuentra altamente conservado, se espera que la hPrx3 reduzca AG-OOHs de forma similar. En este sentido, se propuso identificar y caracterizar la actividad peroxidasa de hPrx3 utilizando hidroperóxidos de ácidos grasos libres así como formando parte de fosfolípidos como sustrato oxidante. Siguiendo los cambios de fluorescencia intrínseca de hPrx3 durante la reacción de oxidación, se determinaron las constantes de velocidad de oxidación de hPrx3 por diferentes AG-OOHs en el orden de $10^7 M^{-1}s^{-1}$ a pH 7.8 y 12 °C. La reacción con AG-OOHs libres provocó también una rápida sobreoxidación de hPrx3, con constantes de velocidad en el orden de $10^5-10^7 M^{-1}s^{-1}$ a pH 7.8 y 12 °C. En concordancia con una constante de velocidad mayor para la sobreoxidación de hPrx3 por AG-OOHs libres que por H_2O_2 , la adición de un equivalente AG-OOH, pero no de H_2O_2 , provocó una considerable sobreoxidación de hPrx3, que fue detectada por diferentes metodologías, incluyendo cinética de estado estacionario, western blot y espectrometría de masas. En cambio, las técnicas empleadas no arrojaron resultados concordantes en cuanto a la reacción entre hPrx3 y un AG-OOH unido a fosfolípido. Si bien se registró una cinética rápida de oxidación de la enzima y ausencia de sobreoxidación por cambio en la fluorescencia intrínseca, mediante SDS-PAGE/western blot se detectó leve oxidación y sobreoxidación de hPrx3 y el oxidante no funcionó como sustrato en un ensayo acoplado. En suma, hPrx3 es capaz de reducir AG-OOHs libres, llevando a una rápida oxidación y sobreoxidación de la enzima, mientras que la actividad reductora de AG-OOHs unidos a fosfolípidos no es clara.

Palabras clave: Peroxirredoxina; Antioxidantes; Hidroperóxidos de ácidos grasos; Cisteína peroxidática; Sobreoxidación.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción	8
1.1. Mitocondria y metabolismo aerobio	8
1.2. Formación de especies oxidantes mitocondriales	9
1.2.1. Fuentes mitocondriales de $O_2^{\bullet-}$ y especies derivadas	9
1.2.2. Lipoperoxidación no enzimática	11
1.3. Formación enzimática de hidroperóxidos de ácidos grasos	12
1.3.1. Biosíntesis de mediadores lipídicos	12
1.3.1.1. Vía de la ciclooxigenasa	13
1.3.1.2. Vía de la lipoxigenasa	14
1.3.2. Formación enzimática de fosfolípidos oxidados	15
1.4. Sistema de defensa antioxidante	16
1.4.1. Detoxificación mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$	16
1.4.2. Otros sistemas antioxidantes mitocondriales	17
1.5. Peroxirredoxinas	19
1.5.1. Aspectos estructurales	19
1.5.2. Catálisis	21
1.5.3. Sobreoxidación	23
1.6. Peroxirredoxina 3	24
1.6.1. Aspectos estructurales y sobreoxidación	25
1.6.2. Catálisis y especificidad de sustrato	27
1.6.3. Peroxirredoxina 3 e hidroperóxidos de ácidos grasos	29
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo general	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. Materiales y métodos	32
3.1. Materiales utilizados	32
3.2. Soluciones preparadas	33
3.3. Expresión, purificación y procesamiento de proteínas recombinantes	33

3.3.1. Expresión y purificación de hPrx3 recombinante	33
3.3.2. Expresión y purificación de TEV proteasa	34
3.3.3. Corte de hPrx3 por TEV proteasa	35
3.4. Evaluación del consumo de hidroperóxidos por hPrx3 mediante ensayo de FOX	36
3.5. Estudio de la cinética de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por distintos AG-OOHs	38
3.6. Evaluación de la actividad de hPrx3 en presencia de AG-OOHs	39
3.7. Evaluación de la oxidación y sobreoxidación de hPrx3 tratada con distintos AG-OOHs por SDS-PAGE y western blot	39
3.8. Detección de sobreoxidación en hPrx3 por reacción con H ₂ O ₂ , 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE mediante espectrometría de masa	41
4. Resultados	42
4.1. Purificación y procesamiento de proteínas recombinantes	42
4.2. Evaluación del consumo de hidroperóxidos por hPrx3 mediante ensayo de FOX	44
4.3. Estudio de la cinética de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por distintos AG-OOHs	46
4.4. Evaluación de la actividad de hPrx3 en presencia de AG-OOHs	50
4.5. Evaluación de la oxidación y sobreoxidación de hPrx3 tratada con distintos AG-OOHs por SDS-PAGE y western blot	52
4.6. Detección de sobreoxidación en hPrx3 por reacción con H ₂ O ₂ , 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE mediante espectrometría de masa	56
5. Discusión	60
6. Conclusiones	67
7. Bibliografía	69

1. Introducción

1. 1. Mitocondria y metabolismo aerobio

A lo largo de la evolución de la vida en la Tierra, ha surgido una gran diversidad de organismos que emplean distintas estrategias para cubrir sus necesidades energéticas. Las formas de vida eucariotas y aerobias comparten un complejo sistema de producción de energía que se caracteriza por su alta eficiencia y por encontrarse compartimentalizado en un organelo intracelular muy particular, la mitocondria. Es allí donde se desarrolla la oxidación de metabolitos y la concomitante reducción de portadores de electrones, NAD^+ a NADH y FAD a FADH_2 . Estos portadores pueden retornar a su estado oxidado al transferir electrones a un conjunto de complejos proteicos presentes en la membrana mitocondrial interna que conforman la cadena transportadora de electrones. Esta cadena se compone por 4 complejos; Complejo I o NADH :ubiquinona oxidorreductasa, Complejo II o succinato deshidrogenasa, Complejo III o ubiquinona:citocromo c oxidorreductasa, y Complejo IV o citocromo oxidasa. Cada uno de estos complejos presenta centros redox que participan aceptando y donando electrones, siendo O_2 el aceptor final de los mismos, que es en su gran mayoría reducido completamente a agua a nivel del Complejo IV (1).

El desarrollo secuencial de reacciones de óxido-reducción a lo largo de la cadena transportadora de electrones se encuentra acoplado al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso. Como consecuencia, el pH de la matriz es de 7.8, mayor que el pH citosólico y del espacio intermembranoso, por generación de una diferencia de potencial electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. El flujo de protones a favor de dicho gradiente impulsa la fosforilación de ADP a ATP (1, 2). Si bien es la más conocida, la producción de ATP no es la única función mitocondrial. Este organelo participa en la síntesis de distintas biomoléculas, en el sensado del estado energético (3) y de los niveles de oxígeno celular (4), y en diversos procesos de señalización intracelular que regulan los fenómenos de apoptosis (5), autofagia (6), diferenciación (7) e inflamación (8, 9). Gran parte de estas funciones son dependientes de especies reactivas del oxígeno (EROs), incluyendo radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), entre otras. A nivel mitocondrial, la generación de estas especies está fuertemente ligada con la “fuga” de electrones a nivel del complejo respiratorio y la reducción parcial de O_2 . Por lo tanto, la aerobiosis lleva inevitablemente a la formación de EROs, especies moleculares “de doble filo”, implicadas tanto en señalización redox como en daño oxidativo (10).

1. 2. Formación de especies oxidantes mitocondriales

Las EROs son moléculas derivadas del O_2 , históricamente asociadas a estrés oxidativo, envejecimiento y daño celular (11), que posteriormente fueron reconocidas como relevantes en la señalización y control de la función celular. Existen distintas fuentes intracelulares de EROs, sin embargo, en células no inflamatorias, se cree que la principal corresponde a la mitocondria (12). El transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria tiene como paso final la reducción completa de O_2 , por transferencia de cuatro electrones, generando como producto H_2O . No obstante, en distintos sitios dentro del compartimento mitocondrial se reducen moléculas de O_2 de forma parcial. Específicamente, la reducción por un único electrón lleva a la formación de $O_2^{\bullet-}$, una especie radicalaria precursora de otras especies de mayor reactividad (13).

1. 2. 1. Fuentes mitocondriales de $O_2^{\bullet-}$ y especies derivadas

Se han identificado distintos mecanismos por los que se forma $O_2^{\bullet-}$ a nivel mitocondrial y distintas fuentes de dicha especie en el interior del organelo. Tanto el mecanismo de formación, como la fuente predominante y la concentración de $O_2^{\bullet-}$ alcanzada varía según el tipo celular del que se trate, y los niveles intracelulares de ADP, dependiendo también de si la mitocondria está respirando activamente o no (14). En forma general, puede decirse que dos de las principales fuentes mitocondriales de $O_2^{\bullet-}$ corresponden a los Complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (15) (**Fig. 1**).

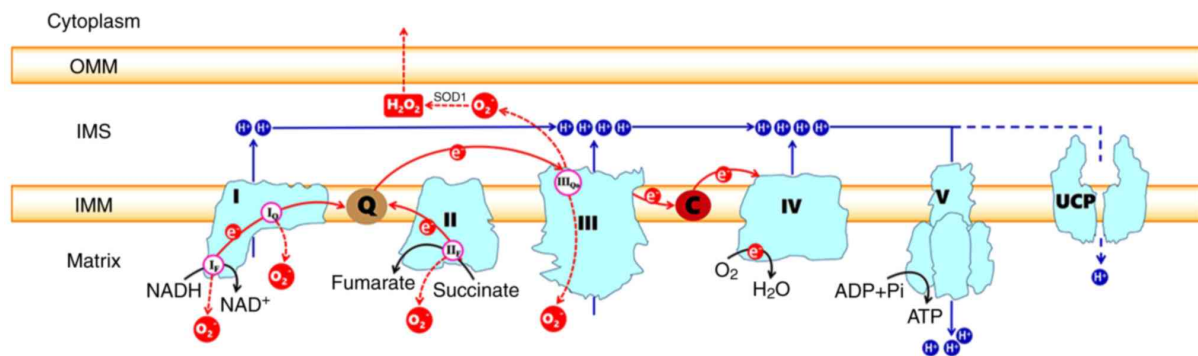


Figura 1. Flujo de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones y puntos de formación de $O_2^{\bullet-}$. Destaca la liberación de $O_2^{\bullet-}$ a la matriz mitocondrial a partir de los Complejos I, II y III, siendo el Complejo III el único que libera $O_2^{\bullet-}$ hacia el espacio intermembrana, donde puede ser convertido a H_2O_2 y difundir hacia el citosol. Q, ubiquinona; C, citocromo c; IMM, membrana mitocondrial interna; IMS, espacio intermembranoso; OMM, membrana mitocondrial externa. Imagen extraída de (10).

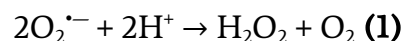
Dentro del Complejo I, se han propuesto distintos sitios como fuente de $O_2^{\bullet-}$. Esto incluye el sitio FMN, así como algunos de los centros ferrosulfurados y el sitio Q (sitio de

unión de Coenzima Q). Es de destacar que no se detecta $O_2^{\bullet-}$ producido por el Complejo I en el espacio intermembranoso, por lo que dicho complejo solo liberaría esta especie a la matriz mitocondrial (12).

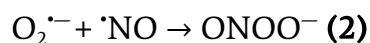
En el caso del Complejo III, la formación de $O_2^{\bullet-}$ se debe principalmente a la producción de radical semiquinona en el sitio Q_o , el cual suele oxidarse inmediatamente por un centro redox perteneciente al complejo, pero que en caso de transporte de electrones enlentecido puede alternativamente reducir por un electrón a una molécula de O_2 (15). A diferencia de lo que ocurre con el $O_2^{\bullet-}$ producido por el Complejo I, el Complejo III no solo libera dicha especie a la matriz mitocondrial, sino que también la libera al espacio intermembranoso (12).

Adicionalmente, se ha visto que el Complejo II genera $O_2^{\bullet-}$ en menor medida que los Complejos I y III. Algunas enzimas mitocondriales que no pertenecen a la cadena respiratoria también contribuyen a la generación de $O_2^{\bullet-}$, como glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (12, 16, 17), flavoproteína de transporte de electrones ubiquinona oxidorreductasa (18), dihidrolipoamida deshidrogenasa (19), piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa (12), entre otras.

Es así que la respiración aerobia tiene como subproducto a una especie reactiva como el $O_2^{\bullet-}$. Este radical puede derivar en otras EROs secundarias con mayor potencial de reducción, como H_2O_2 y $\cdot OH$. La reacción mediante la cual se forma H_2O_2 a partir de $O_2^{\bullet-}$ es una dismutación que, en la matriz mitocondrial, ocurre en forma catalizada por la enzima superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD)¹. Dicha reacción puede resumirse de la siguiente manera:



Asimismo, a partir de $O_2^{\bullet-}$ puede generarse otra especie reactiva mediante la siguiente reacción:

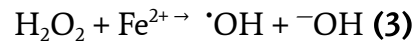


El peroxinitrito² es una especie reactiva del nitrógeno (ERN) con alto potencial oxidante y nitrante, que puede generarse en forma espontánea por la reacción controlada por difusión entre $O_2^{\bullet-}$ y óxido nítrico ($\cdot NO$) (20). El peroxinitrito puede dar lugar a la formación de especies oxidantes secundarias, tales como radical carbonato, dióxido de

¹ Si bien el H_2O_2 puede generarse directamente por reducción divalente del oxígeno, a nivel mitocondrial se forma mayoritariamente a partir de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$.

² Término que refiere en forma amplia al ácido peroxinitroso (pKa 6.6-6.8) y su base conjugada peroxinitrito anión.

nitrógeno y radical hidroxilo. Este último también puede generarse a partir de H_2O_2 por reacción de Fenton:



Mientras $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 presentan una menor reactividad, mayor estabilidad y son capaces de difundir mayores distancias, peroxinitrito tiene tiempo de vida media y reactividad intermedia, reaccionando con ciertas cisteínas proteicas, complejos metálicos y CO_2 (21), a diferencia de $\cdot\text{OH}$ que es extremadamente oxidante y reacciona rápida y no selectivamente con múltiples biomoléculas, como ADN, proteínas y lípidos (15).

1. 2. 2. Lipoperoxidación no enzimática

Diferentes oxidantes por un electrón pueden inducir lipoperoxidación no enzimática, una reacción que es capaz de autopropagarse, lo que puede modular distintas funciones o causar estrés oxidativo e incluso muerte celular. La oxidación por un electrón de un ácido graso poliinsaturado, lleva a la formación de un radical alquilo sobre un átomo de carbono de uno de los grupos metileno de la cadena hidrocarbonada. Dicho radical reacciona con O_2 , generando un radical peroxilo que puede abstraer un electrón de otro ácido graso insaturado. De este modo, se generan hidroperóxidos de ácidos grasos (AG-OOHs) (15). Siendo que el radical peroxilo se resuelve por reacción con otro ácido graso insaturado, deja como subproducto un nuevo radical alquilo, induciendo una cadena de reacciones que propagan la formación de especies reactivas (22) (**Fig. 2**). La terminación de este fenómeno se da cuando la concentración de especies radicalarias es tal que lleva a que estas reaccionen entre sí.

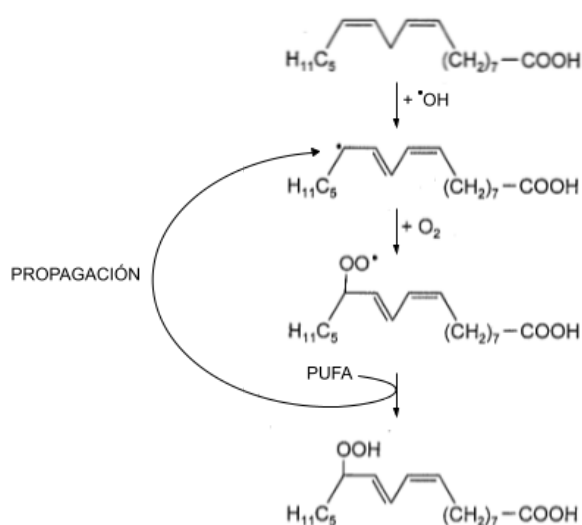


Figura 2. Lipoperoxidación no enzimática. Implica la iniciación por ataque de una especie radical y formación de un radical alquilo, que por reacción con O_2 lleva a la formación de radical peroxilo. Este reacciona con otro lípido poliinsaturado para formar un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical alquilo, que reiniciará la cadena de reacciones ya descritas. *PUFA*, del inglés “polyunsaturated fatty acid” o ácido graso poliinsaturado. Imagen modificada de (22).

La formación de AG-OOHs puede ocurrir a nivel de las membranas biológicas, modificando su estructura y funcionalidad. Los principales fosfolípidos de la membrana mitocondrial interna son fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y cardiolipina (23). Estos fosfolípidos son especialmente susceptibles a la peroxidación por su ubicación cercana a fuentes de especies reactivas y por estar esterificados, en gran medida, por ácidos grasos insaturados. Los AG-OOHs formados en la membrana pueden ser liberados como consecuencia de la activación inducida por lipoperoxidación de fosfolipasas (24). Los AG-OOHs a nivel mitocondrial no solo son formados endógenamente sino que también son importados desde el citosol, provocando liberación de citocromo c, cambios en el potencial de membrana, etc. (25).

1. 3. Formación enzimática de hidroperóxidos de ácidos grasos

1. 3. 1. Biosíntesis de mediadores lipídicos

La lipoperoxidación a nivel celular no solo se desarrolla en presencia de especies oxidantes sino también debido a la existencia de enzimas de tipo oxigenasas capaces de catalizar peroxidación de ácidos grasos insaturados, generando metabolitos con funciones fisiológicas de gran importancia. La oxidación de ácidos grasos insaturados forma parte de múltiples rutas biosintéticas altamente reguladas que llevan a la formación local de diversos mediadores lipídicos, incluyendo prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), entre otros. Estas especies derivan principalmente de ácidos grasos poliinsaturados de 20 o 22 carbonos como ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (26).

El AA o ácido 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos que se caracteriza por presentar cuatro dobles enlaces cis en las posiciones 5, 8, 11 y 14. La presencia de AA libre en las células se encuentra estrechamente regulada. Tradicionalmente, la presencia de ciertos estímulos externos lleva a la activación de distintas isoformas de la fosfolipasa A₂, enzima que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, clivando el ácido graso que los esterifica en la posición sn-2. Dicha posición es frecuentemente ocupada por AA, por lo que la acción de la fosfolipasa A₂ lleva a la liberación de éste ácido graso, lo que constituye un paso limitante en el proceso de biosíntesis de eicosanoides (27).

1. 3. 1. 1. Vía de la ciclooxigenasa

Mediante la vía ciclooxigenasa, a partir de AA libre, son producidos prostanoides³. En primer lugar, se desarrolla la oxidación de AA a prostaglandina H₂ (PGH₂) por acción de la enzima prostaglandina-endoperoxido sintasa, también conocida como prostaglandina G/H sintasa o ciclooxigenasa (COX). Esta enzima presenta dos actividades enzimáticas; una actividad dioxigenasa que deriva en la formación de PGG₂ y una posterior reducción de PGG₂ a PGH₂ por actividad peroxidasa (28). Dependiendo del tipo celular del que se trate y, por lo tanto, de las enzimas pertenecientes a la vía que cada célula exprese, a partir de PGH₂ se pueden formar diversos prostanoides con implicancia en procesos de inflamación, coagulación, etc. (29) (**Fig. 3**). Se ha demostrado que la forma inducible de la ciclooxigenasa, la ciclooxigenasa 2, se expresa en la mitocondria en varias células cancerosas humanas, lo que confiere a dichas células resistencia a la apoptosis (30).

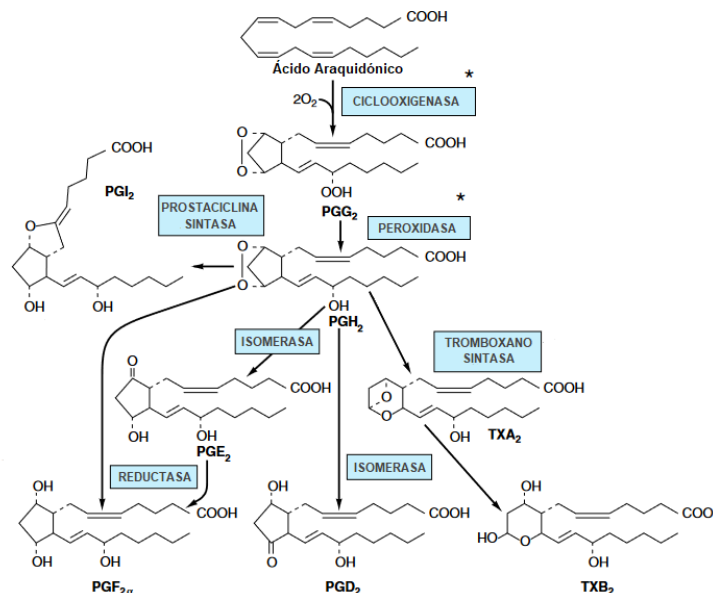


Figura 3. Vía de la ciclooxigenasa. A partir de AA se forman una serie de prostanoides, prostaglandinas y tromboxanos, derivados de un endoperoxido de ácido graso producto de la acción de la enzima COX (*), con actividad ciclooxigenasa y peroxidasa. Imagen modificada de (31).

La acción de la enzima COX implica inicialmente un complejo proceso de oxidación, que lleva a la formación de PGG₂, un endoperoxido-hidroperóxido de prostaglandina con un grupo peroxilo a nivel de C15. El proceso catalítico necesario para obtener dicho producto implica la oxidación de un residuo de tirosina a radical tirosilo por acción de un grupo hemo presente en el sitio activo de la enzima. Esto permite la subsiguiente sustracción de

³ Término utilizado para englobar el conjunto de PGs y TXs.

un átomo de hidrógeno perteneciente al grupo (1Z, 4Z)-pentadieno del AA. Como consecuencia, se forma un radical alquilo sobre el C13 y un posterior rearrreglo que centra el radical sobre el C11, donde se adiciona una molécula de O₂ para formar un radical peroxilo. Una nuevo rearrreglo, que involucra dos procesos de ciclado, lleva a la formación de un endoperóxido y un nuevo radical sobre C15. La adición de una segunda molécula de O₂ a nivel de C15 deriva en la formación de un radical peroxilo que se resuelve por transferencia de un átomo de hidrógeno desde un residuo de tirosina perteneciente al sitio activo de la enzima COX. Es así que se forma PGG₂, una especie derivada de AA con presencia de un grupo peroxilo sobre C15 (26).

1. 3. 1. 2. Vía de la lipoxigenasa

A partir de AA se generan otras especies peroxidadas, además de leucotrienos y lipoxinas (Fig. 4). Las enzimas que desencadenan esta vía son lipoxigenasas (LOXs), y poseen actividad dioxigenasa dependiente de hierro no hémico (26). Existen diversas isoformas de la enzima lipoxigenasa, con distinta especificidad posicional, capaces de adicionar O₂ sobre C5, C12 o C15 del AA para así generar diferentes AG-OOHs. Estas isoformas no solo difieren en su especificidad posicional sino también en su preferencia por determinados sustratos. A diferencia de las demás lipoxigenasas mencionadas, 15-lipoxigenasa es capaz de oxidar no solo ácidos grasos poliinsaturados libres sino también esterificados e incluso formando parte de membranas biológicas. Por lo tanto, la actividad catalítica de esta isoforma no depende necesariamente de la liberación de ácidos grasos por acción de fosfolipasas A₂ (32).

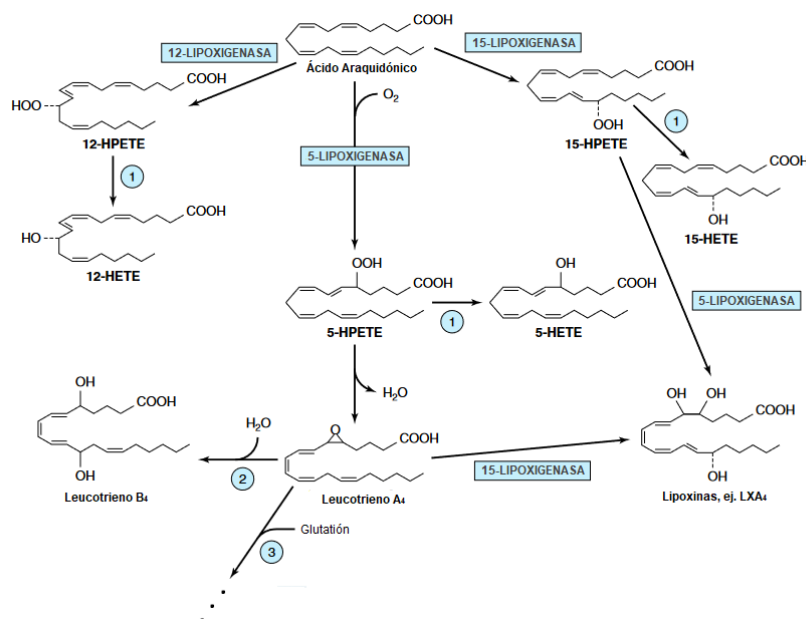


Figura 4. Vía de la lipoxigenasa. A partir de AA se forman una serie de hidropéroxidos de ácidos grasos, leucotrienos y lipoxinas, por acción de diversas isoformas de la enzima LOX con distinta

regioespecificidad. ①, peroxidasa; ②, leucotrieno A₄ epóxido hidrolasa; ③, glutatión S-transferasa. Imagen modificada de (31).

La presencia de un hierro no hémico es necesaria para la remoción estereoespecífica de un átomo de hidrógeno sobre un grupo dieno del AA, por un mecanismo de transferencia de electrón acoplada a protón (PCET), lo que lleva a la producción de un radical alquilo. Posteriormente, se desencadena un rearrreglo del radical lipídico, generando un dieno conjugado más estable, y la adición de una molécula de O₂, que produce un radical peroxilo. Este último es reducido para formar un AG-OOH derivado de AA (26). Específicamente, por acción de 15-lipoxigenasa sobre AA, el producto obtenido corresponde al ácido 15S-hidroperoxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico (15(S)-HpETE). Alternativamente, la enzima puede utilizar EPA (ácido 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoico) como sustrato, generando ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E, 17Z-eicosapentaenoico (15(S)-HpEPE). 15(S)-HpETE y 15(S)-HpEPE son AG-OOHs de 20C, que difieren únicamente en la presencia de un doble enlace adicional sobre C17 en el caso de 15(S)-HpEPE, por lo que se espera que sus propiedades fisicoquímicas y actividad biológica sean similares.

Si bien la lipooxigenasa es una enzima que se localiza principalmente en el citosol celular en condiciones basales, se observa asociación de la enzima a membranas mitocondriales y daño oxidativo de las mismas en condiciones de hipoxia/reoxigenación, lo que se ha vinculado a procesos patológicos (33).

1. 3. 2. Formación enzimática de fosfolípidos oxidados

Si bien 15-lipoxigenasa sería una de las únicas isoformas de la enzima capaz de utilizar fosfolípidos de membrana como sustrato en forma directa, generando productos oxidados que han sido observados en leucocitos no estimulados (34, 35), éste no sería el único mecanismo por el cual se da la formación enzimática de estos fosfolípidos. Ácidos grasos oxidados podrían ser insertados en lisofosfolípidos por enzimas del ciclo de Lands, por el cual se dan procesos de remodelación de fosfolípidos, involucrando fosfolipasas y aciltransferasas (36). La formación enzimática de fosfolípidos oxidados se desarrolla en forma rápida y coordinada en células del sistema inmune (37, 38), permitiendo la obtención de productos implicados en ferroptosis, apoptosis y coagulación sanguínea (36).

Por otra parte, a nivel mitocondrial también han sido identificados mecanismos enzimáticos de síntesis de lípidos oxidados. Más específicamente, fue reportada una vía de oxidación de cardiolipina que conduce a la generación Ca²⁺-independiente de mediadores lipídicos (39). Dicha reacción es catalizada por la actividad peroxidasa del citocromo c, que es capaz de oxidar los ácidos grasos que esterifican la cardiolipina. Esta actividad

peroxidasa se encuentra aumentada en conformaciones alternativas de citocromo c, que se ven favorecidas por asociación a cardiolipina y otros fosfolípidos, así como en caso de modificaciones postraduccionales como nitración de tirosinas y sulfoxidación de metioninas (40). La acción de ciertas isoformas de la fosfolipasa A₂ permite la posterior hidrólisis de los residuos oxidados, llevando a la liberación a nivel mitocondrial de diversas especies moleculares oxigenadas que funcionan como mediadores lipídicos (39).

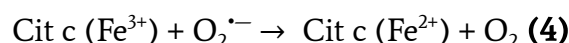
1. 4. Sistema de defensa antioxidante

Como se ha detallado anteriormente, son múltiples las fuentes celulares de especies con capacidad oxidativa, lo que lleva a la formación de una enorme variedad de moléculas con distintas propiedades fisicoquímicas, incluyendo O₂^{•-}, H₂O₂, [•]OH, peroxinitrito, AG-OOHs libres y en fosfolípidos, etc. La producción de estas especies debe estar estrechamente regulada, de modo de impedir la generación de daño oxidativo extensivo y permitir el cumplimiento de funciones fisiológicas dependientes de concentraciones controladas y localizadas de EROs y ERNs.

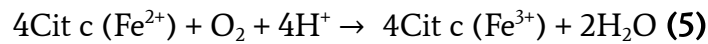
1. 4. 1. Detoxificación mitocondrial de O₂^{•-}

A nivel mitocondrial, son diversas las enzimas que participan en el “sistema de defensa antioxidante”. Considerando que la especie reactiva primaria generada en este compartimiento subcelular corresponde a O₂^{•-}, destaca una familia de metaloenzimas capaces de catalizar la dismutación de dicha especie a H₂O₂, denominada superóxido dismutasa (2, 41). En la matriz mitocondrial está presente una isoforma cuyo nombre está dado por la presencia de manganeso en el sitio activo de la enzima, MnSOD. Si bien la reacción de dismutación puede ocurrir en forma espontánea, lo que fue descrito anteriormente en **Ec. 1**, la reacción catalizada se desarrolla a una velocidad 10⁴ veces mayor, con una constante de velocidad del orden de 10⁹ M⁻¹s⁻¹, en un proceso controlado por el fenómeno de difusión (42).

Es de relevancia la presencia de otra isoforma de esta enzima, Cu/ZnSOD, en el espacio intermembranoso mitocondrial, siendo que parte del O₂^{•-} producido es liberado en dicho compartimiento (43). Adicionalmente, el citocromo c también puede actuar removiendo parte del O₂^{•-} liberado al espacio intermembrana como se muestra en **Ec. 4**:



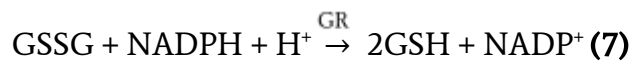
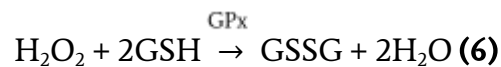
Mediante la reacción catalizada por la citocromo c oxidasa, se regenera la forma oxidada del citocromo c. Este proceso utiliza O₂ como aceptor de electrones y produce fuerza protón motriz, por lo que puede ser aprovechado para la generación de ATP (2, 44):



Resulta fundamental el rol de estas enzimas a nivel mitocondrial dado que permite controlar los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y, por lo tanto, desfavorecer la formación de $\cdot\text{OH}$ (por reacción entre H_2O_2 y metales reducidos por $\text{O}_2^{\cdot-}$) y de peroxinitrito (por reacción espontánea entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$) (14), (45).

1. 4. 2. Otros sistemas antioxidantes mitocondriales

Además de las enzimas capaces de detoxificar $\text{O}_2^{\cdot-}$, existen otras enzimas que metabolizan específicamente H_2O_2 . La catalasa es una enzima especializada en la dismutación de H_2O_2 a O_2 y H_2O . Sin embargo, la localización de dicha enzima suele estar restringida a peroxisomas, siendo el hígado y corazón de rata los únicos tejidos en los que se ha reportado presencia de catalasa a nivel mitocondrial (46, 47). En mitocondrias se expresa el sistema glutatión peroxidasa (GPx)/glutatión reductasa (GR), que cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O utilizando glutatión reducido (GSH) como dador de electrones (**Ec. 6**), siendo el disulfuro de glutatión (GSSG) formado posteriormente reducido por la GR a expensas de NADPH (**Ec. 7**) (2).



De las ocho GPxs expresadas en mamíferos, la más abundante en mitocondrias de la mayoría de los tipos celulares es la GPx1. GPx1 es una selenoproteína, que se localiza en citosol, núcleo y mitocondria, y cuya acción depende de la concentración de GSH (**Fig. 5**) (48).

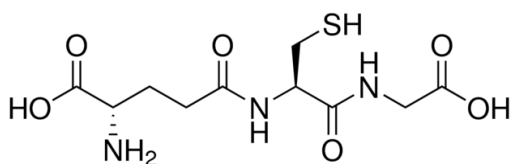


Figura 5. Estructura del glutatión reducido. Representación 2D de la estructura química de glutatión reducido (GSH), tripeptido γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina con un tiol libre pasible de ser oxidado.

Otro sistema antioxidante es tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR). Trx es una proteína pequeña capaz de reducir puentes disulfuro presentes en otras proteínas. Existen varias isoformas de Trx, siendo Trx2 la que se encuentra a nivel mitocondrial (49) (**Fig. 6, A**). Esta enzima se caracteriza por la presencia de una secuencia aminoacídica conservada en su sitio activo, Cys-Gly-Pro-Cys. Los residuos de cisteína, con sus grupos tioles libres,

se encuentran cercanos en el espacio, y al oxidarse forman un puente disulfuro intramolecular. Esta forma de Trx oxidada puede ser devuelta a su estado reducido por acción de la TrxR mitocondrial (TrxR2), en una reacción dependiente de NADPH (50).

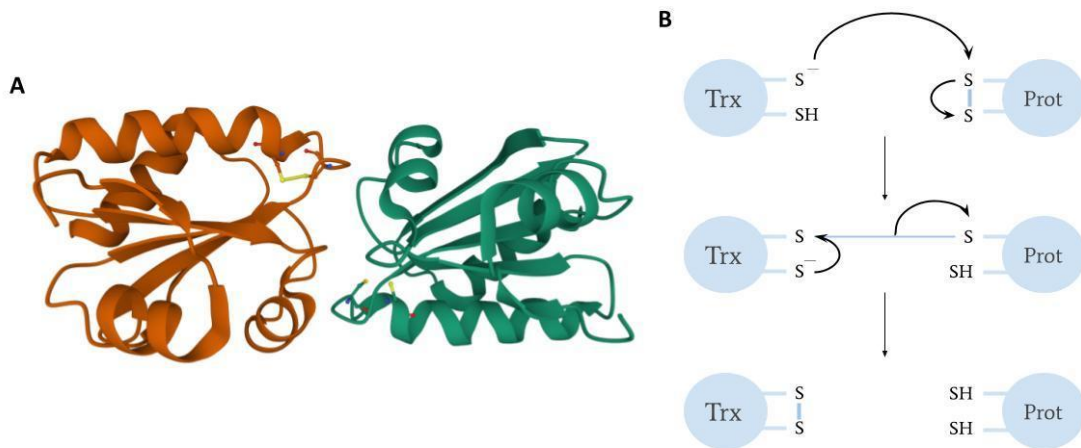


Figura 6. Tiorredoxina como dador de electrones para sistemas antioxidantes. (A) Representación de la estructura terciaria de tiorredoxina 2 (Trx2). Se observa un monómero reducido (verde) con dos grupos tioles libres en las Cys31 y Cys34 y un monómero oxidado (naranja) con un puente disulfuro entre Cys31 y Cys34. PDBID: 1UVZ. **(B)** Mecanismo catalítico de la reducción de puentes disulfuro mediada por Trx. La presencia de dos residuos de cisteína en el sitio activo permite el desarrollo de reacciones de intercambio tiol-disulfuro, incluyendo la formación de un puente disulfuro intermolecular entre Trx y su proteína blanco.

El mecanismo catalítico por el que la tiorredoxina reduce puentes disulfuro presentes en proteínas y péptidos, implica el ataque nucleofílico por parte de un grupo tiolato sobre el puente disulfuro de la proteína blanco, lo que lleva a la formación de un nuevo puente disulfuro mixto. Posteriormente, un segundo grupo tiolato presente en el sitio activo de Trx ataca a la cisteína adyacente, provocando la rotura del puente disulfuro mixto y la formación de un puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas del sitio activo (51) **(Fig. 6, B)**. De este modo, se reduce la proteína blanco, quedando Trx en su forma oxidada, la cual deberá ser reducida por TrxR para evitar agotar el pool de Trx disponible para actuar como agente reductor de puentes disulfuro. TrxR no es la única enzima capaz de reducir Trx, siendo que, en mitocondrias, existen conexiones entre distintos sistemas antioxidantes. Por ejemplo, GSH es capaz de reducir Trx2, reacción catalizada en presencia de glutaredoxina 2, otra proteína mitocondrial con actividad oxidoreductasa dependiente de grupos tiol (52). Por otra parte, Grx2 es reducida por GSH/GR pero también por TrxR2 (53).

El rol de TrxR no está limitado a regenerar Trx en su forma reducida, siendo que puede actuar como agente reductor sobre otros sustratos distintos de Trx (54). De todas formas, uno de los roles destacados del sistema Trx/TrxR implica la acción coordinada de ambas

especies junto con NADPH y otras enzimas con actividad catalítica basada en tioles. Esta colaboración es fundamental para el funcionamiento de las peroxirredoxinas (Prxs), peroxidasa dependientes de cisteínas que participan en la reducción de hidroperóxidos (ROOH) de relevancia biológica, tales como H_2O_2 y peroxinitrito. En forma general, las Prxs utilizan Trx como dador de electrones, por lo que su ciclo catalítico es dependiente del sistema Trx/TrxR y su acción en conjunto constituye no solo un sistema de defensa antioxidante sino también un sistema regulador del estado redox celular (55).

1. 5. Peroxirredoxinas

Las Prxs componen una familia de enzimas con actividad reductora de hidroperóxidos, presentes en múltiples formas de vida, desde bacterias hasta mamíferos, y con diversas isoformas que ejercen sus funciones en distintos compartimientos celulares. En el caso de mamíferos, son 6 las isoformas conocidas y estas difieren en su localización celular, estructura y mecanismo de catálisis. Prx1, 2 y 6 se encuentran a nivel citosólico, mientras que Prx3 en mitocondria, Prx4 en retículo endoplásmico, y Prx5 en mitocondria, citosol, núcleo y peroxisomas principalmente (56).

1. 5. 1. Aspectos estructurales

Las Prxs habrían evolucionado a partir de un ancestro de tipo tiorredoxina, razón por la que presentan un plegamiento similar a esta enzima con ciertas divergencias estructurales que reflejan un cambio en la actividad enzimática, permitiendo que las Prxs catalicen reacciones de reducción de especies peroxidadas en vez de catalizar reacciones de intercambio tiol-disulfuro (57).

Siendo que estas enzimas presentan un plegamiento de tipo tiorredoxina, la estructura terciaria de las mismas puede definirse como globular. En forma general, esta estructura se conforma por 7 hebras β ($\beta 1$ - $\beta 7$) y 5 hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 5$). 5 de las 7 hebras β forman una hoja β central, con una cara recubierta por $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 1$ y $\alpha 4$, y la otra por $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$. La actividad de estas enzimas es dependiente de la presencia de un residuo de cisteína, denominada cisteína peroxidática (C_p), la cual se ubica cercana al extremo N-terminal de $\alpha 2$. Esta hélice α reposa sobre $\beta 3$ y $\beta 4$, y está flanqueada por $\alpha 3$ y $\alpha 5$ (**Fig. 7**). Los elementos de la estructura secundaria mencionados se encuentran conservados entre las distintas Prxs y las principales diferencias estructurales entre las mismas se ubican sobre las regiones N- y C- terminales y a nivel de los bucles que conectan los elementos conservados (58).

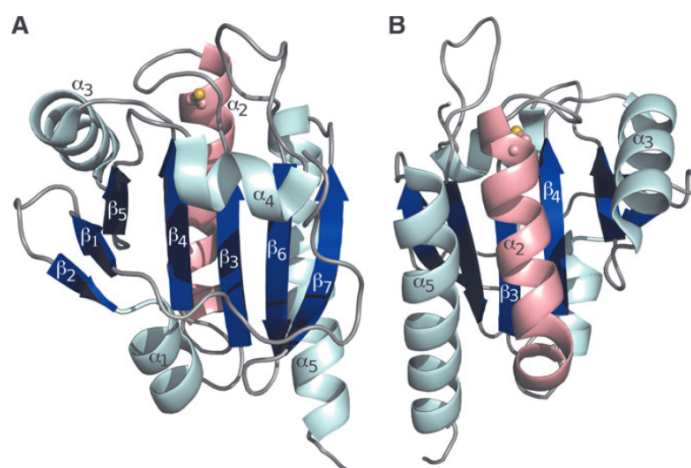


Figura 7. Elementos estructurales conservados en las distintas Prxs. Se muestran representadas tipo cinta las hélices α en rosa y celeste pálido, y las hebras β en azul. La cisteína del sitio activo se muestra como esferas y bastones, siendo la esfera amarilla representación del átomo de azufre del grupo tiol. **(A)** y **(B)** son distintas perspectivas de un monómero de Prx con una rotación de 180° sobre el eje y. Imagen extraída de (58).

En cuanto al sitio activo, éste presenta residuos conservados de prolina (Pro/P), treonina (Thr/T) y arginina (Arg), además del residuo de cisteína ya mencionado (**Fig. 8**). Tres de estos residuos forman parte de una secuencia consenso característica de las Prxs, PXXXTXXC, la que se ubica en parte sobre el bucle que conecta β_3 con α_2 y sobre la primera vuelta de α_2 . En cambio, el residuo de Arg no se encuentra próximo dentro de la estructura primaria de la proteína, ubicándose hacia el extremo C-terminal, generalmente sobre β_6 (58).

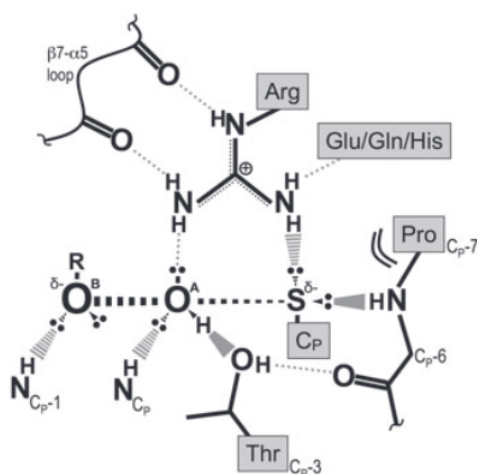


Figura 8. Representación del sitio activo y las interacciones implicadas en el estado de transición de la reacción entre C_p y H_2O_2 . Se muestran las interacciones estabilizantes entre átomos del esqueleto de la proteína, de los residuos conservados del sitio activo y del sustrato. Se denomina O^A al átomo de oxígeno atacado por C_p y O^B al átomo de oxígeno saliente. Imagen extraída de (58).

En forma general, los residuos conservados del sitio activo se posicionan de forma tal que activan y estabilizan C_p , facilitando que la misma pueda atacar a la molécula de sustrato y se desarrolle una reacción de sustitución nucleofílica de tipo 2 en línea. Los detalles a nivel atómico de la catálisis fueron investigados por nuestro y otros grupos de investigación y recientemente revisados en (59).

Si bien estos residuos conservados se encuentran en una misma cadena polipeptídica, se considera que la mayoría de las Prxs actúan como dímeros funcionales, los cuales forman en algunos casos estructuras más complejas, como octámeros, decámeros, dodecámeros e incluso estructuras de mayor peso molecular. La interfase entre dos monómeros de Prx suele ser referida como de tipo A o de tipo B (60), siendo la primera aquella que se forma entre dos subunidades que se ubican cabeza con cabeza, mientras que la segunda se forma entre dos subunidades posicionados cabeza con cola. Aquellos dímeros cuya interfase es de tipo B, presentan interacciones entre las hebras β , formando una hoja β extendida, y una extensión en el extremo C-terminal que estabiliza el dímero por múltiples interacciones (58). Este tipo de dímeros suele formar oligómeros donde 4, 5 o 6 dímeros se asocian por interfaces de tipo A, resultando en una estructura toroidal o tipo anillo. Para algunas Prxs, el estado redox es determinante de la estructura cuaternaria y la enzima podrá presentarse en forma de dímero, en caso de estar oxidada, o de oligómero, en caso de estar reducida o sobreoxidada (58). Otras variables que pueden afectar el estado oligomérico de una Prx incluyen concentración proteica y acidez del medio (61).

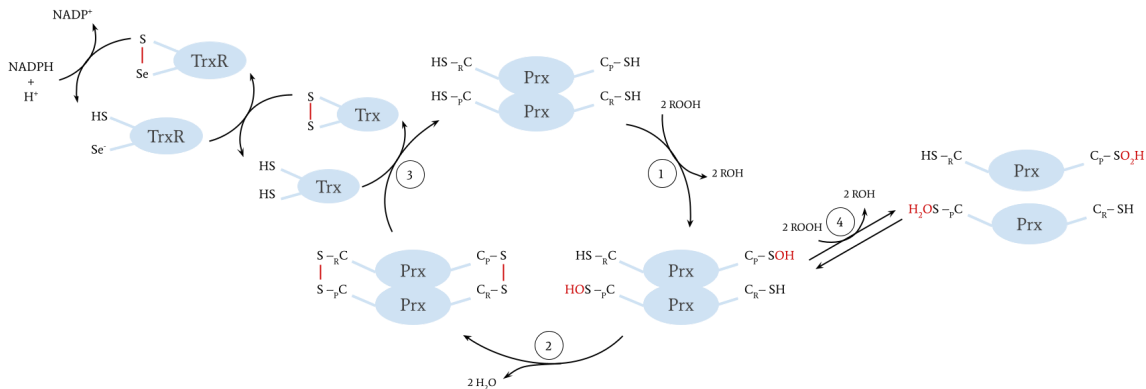
1. 5. 2. Catálisis

Como se detalló anteriormente, la presencia de un residuo de cisteína en el sitio activo de las Prxs es fundamental para el desarrollo de su actividad enzimática. Estas son enzimas que catalizan reacciones bisustráticas por un mecanismo cinético de tipo ping-pong (**Fig. 9**). La fase oxidativa del ciclo catalítico ocurre en forma similar para las distintas Prxs y consiste en la oxidación por dos electrones del tiolato⁴ de la cisteína peroxidática (C_p-S^-) por ROOH, para dar ácido cisteín sulfénico (C_p-SOH) y el alcohol correspondiente a la reducción del hidroperóxido, en una reacción de desplazamiento nucleofílico SN_2 .

El mecanismo por el que se desarrolla la reducción de C_p-SOH a C_p-S^- permite clasificar a las Prxs en tres subtipos funcionales; Prx típica de 2 cisteínas, Prx atípica de 2 cisteínas y

⁴ La cisteína es un aminoácido particular siendo que cuenta con un grupo tiol (-SH) en su cadena lateral, capaz de ionizarse a la forma tiolato ($-S^-$), un potente nucleófilo que puede participar en reacciones redox. Dicha ionización no es completa por lo que se establece un equilibrio entre las formas SH/S^- y la proporción de S^- depende de la constante de disociación ácida (K_a) y del pH. Para una cisteína libre, el pK_a del grupo tiol es de aproximadamente 8.3. Sin embargo, en el contexto de una proteína, dicho valor puede variar enormemente. Esto sucede en el caso de la C_p de las Prxs, presentando un pK_a menor a 6.3, lo que permite que, a pH fisiológico, más del 90% de C_p se encuentre como $-S^-$.

Prx de 1 cisteína (62). La actividad enzimática del primer subtipo depende de la interacción entre dos residuos de cisteína, C_P y la cisteína resolutive (C_R), presentes en monómeros adyacentes dentro de la estructura cuaternaria de la enzima. En cambio, dentro del segundo subtipo se incluyen enzimas en las que C_P y C_R se ubican dentro de una misma subunidad. La reacción de condensación entre C_R y C_P -SOH lleva a la formación de un disulfuro inter o intrasubunidad (C_P -S-S- C_R) durante la etapa de



resolución, que posteriormente es reducido por un sustrato reductor, usualmente tiorredoxina, de modo de regenerar la enzima en su forma reducida. Mientras que las del tercer subtipo carecen de C_R y, por lo tanto, C_P -SOH debe resolverse por rutas alternativas que varían según la enzima de la que se trate. La mayoría de las isoenzimas de mamífero corresponden a Prxs típicas de 2 cisteínas (Prx1 a Prx4), mientras que Prx5 es de 2 cisteínas atípica y Prx6 de 1 cisteína.

Figura 9. Esquema general del ciclo catalítico de una Prx típica de 2 cisteínas. ① Oxidación: reacción entre C_P y ROOH, generando como producto C_P -SOH; ② Resolución: reacción de condensación para formar un puente disulfuro entre subunidades; ③ Reducción; actividad disulfuro-reductasa para regenerar Prx reducida; ④ Sobreoxidación: reacción paralela de C_P -SOH con ROOH, generando formas sobreoxidadas de Prx.

En el caso de Prxs típicas de 2 cisteínas⁵, el desarrollo de la reacción de resolución requiere que la enzima modifique su conformación estructural posterior a la reacción con el sustrato peroxidado. La conformación en que la enzima se presenta mayoritariamente durante el primer paso del ciclo catalítico se denomina *fully folded* (FF) y es en dicha configuración estructural que C_P se ubica dentro de un “bolsillo”, estando protegida y posicionada de forma óptima para reaccionar con el sustrato (58), mientras que C_R se encuentra sepultada a aproximadamente 14 Å de C_P . La transición estructural necesaria

⁵ Estas Prxs pertenecen a la subfamilia Prx1-AhpC, según otra forma de clasificación en base a la conservación de los residuos cercanos al sitio activo (véase <https://csb.wfu.edu/prex/>)

para la posterior formación de un puente disulfuro entre C_p y C_R implica desplegamiento de la región donde se encuentra el sitio activo, incluyendo la primera vuelta de $\alpha 2$, así como también debe desplegarse la extensión C-terminal característica de estas enzimas. De este modo, son expuestas C_p y C_R , quedando la enzima en una conformación denominada *locally unfolded* (LU) en la que los residuos de cisteína se posicionan a una distancia tal que pueda formarse un enlace disulfuro (63).

1. 5. 3. Sobreoxidación

La reacción entre la cisteína peroxidática de las Prxs e hidroperóxidos de distinta naturaleza exhiben una gran velocidad, con constantes cinéticas que oscilan entre 10^4 y 10^8 $M^{-1}s^{-1}$ (64–66), razón por la que estas enzimas son parte importante de los sistemas antioxidantes celulares. Sin embargo, en algunas Prxs, principalmente en el caso de las eucariotas típicas de 2 cisteínas y difiriendo de lo que se observa para Prxs procariontas, la reacción entre C_p -SOH y C_R es lenta en comparación con la primera reacción de oxidación, lo que obstaculiza en parte la actividad antioxidante de estas enzimas (56).

Debido a que la resolución (que incluye la transición conformacional de FF a LU y la reacción posterior de condensación entre C_p -SOH y C_R) tiene una constante de velocidad relativamente baja, de 0.2 a 20 s^{-1} (67), es posible que C_p -SOH se encuentre con una molécula de ROOH antes de que se desarrolle la formación del enlace disulfuro C_p -S-S- C_R . En consecuencia, C_p es sobreoxidada a la forma sulfinilada C_p -SO₂H (**Fig. 9**, ④) (68). En forma general, las Prxs de 2 cisteínas típicas eucariotas son más susceptibles al desarrollo de esta reacción alternativa. En comparación, una Prx bacteriana de 2 cisteínas, *StAhpC*, requiere ser expuesta a 100 veces más H_2O_2 que la Prx1 humana para lograr su inactivación por sobreoxidación (69). Esta característica emergente de las Prxs eucariotas habría sido seleccionada positivamente a lo largo de la evolución, debido a que representaba una ventaja para aquellos organismos que la presentaban, posiblemente por aportar una nueva función a la enzima, distinta de su capacidad antioxidante y relacionada a la señalización redox (68).

El surgimiento de esta característica estaría relacionado con ciertas particularidades estructurales que diferencian a las Prxs eucariotas de las procariontas. Las Prxs más susceptibles a la sobreoxidación se caracterizan por la presencia de dos motivos estructurales GGLG e YF (68). El primero se ubica en el bucle entre $\alpha 4$ y $\beta 5$, y corresponde a una secuencia conservada de residuos Gly-Gly-Leu-Gly, mientras que el segundo se encuentra sobre una hélice adicional que extiende el extremo C-terminal y corresponde a una secuencia conservada de residuos Tyr-Phe. El bucle y la hélice que contienen dichos motivos se empaquetan juntos en la conformación FF, en el caso de una Prx típica de 2 cisteínas como la Prx2 humana, y entierran la región del sitio activo. La hélice C-terminal recubre el sitio activo y múltiples elementos estructurales, incluyendo

aquellos que contienen al motivo GGLG y a C_R, estabilizando fuertemente a la enzima en la conformación FF (69).

Siendo que la formación del puente disulfuro entre C_P y C_R requiere de un cambio conformacional a la forma LU y dicha transición se ve desfavorecida por la estabilización provocada por la hélice C-terminal (69), la presencia de los motivos estructurales GGLG e YF retrasa el desarrollo de la reacción de resolución y, como consecuencia, aumenta la probabilidad de encuentro entre C_P-SOH y otra molécula de hidroperóxido, lo que deriva en la sobreoxidación de la enzima (68).

La susceptibilidad a la sobreoxidación como característica emergente de estas enzimas les aportaría funciones novedosas, incluyendo la capacidad de funcionar como chaperonas (70–72) y de regular procesos de señalización redox (73, 74). Según una teoría denominada “floodgate model”, estas Prxs funcionarían como compuerta, evitando la oxidación de blancos moleculares por reacción con peróxidos, siendo la sobreoxidación el fenómeno que inactiva las Prxs y “abre” la compuerta para permitir la modificación oxidativa de moléculas señalizadoras (66). De este modo, las Prxs podrían transmitir señales en caso de flujo aumentado de peróxidos, desencadenando vías de señalización celular.

Alternativamente, la teoría de señalización a través de “redox relays” establece que las Prxs son sensores del nivel celular de hidroperóxidos, y que una vez oxidadas transfieren la oxidación a moléculas señalizadoras cuya reacción con estas especies oxidantes es lenta. En este sentido, Prxs que resuelven lentamente no solamente pueden reaccionar con una segunda molécula de oxidante y sobreoxidarse con mayor facilidad, sino que también tendrían mayor probabilidad de interactuar con proteínas de señalización, sobre todo si dicha interacción es con la forma oxidada a ácido sulfénico de la Prx (66).

1. 6. Peroxirredoxina 3

Prx3 es una proteína de 256 aminoácidos, siendo los primeros 61 aminoácidos presentes en el extremo N-terminal una secuencia de importación a la mitocondria, razón por la que esta enzima ejerce su función a nivel de la matriz mitocondrial donde se la encuentra en su forma madura, ya despojada de la secuencia N-terminal, con un peso molecular de 21.5 kDa (56). Ciertas mutaciones presentes en el gen que codifica para esta proteína han sido relacionadas con distintas patologías, incluyendo ataxia cerebelar (75) y un tipo de distrofia corneal predescemética (76). Asimismo, Prx3 se encontró sobreexpresada en distintos tipos de cáncer humano (77, 78). En cambio, se detectan niveles disminuidos de la enzima en el cerebro de pacientes con Alzheimer y Síndrome de Down (79).

1. 6. 1. Aspectos estructurales y sobreoxidación

Como ya fue descrito para las Prxs en forma general, el monómero de Prx3 presenta un plegamiento de tipo Trx y se encuentra formado por una serie de hebras β y hélices α , siendo la primera vuelta del extremo N-terminal de la hélice α_2 donde se ubica C_p (ver *sección 1. 5. 1*). Dos monómeros de Prx3 se posicionan cabeza con cola, formando una interfase de tipo B, que estabiliza el dímero resultante. Así como otras Prxs, Prx3 en forma reducida forma estructuras cuaternarias más complejas de tipo toroidal, donde 6 dímeros se asocian mediante interfaces de tipo A, resultando en un anillo dodecamérico (**Fig. 10**). Adicionalmente, estos anillos pueden encontrarse apilados, para formar filamentos, o concatenados (80).

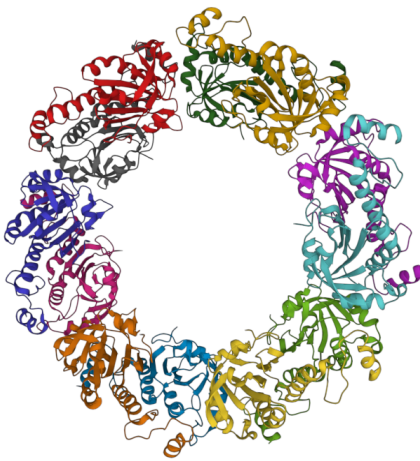


Figura 10. Representación 3D de la estructura dodecamérica de la Prx3 humana. Cada monómero se muestra con un color diferencial, siendo 12 los que componen la estructura toroidal. Modificado de PDBID: 5JCG.

La formación de toroides no solo depende del estado redox de la enzima sino también de su concentración, siendo a concentraciones mayores a $2 \mu\text{M}$ y en caso de que la enzima esté reducida o sobreoxidada que su ensamblaje estaría favorecido (61, 81, 82). Si bien tanto en el estado reducido como en el sobreoxidado la enzima se encuentra formando estas estructuras de orden superior, los anillos toroidales sobreoxidados presentan una estructura diferente a la de los toroides reducidos, permitiendo que una misma enzima con ciertas modificaciones estructurales ejerza funciones muy dispares. Por ejemplo, en enzimas de la subfamilia de la Prx3, la enzima reducida es la que presenta actividad peroxidasa, mientras que la forma sobreoxidada actuaría como chaperona (70–72).

Las Prxs eucariotas típicas de 2 cisteínas, incluyendo a Prx3, son descritas como susceptibles a la sobreoxidación, en comparación con las formas procariotas. Como fue explicado anteriormente, estas poseen una extensión en el extremo C-terminal donde está presente el motivo conservado YF, el cual interactúa con el motivo GGLG cercano a la región del sitio activo, razón por la cual se encuentra estabilizada la conformación estructural FF y se ve desfavorecida la transición a la conformación LU necesaria para el

desarrollo de la reacción de resolución (56). Si bien Prx3 es una Prx eucariota típica de 2 cisteínas y presenta las características estructurales mencionadas, en comparación con Prx1 y Prx2, es más resistente a la sobreoxidación por exposición a H₂O₂. Esto se ha vinculado a una mayor rapidez de resolución en el caso de Prx3 respecto a Prx2, con constantes de resolución reportadas de 10 s⁻¹ (83) y de 0.2 a 1 s⁻¹ (67, 84–86), a pH 7.4, respectivamente.

Recientemente, han sido descubiertos dos motivos estructurales que confieren resistencia frente a la sobreoxidación por H₂O₂. El motivo A corresponde a la secuencia D-X₈-N/G-X₁₀-H-X₂₇-S/G, cuya primera mitad (D-X₈-N/G) se ubica próximo al sitio activo y a la secuencia GGLG, mientras que la segunda (H-X₂₇-S/G) se ubica cerca del sitio activo, de la interfase dímero-dímero y del motivo B. Este último corresponde a T-X₃-S/T. Prx1 y Prx2 presentan solamente uno de los motivos mencionados, el motivo A y el motivo B, respectivamente (**Fig. 11**). En cambio, Prx3 presenta ambos motivos A y B, lo que explica que presente una mayor resistencia a la sobreoxidación frente a H₂O₂ que las formas citosólicas. Por otra parte, una Prx procariota y robusta, AhpC, también presenta ambos motivos A y B, sin embargo, carece de los motivos GGLG e YF que confieren susceptibilidad a este fenómeno, razón por la que AhpC es más resistente a la sobreoxidación por H₂O₂ que Prx3. Por lo tanto, Prx3 presenta tanto los motivos que confieren resistencia como los que confieren susceptibilidad, resultando en una resistencia aumentada frente a las Prxs citosólicas pero disminuida respecto a las procariotas (87).

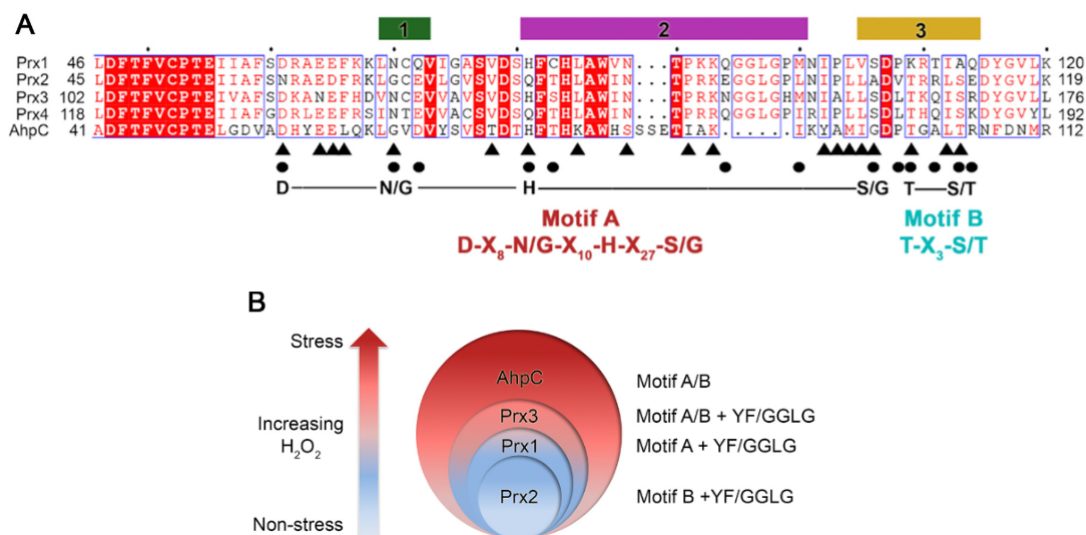


Figura 11. Motivos estructurales asociados al fenómeno de sobreoxidación en Prxs de 2 cisteínas típicas. (A) Alineación de secuencias aminoacídicas de distintas Prxs, mostrando presencia o ausencia de los motivos A, B y GGLG. **(B)** Modelo jerárquico de la resistencia de Prxs frente a crecientes concentraciones de H₂O₂. Las Prxs citosólicas presentan mayor susceptibilidad a la sobreoxidación que Prx3, y todas estas son menos resistentes que AhpC, una Prx bacteriana. Imagen extraída de (87).

Considerando que a nivel mitocondrial se forma una gran cantidad de H_2O_2 , si la enzima no exhibiera cierta resistencia a la sobreoxidación, ésta se inactivaría rápidamente por dicho proceso, impidiendo que desarrolle su función antioxidante. En este sentido, resulta favorable que Prx3 sea más robusta que las formas citosólicas, adecuándose a un ambiente con mayor abundancia de hidroperóxidos (88). Si bien se ha detectado Prx3 sobreoxidada en células expuestas o con producción incrementada de AG-OOHs (89), se desconoce la susceptibilidad a la sobreoxidación de ésta, así como de otras Prxs de 2 cisteínas de mamíferos, por AG-OOHs ya sea libres o formando parte de fosfolípidos. Las formas sobreoxidadas a sulfínico de Prxs de 2 cisteínas típicas son reducibles por la enzima sulfirredoxina. Si bien esta enzima es citosólica, se ha reportado su localización mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo, lo que contribuiría a la reparación de la forma inactiva de Prx3 (90).

1. 6. 2. Catálisis y especificidad de sustrato

Siendo Prx3 una Prx típica de 2 cisteínas, su mecanismo catalítico necesita de la presencia de dos residuos de cisteína, C_p y C_R . En una Prx3 madura, C_p corresponde al residuo 47, mientras que C_R es el residuo 168. La función de C_p es dependiente de la presencia de otros residuos aminoacídicos en el sitio activo. Arg^{123} es uno de los residuos de Prx3 implicados en la estabilización de C_p en la forma tiolato, al reducir el pK_a del residuo de cisteína a un valor menor a 6 (91). El sitio activo también presenta los otros dos residuos conservados de la secuencia consenso que caracteriza a las Prxs, Pro^{40} y Thr^{44} . El residuo de Thr participa en posicionar y activar el oxígeno a ser atacado por C_p , mientras que Pro limita la accesibilidad del solvente al sitio activo y evita que C_p reaccione con otras especies. El rearrreglo de la red de enlaces de hidrógeno en el sitio activo es fundamental para el desarrollo de la reacción, causando una disminución en la energía libre de activación por estabilización del estado de transición que presenta un enlace parcial entre C_p y el átomo de oxígeno atacado por ésta y un enlace parcialmente roto entre los dos átomos de oxígeno del peróxido (59).

Luego de la reacción de sustitución nucleofílica, en la que participan directa o indirectamente los residuos anteriormente mencionados, se desarrolla la etapa de resolución, que implica la formación de un puente disulfuro entre C_p y C_R pertenecientes a monómeros adyacentes orientados cabeza con cola. Trx2 es la isoforma de Trx que cataliza la reducción de la forma oxidada de Prx3, devolviendo C_p y C_R a la forma tiol, lo que permitiría reiniciar el ciclo catalítico. Asimismo, Trx2 debe ser reducida, lo que es generalmente catalizado por TrxR2. Estas dos especies conforman el sistema Trx/TrxR del compartimiento mitocondrial. Se han descrito formas alternativas de reducción de Prx3 que consisten en la reducción por glutarredoxina 2 (Grx2), tanto en presencia como en ausencia de GSH (92). De hecho, fue necesario la inactivación de ambos sistemas reductores para que la Prx3 se acumulara en forma oxidada en células (93).

La actividad peroxidasa de Prx3 ha sido demostrada para distintos sustratos, incluyendo H_2O_2 y peroxinitrito. Para las reacciones de Prx3 con estas dos especies se han determinado constantes de velocidad de oxidación de $2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ y $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ (91, 94), respectivamente, demostrando que dicha enzima presenta una alta reactividad tanto con una especie reactiva del oxígeno como con una especie reactiva del nitrógeno, ambos hidropéroxidos de bajo peso molecular producidos ampliamente a nivel mitocondrial.

Considerando la alta reactividad entre Prx3 y H_2O_2 , y la abundancia de esta enzima en el compartimiento mitocondrial, se estima que aproximadamente un 90% del H_2O_2 mitocondrial reacciona con Prx3, siendo GPx1 y Prx5 otros posibles blancos de esta especie (**Fig. 12**) (56). GPx1 reacciona con H_2O_2 con una constante de velocidad mayor a la reportada para Prx3, sin embargo, su abundancia en la mitocondria es significativamente menor (95, 96), mientras que Prx5 no solo se encuentra en menor concentración sino que también reacciona más lentamente (97, 98). En este sentido es que Prx3 es considerada como la principal enzima detoxificadora de H_2O_2 mitocondrial (56).

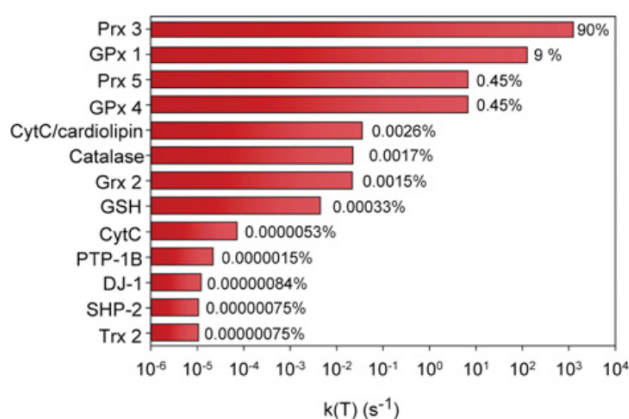


Figura 12. Blancos mitocondriales de H_2O_2 . Para cada blanco se define un porcentaje de H_2O_2 con el que reaccionan, en función de una constante de pseudo-primero orden $k(T)$, dada por el producto entre la concentración de la especie blanco y la constante de velocidad con la que reaccionan con H_2O_2 . Imagen extraída de (56).

De todas formas, la actividad de Prx3 no depende únicamente de su concentración y reactividad, sino también de la actividad de otras enzimas implicadas en su reciclaje. En condiciones de importante estrés oxidativo, donde la formación de hidropéroxidos puede superar la capacidad de los sistemas de reducción, la Prx3 se acumulará en su forma oxidada y, por lo tanto, su concentración efectiva puede encontrarse muy disminuida. En esos casos, la reactividad del oxidante con otros blancos mitocondriales se verá favorecida. Análisis similares fueron realizados para estimar la importancia de Prx3 en la reducción de peroxinitrito intramitocondrial (94, 99).

1. 6. 3. Peroxirredoxina 3 e hidroperóxidos de ácidos grasos

Si bien se han caracterizado las reacciones entre Prx3 y sustratos como H_2O_2 y peroxinitrito, poco se sabe acerca de la capacidad de esta enzima de reaccionar con hidroperóxidos orgánicos de relevancia biológica, tales como AG-OOHs libres y en fosfolípidos.

Sin embargo, se ha demostrado que otras Prxs poseen capacidad de reducción de este tipo de sustrato. Un ejemplo es la alquil hidroperóxido reductasa E (AhpE), una Prx de *Mycobacterium tuberculosis*, para la que se han reportado constantes de velocidad del orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción con AG-OOHs derivados del ácido linolénico y del ácido araquidónico (100). La especificidad de la enzima por estos sustratos está relacionada con la presencia de un parche hidrofóbico en su superficie, sobre la región de la interfase dímero-dímero, que podría interactuar con la cadena alifática del AG-OOH, para así acomodarlo en la entrada del sitio activo (101). La determinación de los parámetros termodinámicos de activación para la reacción de AhpE de *Mycobacterium tuberculosis* con AG-OOHs indicaron un importante aumento en la entropía de activación, respecto de la reacción con H_2O_2 , redundando en una mayor reactividad entre AhpE y AG-OOHs.

La reactividad frente a hidroperóxidos orgánicos no es una característica exclusiva de esta isoenzima, dado que ha sido registrada para otras Prxs como PrxQ B de *Mycobacterium tuberculosis* (102) y triparredoxina peroxidasa (TXNPx) de *Leishmania infantum* (103). En el caso de Prx5 humana, se ha reportado una reactividad del orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para hidroperóxidos orgánicos artificiales como *tert*-butil hidroperóxido, pero su reactividad con AG-OOHs no ha sido investigada (97). Adicionalmente, se detectó actividad peroxidasa frente a hidroperóxidos de ácido linoleico para otra Prx de mamífero, la Prx2 (104).

Considerando cuán conservada se encuentra la estructura de las Prxs en general, se espera que otras isoformas, distintas de las recién mencionadas, también sean reactivas frente a AG-OOHs. Esto es consistente con lo observado para las Prxs de 2 cisteínas humanas por Cordray et al. (2007). En células de la línea celular 293-EcR de riñón fetal humano transformadas para expresar en forma inducida 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX-1 o COX-2, la inducción de la expresión de estas enzimas, junto con la incubación con AA, provocó la sobreoxidación de Prx1, Prx2 y Prx3 a una mezcla de formas sulfiniladas y sulfoniladas (89).

Adicionalmente, la incubación de estas células, sin inducción de expresión de LOX y COX, con 5-HpETE, 12-HpETE, 15-HpETE también provocó la sobreoxidación de estas Prxs, en mayor medida que la exposición a H_2O_2 . La sobreoxidación de Prxs también fue

observada en plaquetas humanas, que expresan 12-LOX en forma constitutiva, y en células indiferenciadas HL-60 de la línea promielítica de leucemia humana, que expresan constitutivamente 5-LOX. Estos resultados sugieren que las especies oxidadas derivadas del ácido araquidónico por acción de LOXs y COX-2 estarían sobreoxidando Prxs de 2 cisteínas, incluyendo a Prx3 (89). En este sentido, Prx3 tendría la capacidad de reducir AG-OOHs, lo que es apoyado por otros descubrimientos recientes.

En modelos celulares de queratinocitos carentes de Prx3 se ha observado apoptosis inducida por radiación UVB, asociada a mayores niveles de oxidación de cardiolipina y liberación de citocromo c, en comparación con modelos celulares que expresan Prx3. En este sentido, Prx3 tendría una función protectora frente a este fenómeno, gracias a su capacidad reductora no solo de H₂O₂ sino también de AG-OOHs libres y en fosfolípidos como cardiolipina (105).

Por otra parte, en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) Prx3^{+/+} y Prx3^{-/-}, se estudiaron los efectos de 15(S)-HpETE sobre PTEN, una proteína perteneciente a la superfamilia de proteínas tirosina fosfatasa, que funciona como supresor tumoral y cuya oxidación resulta en la pérdida de actividad enzimática. El tratamiento de los fibroblastos Prx3^{-/-} con 15(S)-HpETE provocó la oxidación de aproximadamente un 90% de PTEN a los 5 minutos de incubación, con un decaimiento parcial de la oxidación a tiempos posteriores. El nivel de oxidación alcanzado a los 5 minutos para fibroblastos Prx3^{+/+} es menor a 40%, significativamente menor que el registrado en los mutantes Prx3^{-/-}, y a tiempos posteriores la totalidad de la proteína se encuentra reducida. Por lo tanto, Prx3 inhibe significativamente la oxidación de PTEN por 15(S)-HpETE, otro indicio de que Prx3 podría reducir este hidropéroxido (106).

Estos resultados obtenidos en líneas celulares no prueban en forma inequívoca la reducción de AG-OOHs por Prx3, ya que la adición de estos oxidantes puede inducir disfunción mitocondrial y producción de otras especies oxidantes (107). Es por este motivo que se propone estudiar si Prx3 tiene la capacidad de catalizar la reducción de AG-OOHs libres y/o insertos en fosfolípidos de membrana, lo que podría derivar en la sobreoxidación de la enzima y su inactivación.

2. Objetivos

2. 1. Objetivo general

Identificar y caracterizar la actividad peroxidasa de Prx3 humana (hPrx3) utilizando hidroperóxidos de ácidos grasos libres así como formando parte de fosfolípidos como sustratos oxidantes.

2. 2. Objetivos específicos

- Determinar si hPrx3 es capaz de descomponer catalíticamente AG-OOHs.
- Caracterizar la cinética de la reacción de oxidación del tiol peroxidático de hPrx3 recombinante por AG-OOHs.
- Caracterizar la cinética de la reacción de sobreoxidación de hPrx3 recombinante por AG-OOHs.
- Evaluar la susceptibilidad de hPrx3 a la inactivación por sobreoxidación por diferentes AG-OOHs en comparación con H₂O₂.

3. Materiales y métodos

3. 1. Materiales utilizados

Los reactivos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ADNasa, butilhidroxitolueno (BHT), cloranfenicol, cloruro de sodio (NaCl), pentaacetato de dietilentriamina (DTPA), ditiotreitól (DTT), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, glicerol, imidazol, N-etilmaleimida (NEM), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), xylenol orange tetrasódico y 2-iodoacetamida (IA) fueron comprados a la empresa Sigma Aldrich. Las columnas HiTrap Chelating de 5 mL y HiTrap Desalting de 5 mL fueron adquiridas de GE Healthcare Biosciences. Ampicilina y kanamicina fueron compradas a la empresa AppliChem, mientras que isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) fue adquirido de BioPLUS Chemicals.

Ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E, 17Z-eicosapentaenoico (15(S)-HpEPE) ($\geq 98\%$ puro, en etanol), ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoico (15(S)-HpETE) ($\geq 95\%$ puro, en etanol), prostaglandina G₂ (PGG₂) ($\geq 95\%$ puro, en acetona), 1-estearoil-2-15(S)-HpETE-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE-15(S)-HpETE) ($\geq 90\%$ puro, en etanol) fueron adquiridos a la empresa Cayman Chemical (las estructuras de los AG-OOHs y fosfolípidos empleados se muestran en **Fig. 13**). 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE) ($> 99\%$ puro, en etanol) fue comprado a la empresa Avanti Polar Lipids y H₂O₂ a Mallinckrodt Chemicals.

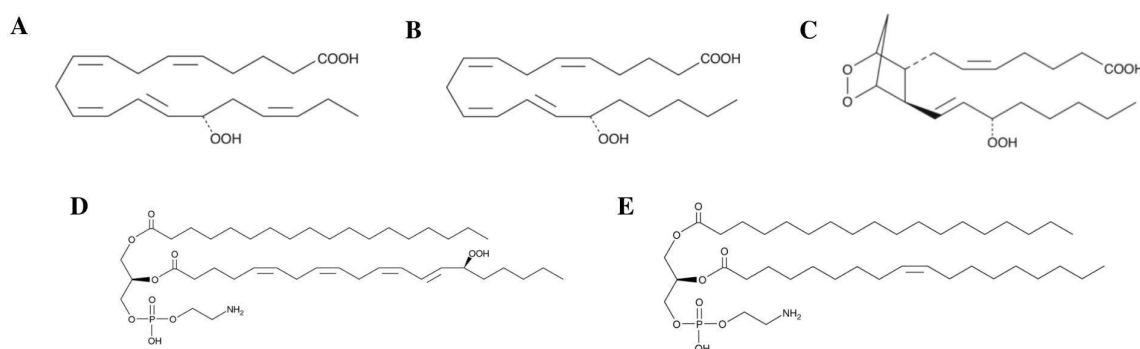


Figura 13. Representación molecular de los AG-OOHs libres y fosfolípidos utilizados a lo largo del trabajo. (A) Ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E, 17Z-eicosapentaenoico (15(S)-HpEPE). (B) Ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoico (15(S)-HpETE). (C) Ácido 9 α ,11 α -epidioxi-15S-hidroperoxi-prosta-5Z,13E-dien-1-oico (PGG₂). (D) 1-estearoil-2-15(S)-HpETE-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE-15(S)-HpETE). (E) 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE).

La enzima tiorredoxina-glutatión reductasa carente del dominio glutarredoxina de *Echinococcus granulosus* (108) (EgTR) fue cedida gentilmente por la Dra. Mariana Bonilla (Institut Pasteur, Montevideo). El anticuerpo primario anti-Prx $\text{SO}_2^-/\text{SO}_3^-$ de conejo fue comprado a la empresa AbCam, mientras que el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (IRDye® 800CW) fue comprado a la empresa LI-COR Biosciences. El marcador de peso molecular (unstained protein standard, broad range (10-200 kDa), P7704S) fue adquirido de New England BioLabs.

3. 2. Soluciones preparadas

Buffer A: 50 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, pH 7.6

Buffer B: 50 mM fosfato de sodio, 0.5 M imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.6.

Buffer de lisis A: Buffer A + 10mM imidazol.

Buffer de lisis B: 50 mM fosfato de sodio, 0.3 M NaCl, pH 7.6

Buffer de diálisis 1: 50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7.4

Buffer de diálisis 2: 20 mM fosfato de sodio, 100 mM NaCl, pH 8.0.

Buffer de proteólisis TEV proteasa: 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, pH 7.5.

Buffer de almacenamiento TEV proteasa: 25 mM fosfato de sodio, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.0.

Reactivo de FOX: Xylenol Orange tetrasódico (100 μM), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (250 μM), BHT (4 mM) y H_2SO_4 (25 mM), en metanol 90%.

3. 3. Expresión, purificación y procesamiento de proteínas recombinantes

3. 3. 1. Expresión y purificación de hPrx3 recombinante

Una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 Star (DE3) fue transformada con un vector de expresión pET-28a que contiene el gen que codifica para Prx3 humana, carente de la secuencia de importación a la mitocondria, con cola de polihistidina para facilitar su purificación y con sitio de corte para TEV proteasa que permite la escisión de la cola de histidina luego de la purificación. Adicionalmente, el plásmido contiene un gen que confiere resistencia frente al antibiótico kanamicina. A partir de esta cepa transformada se expresó hPrx3 para su utilización en los experimentos detallados a lo largo de este trabajo.

Los protocolos de expresión y purificación de enzimas recombinantes fueron puestos a punto por Romina Esteves. Para expresar la enzima, 20 mL de LB estéril con kanamicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron inoculados con 50 μL de crioinóculo de *E. coli* BL21 Star (DE3)

transformada, mezcla que fue incubada toda la noche a 30 °C, con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se adicionó 4 mL de precultivo a cada uno de 4 matraces con 750 mL de LB estéril con kanamicina (40 µg/mL), y se dejó crecer a 37 °C, con agitación a 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9 UA a 600 nm. Se indujo la expresión con IPTG (0.75 mM), a 30 °C, durante 4 hrs. Finalmente, se centrifugó el cultivo durante 30 min. a 4500 rpm, a 4 °C, y se almacenó el pellet a -20 °C.

El pellet congelado fue resuspendido en buffer de lisis A (40 mL/pellet de litro de cultivo), al que se le agregó inhibidor de proteasa PMSF (1 mM) y ADNasa (1 µg/mL). Se lisaron las células sonicando en frío: 6 ciclos de 15 segundos (Intensidad: 4, Duty cycle: 40%). El lisado obtenido fue centrifugado durante 30 minutos a 10000 rpm y a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de una membrana de poro de 0.2 µm.

En cámara fría utilizando dos columnas acopladas HiTrap Chelating de 5 ml previamente cargadas con níquel (Ni²⁺) y equilibradas con buffer A con 5 mM Imidazol, se siguieron los siguientes pasos:

- a. Se pasó el sobrenadante filtrado.
- b. Se lavó la columna con 120 mL de buffer A + 20 mM Imidazol.
- c. Se lavó la columna con 20 mL de buffer A + 50 mM Imidazol.
- d. Se lavó la columna con 10 mL de buffer A + 100 mM Imidazol.
- e. Se eluyó la proteína utilizando más de 15 mL de buffer B.

El eluido se recolectó en alícuotas de 1 mL y se midió absorbancia a 280 nm. Se dializaron las alícuotas recolectadas que presentaron una absorbancia mayor a 0.7 UA, en 2 L de buffer de diálisis 1, durante toda la noche a 4 °C y posteriormente se realizó una segunda diálisis en otros 2 L de buffer de diálisis 1 durante 6 hrs. a 4 °C. El eluido dializado se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Se realizó una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), en condiciones reductoras, para analizar los resultados de la purificación.

El mismo procedimiento de expresión y purificación fue realizado a partir de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con un plásmido que contiene el gen que codifica para Prx3C_pS, Prx3 donde la C_p fue sustituida por un residuo de serina, y a partir de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con un plásmido que contiene el gen que codifica para Trx1 humana (hTrx1).

3. 3. 2. Expresión y purificación de TEV proteasa

Para expresar la enzima, 20 mL de LB estéril con cloranfenicol (40 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL) fueron inoculados con 100 µL de crioinóculo de *E. coli* BL21 Rosetta pLysS transformada con un vector que contiene el gen que codifica para la TEV proteasa

recombinante con tag de histidina. Esto se incubó toda la noche a 37 °C, con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se adicionó 6 mL de precultivo a cada uno de 2 matraces con 750 mL de LB estéril con cloranfenicol (40 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL), y se dejó crecer a 37 °C, con agitación a 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 UA a 600 nm. Se indujo la expresión con IPTG (1 mM), a 20 °C, durante toda la noche con agitación a 220 rpm. Finalmente, se centrifugó 20 min. a 4500 g, a 4 °C, y se almacenó el pellet a -20 °C.

Se resuspendió el pellet congelado en 30 mL de buffer de lisis B, al que se le agregó inhibidor de proteasa PMSF (1 mM). Se lisaron las células sonicando en frío: 8 ciclos de 20 segundos (Intensidad: 4, Duty cycle: 40%) y se añadió 100 µL de Tritón X100 por cada 10 mL de lisado. El lisado fue centrifugado durante 45 minutos a 15000 g y a 4 °C, y el sobrenadante obtenido fue filtrado con una membrana de poro de 0.45 µm.

En cámara fría utilizando una columna HiTrap Chelating de 5 ml previamente cargada con níquel (Ni²⁺) y equilibrada con buffer A con 5 mM Imidazol, se siguieron los siguientes pasos:

- a. Se pasó el sobrenadante filtrado.
- b. Se lavó la columna con 100 mL de buffer A + 20 mM Imidazol.
- c. Se eluyó la proteína utilizando 15 mL de buffer B.

El eluido se recolectó en alícuotas de 1 mL y se midió absorbancia a 280 nm. Posteriormente, se equilibró una columna HiTrap desalting con buffer de almacenamiento de TEV y se desalaron las alícuotas obtenidas en el paso anterior. Se le añadió 10% de glicerol a la proteína eluida, se la dividió en alícuotas y almacenó a -80 °C. Se realizó una SDS-PAGE en gel de 12% poliacrilamida, en condiciones reductoras, para analizar los resultados de la purificación de la proteína.

3. 3. 3. Corte de hPrx3 por TEV proteasa

Se cuantificó la hPrx3 obtenida en el paso 3. 3. 1. ($\epsilon_{280\text{nm}} = 0.88 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y TEV proteasa ($\epsilon_{280\text{nm}} = 36130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁶ por medida de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. En función de la concentración hallada y el volumen de hPrx3 purificada, se calculó el volumen final requerido para llevar la enzima a una concentración final de 2 mg/mL. Se agregó suficiente TEV proteasa, de modo que la relación hPrx3:TEV fuese 10:1 y se completó con buffer de corte. Esta mezcla se dejó agitando durante toda la noche a 4 °C.

⁶ Coeficientes de extinción molar fueron calculados a partir de la secuencia aminoacídica de cada proteína utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Se dializó la mezcla anterior en 2L de buffer de diálisis 1 durante 4 hrs. a 4 °C, y posteriormente en otros 2 L de buffer durante toda la noche a 4 °C para eliminar el DTT y el EDTA. Trabajando en cámara fría, se utilizó una columna HiTrap Chelating cargada con níquel (Ni^{2+}) para purificar la hPrx3 cortada, separándola de la TEV proteasa, de colas de histidina y posiblemente de enzima sin cortar.

- a) Se pasó por la columna la mezcla dializada.
- b) Se lavó con buffer A + 50 mM imidazol y se recolectó el eluido en alícuotas de 1 mL.
- c) Se lavó con buffer A + 500 mM imidazol para eluir las colas de histidina, hPrx3 sin cortar y la TEV proteasa.

Se midió absorbancia a una longitud de onda de 280 nm a las alícuotas recolectadas en el punto *b*. Aquellas alícuotas que presentaban una absorbancia mayor a 0.7 U.A fueron dializadas en 2 L de buffer de diálisis-2, durante toda la noche a 4 °C, y en otros 2 L por 4-5 hs. a 4 °C para separar hPrx3 del imidazol. Se recolectó, alícuotó y almacenó a -80 °C la proteína cortada. Se realizó una SDS-PAGE en gel de 12% acrilamida, en condiciones reductoras, para analizar los resultados del corte y la purificación.

El mismo procedimiento de corte fue realizado para escindir la cola de histidina de Prx3C_pS recombinante.

3. 4. Evaluación del consumo de hidroperóxidos por hPrx3 mediante ensayo de FOX

Para cuantificar hidroperóxidos en solución se empleó el ensayo de FOX (Ferrous Oxidation Xylenol Orange) (109). Este se basa en una reacción de óxido-reducción, en medio ácido, entre el hidroperóxido a cuantificar y hierro ferroso, dando como producto hierro férrico que reacciona con xilenol orange para formar un complejo que absorbe entre 500 y 600 nm. En este sentido, a partir de medidas de absorbancia a 560 nm es posible determinar en forma indirecta la concentración de hidroperóxidos remanentes en solución tras ser incubados con hPrx3.

Considerando que la actividad de la hPrx3 es dependiente de su estado redox, previo a cada ensayo la enzima fue reducida, incubándola con ditioneitol (DTT) (2 mM) durante 30 minutos en frío. Una vez concluida la reacción de reducción, se utilizó una columna HiTrap desalting de 5 mL para eliminar el agente reductor y se cuantificó la enzima midiendo absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} = 19940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro Shimadzu. La concentración de soluciones stock de H_2O_2 fue determinada por medida de absorbancia a una longitud de onda de 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para cuantificar hidroperóxidos por ensayo de FOX fue necesario definir coeficientes de absorptividad molar, a una longitud de onda de 560 nm, para cada uno de los hidroperóxidos con los que se trató hPrx3 (**Fig. 14**). En este sentido, se prepararon soluciones de concentración conocida de H₂O₂ y de los diferentes AG-OOHs en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.8. 100 µL de cada solución fueron agregados a 900 µL de reactivo de FOX y se midió absorbancia a 560 nm, utilizando como blanco una solución de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.8 (100 µL) y reactivo de FOX (900 µL). De este modo, se determinaron coeficientes de absorptividad molar a 560 nm de 43000 M⁻¹cm⁻¹, 60000 M⁻¹cm⁻¹ y 44000 M⁻¹cm⁻¹ para H₂O₂, 15(S)-HpEPE y PGG₂, respectivamente, cercanos a coeficientes previamente reportados (100, 110).

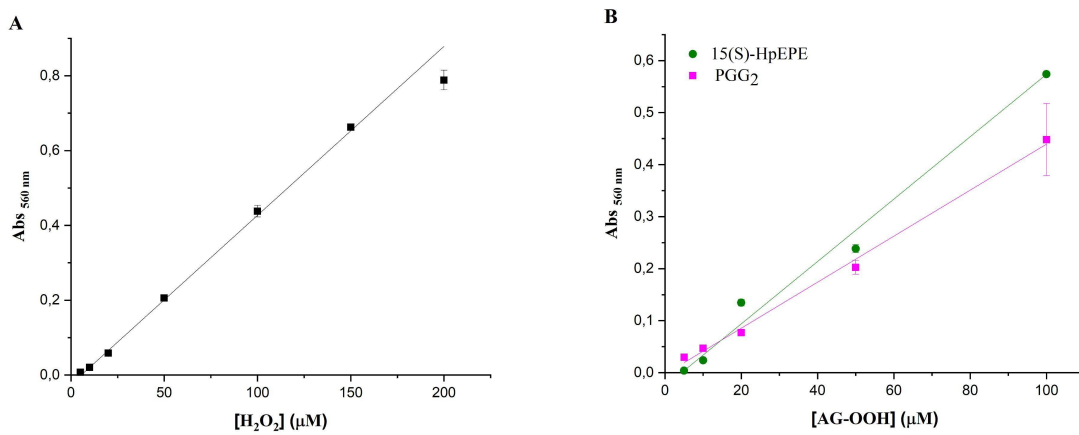


Figura 14. Curvas de calibración para el ensayo de FOX. Se midió la absorbancia, a una longitud de onda de 560 nm, para concentraciones crecientes de H₂O₂ (**A**), 15(S)-HpEPE y PGG₂ (**B**), permitiendo la determinación de coeficientes de extinción molar para cada hidroperóxido. Las barras de error corresponden al desvío estándar de la concentración de oxidante cuantificada, dado por la realización de duplicados para cada mezcla.

Habiendo determinado el coeficiente de extinción molar para los distintos hidroperóxidos a la longitud de onda indicada, fue posible caracterizar el consumo de hidroperóxidos por hPrx3 en condiciones no catalíticas. Se incubó hPrx3 reducida (20 µM), con H₂O₂ (50 µM), 15(S)-HpEPE (50 µM) y PGG₂ (50 µM). A tiempos 0 y 30 s, 50 µL de cada mezcla de reacción fue agregada a 450 µL de reactivo de FOX. Como control se realizó el mismo procedimiento para los distintos hidroperóxidos en ausencia de hPrx3. Se midió absorbancia a 560 nm a cada una de las muestras, realizado por triplicado, para así cuantificar estas especies en solución luego de distintos tiempos de incubación con la enzima.

3. 5. Estudio de la cinética de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por distintos AG-OOHs

Considerando que el ciclo catalítico de la Prx3 involucra el pasaje por distintas conformaciones estructurales, el entorno de los aminoácidos responsables de la fluorescencia intrínseca de la proteína se ve modificado como consecuencia del desarrollo de las reacciones de oxidación, resolución y sobreoxidación. Cambios en el entorno de los fluoróforos, derivan en cambios en la fluorescencia intrínseca de la enzima cuando ésta es excitada a 295 nm. La reacción de oxidación de Prx3 es evidenciada por un decaimiento exponencial rápido de la intensidad de fluorescencia intrínseca, cuya constante observada es dependiente de la concentración de sustrato, por ser la reacción de oxidación un proceso bimolecular. En este sentido, la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de oxidación puede ser determinada a partir del incremento de las constantes observadas con la concentración de oxidante. Por otra parte, la reacción de resolución provoca un aumento lento de la fluorescencia intrínseca, con una constante que no depende de la concentración de oxidante, siendo que la resolución implica un proceso intramolecular. Sin embargo, la constante observada para la fase de aumento de la fluorescencia intrínseca puede crecer con la concentración de sustrato en caso de que se desarrolle una reacción alternativa a la resolución, la reacción de sobreoxidación. A partir del ajuste lineal de las constantes observadas para esta fase en función de la concentración de oxidante es posible obtener la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de sobreoxidación. De este modo, se caracterizó la cinética de las reacciones de oxidación y sobreoxidación, siguiendo las variaciones de la intensidad de fluorescencia intrínseca en el tiempo.

En un espectrofotómetro de flujo detenido (SX20, Applied Photophysics), se mezcló rápidamente hPrx3 (0.15/0.3 μM) reducida con concentraciones crecientes en exceso de los distintos hidroperóxidos, registrando cursos temporales de cambio de fluorescencia total a una longitud de onda de excitación de 295 nm. Se emplearon concentraciones de hidroperóxido en exceso respecto a la concentración de enzima, con el objetivo de favorecer condiciones de pseudo-primer orden, pero no lo suficientemente altas como para superar la concentración micelar crítica (CMC). Si bien no se conoce la CMC para los AG-OOHs empleados, sí se conoce la del ácido graso precursor AA, que varía entre 10 y 60 μM (111, 112). Se trabajó en buffer fosfato de sodio (50 mM) con DTPA (0.1 mM), a pH 7.8, manteniendo la temperatura entre 11 y 12 °C. Adicionalmente, se hicieron controles con Prx3C_pS, ácido eicosapentaenoico (EPA), buffer y 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE).

3. 6. Evaluación de la actividad de hPrx3 en presencia de AG-OOHs

En condiciones fisiológicas, la actividad de la hPrx3 depende de la presencia de agentes reductores como Trx2 o Grx2, capaces de devolver a la enzima a su estado reducido y permitir que continúe desarrollando su función reductora de hidroperóxidos. *In vitro*, puede evaluarse la actividad de la enzima en presencia de Trx, TrxR y NADPH, por un ensayo acoplado. El ensayo consiste en un primer ciclo de reducción de hidroperóxidos por Trx catalizado por hPrx3 y un segundo ciclo de reducción de Trx por NADPH catalizado por TrxR, por lo que siguiendo la oxidación de NADPH por absorbancia a 340 nm es posible medir en forma indirecta la actividad del primer ciclo, siempre y cuando se trabaje a concentraciones de TrxR que no limiten la velocidad de oxidación de NADPH, de modo que el segundo ciclo no sea el limitante sino el primero.

Empleando un espectrofotómetro UV-vis Shimadzu, asociado a un sistema de control de temperatura de tipo Peltier, se estudió la actividad catalítica de hPrx3 con AG-OOHs como sustrato oxidante. Se incubó *EgTR*⁷ (40 nM), hTrx1 (30 μ M) y hPrx3 (0.8 μ M), en buffer fosfato de sodio (50 mM) y DTPA (0.1 mM) a pH 7.8 y 25 °C, durante 1 minuto para permitir la reducción completa de hPrx3. Posteriormente, se añadieron los oxidantes correspondientes (H_2O_2 y AG-OOHs) bajo agitación en vortex y se transfirió la mezcla de reacción a una cubeta de cuarzo. Midiendo absorbancia a 340 nm, se siguió el consumo de NADPH ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) durante 180 s y, posteriormente, se agregó H_2O_2 (20 μ M) a la mezcla de reacción. De este modo, mediante un ensayo acoplado, se evaluó la actividad de la enzima frente a distintos hidroperóxidos y se determinó si estos causan o no la inactivación de la misma.

3. 7. Evaluación de la oxidación y sobreoxidación de hPrx3 tratada con distintos AG-OOHs por SDS-PAGE y western blot

Siendo que cambios en el estado redox de hPrx3 están asociados a cambios en la estructura cuaternaria de la proteína, el desarrollo de las reacciones de oxidación y sobreoxidación puede ser evidenciado a través de cambios en el número de subunidades que forman a la enzima y, por lo tanto, en su peso molecular. En este sentido, se empleó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, reductoras y no reductoras, como método para discriminar entre las formas monoméricas y diméricas covalentes de la enzima, complementado por la detección por western blot de formas sobreoxidadas de hPrx3, para así revelar la presencia de enzima oxidada y/o sobreoxidada como consecuencia del tratamiento con concentraciones variables de distintos sustratos.

⁷ Se empleó *EgTR* que presenta actividad tiorredoxina reductasa (TrxR), capaz de catalizar la reducción de hTrx1.

En primer lugar, hPrx3 reducida (5 μM) sin tratar, y tratada con H_2O_2 (500 μM) y 15(S)-HpETE (10 μM) durante 15 minutos fue incubada con NEM (20 mM), un agente alquilante que bloquea aquellos grupos tiol que permanecieron libres luego de la incubación con el sustrato oxidante. Cada mezcla de reacción fue incubada tanto con buffer de muestra con dodecilsulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol (β -ME) como con buffer de muestra no reductor (con SDS y sin β -ME). Se corrieron las muestras anteriormente descritas, en gel de 15% poliacrilamida, en condiciones de corriente constante a 33 mA. El gel fue teñido empleando Azul de Coomassie y posteriormente incubado con solución de Destain y agua destilada.

Por otra parte, se incubó hPrx3 reducida (5 μM) con concentraciones crecientes de H_2O_2 (5-500/1000 μM), 15(S)-HpEPE (5-20 μM), 15(S)-HpETE (5-20 μM) y FE-15(S)-HpETE (5-20 μM), en buffer fosfato de sodio (50 mM) con DTPA 0.1 mM, pH 7.8. Luego de 15 minutos de reacción, las muestras fueron tratadas con NEM (20 mM) por 15 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon dos geles de 15% poliacrilamida con SDS, y se sembró en ambos 20 μL de cada una de las muestras anteriores, que fueron previamente diluidas en buffer de muestra no reductor. Se corrieron las muestras en ambos geles en condiciones de corriente constante a 55 mA. Uno de los geles fue teñido con Azul de Coomassie y posteriormente incubado con solución de Destain y agua destilada. El gel restante fue utilizado para la realización de un western blot, por lo que se realizó la transferencia de las corridas a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de corriente constante a 70 mA durante 1 hora. Posterior a la transferencia, se bloqueó la membrana con PBS-Leche 3% durante 1 hora. Se lavó la membrana con PBS-Tween 0.1% y se la incubó con anticuerpo primario capaz de reconocer formas sulfiniladas y sulfoniladas de Prx (anti-Prx $\text{SO}_2^-/\text{SO}_3^-$) durante toda la noche a 4 $^\circ\text{C}$. Luego de otra serie de lavados con PBS-Tween 0.1%, se incubó la membrana con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavó la membrana con PBS-Tween 0.1% y, finalmente, se reveló la membrana en un Odyssey Imaging System.

Paralelamente, se realizó electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no reductoras, y análisis por western blot de hPrx3 reducida (20 μM) sin tratar y tratada con H_2O_2 y PGG_2 (50 μM) que fueron incubadas con 2-iodoacetamida (20 mM) durante 30 minutos a 37 $^\circ\text{C}$ y, posteriormente desaladas usando microcolumnas de filtración molecular PD SpinTrap G-25, equilibradas en buffer bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 50 mM, pH 8. Dichas muestras fueron corridas en una SDS-PAGE y analizadas por western blot anti-Prx $\text{SO}_2^-/\text{SO}_3^-$, siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente, agregando seroalbúmina bovina (BSA) como control negativo y hPrx3 (5 μM) tratada con 15(S)-HpEPE (20 μM) como control positivo.

3. 8. Detección de sobreoxidación en hPrx3 por reacción con H₂O₂, 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE mediante espectrometría de masa

La reacción de sobreoxidación de la cisteína peroxidática implica la oxidación de C_p-SOH a C_p-SO₂H o C_p-SO₃H, lo que conlleva la adición de átomos de oxígeno y, por lo tanto, un aumento predecible en el peso molecular de la enzima. Para detectar cambios en el peso molecular de la enzima, como consecuencia del tratamiento con AG-OOHs, se empleó la espectrometría de masas. hPrx3 reducida (10 μM) fue incubada con H₂O₂ (20 μM), 15(S)-HpEPE (10 y 20 μM), 15(S)-HpETE (10 y 20 μM), en buffer fosfato de sodio (50 mM) con DTPA 0.1 mM, pH 7.8. Adicionalmente, se hicieron controles con hPrx3 reducida sin tratar y Prx3C_pS (10 μM) tratada con 15(S)-HpEPE (20 μM). Se dejaron desarrollar las reacciones durante 30 minutos y cada una de las muestras fue alquilada utilizando 2-iodoacetamida (5 mM), durante 30 minutos a 37 °C. Concluida la reacción, estas muestras fueron desaladas usando microcolumnas de filtración molecular PD SpinTrap G-25, equilibradas en buffer NH₄HCO₃ 50 mM, pH 8.

Las muestras fueron cargadas en una columna C4 (GraceVydac 214MS5115) para su separación por HPLC, utilizando 0.1% ácido fórmico en agua nanopura (solvente A) y 0.1% ácido fórmico en CH₃CN (solvente B) como fase móvil. La proteína fue eluida empleando un gradiente lineal de 5 a 50% de solvente B durante 10 minutos, seguido de un flujo de 100 μL/min de 50% de solvente B por otros 10 minutos. La detección fue realizada en un espectrómetro de masa ESI-triple cuadrupolo (QTrap4500, ABSciex), seteado en modo positivo Q1, en el rango de 500 a 2000 m/z con una velocidad de escaneo de 200 Da/s, y resolución Q1 en UNIT. Los parámetros empleados fueron IS, 5000; TEM, 300; DP, 120; EP, 10; CUR, 20; GS1, 30; GS2, 20. La adquisición de datos fue realizada en Analyst 1.6.2 (ABSciex), mientras que para el análisis y deconvolución de los espectros se empleó el software PeakView 2.2 (ABSciex). Tanto la separación por HPLC como la detección por espectrometría de masa fue llevada a cabo por el Dr. Mauricio Mastrogiovanni (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República).

4. Resultados

4. 1. Purificación y procesamiento de proteínas recombinantes

Para caracterizar la actividad reductora de AG-OOHs de hPrx3, se desarrollaron ensayos *in vitro* empleando hPrx3 recombinante. Utilizando un sistema procariota para su expresión, fue posible obtener en forma rápida y en grandes cantidades una proteína prácticamente homóloga a la nativa fusionada a una cola de polihistidina. La presencia de dicho tag fue aprovechada para su purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, empleando una columna HiTrap Chelating cuya matriz presenta grupos quelantes capaces de inmovilizar metales de transición como Ni⁺². Los residuos de histidina presentes en la proteína recombinante presentan anillos imidazol que actúan como grupos electrón-dador para formar enlaces de coordinación con el metal inmovilizado, permitiendo la retención de la hPrx3 en la columna y su separación de una mezcla tan compleja como lo es un lisado bacteriano.

Para verificar la correcta purificación de la proteína de interés, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras de una serie de alícuotas recolectadas a lo largo del proceso de purificación (**Fig. 15, A**). La mezcla de proteínas en solución obtenida luego de la inducción de la expresión y procesamiento del pellet bacteriano, aquí denominada *sobrenadante* o *SN*, incluiría a la hPrx3 en alta proporción. Esto se verifica en el carril *SN* de la *Fig. 15, A*, donde se detectó una gran cantidad de bandas correspondientes a diversas proteínas propias del sistema de expresión bacteriano y una banda intensa de alrededor de 25 kDa coincidente con el peso molecular esperado para la proteína recombinante expresada. Si bien se esperaba que la hPrx3 fuese retenida por la columna, ésta fue detectada en la fracción no unida o flow-through (*FT*), por lo que parte de la proteína expresada se perdió durante el proceso de purificación, probablemente debido a que el rendimiento de proteína supera la capacidad de retención de la columna empleada. De todos modos, luego de los lavados con soluciones de baja concentración de imidazol para eluir aquellas proteínas que interactuaron en forma inespecífica con la matriz, se logró eluir la hPrx3 efectivamente retenida en la columna al pasar una solución de 500 mM imidazol que compite fuertemente por los sitios de unión a la matriz. Como se evidencia en el carril *E500* de la *Fig. 15, A*, la fracción eluida se compone mayoritariamente por la proteína de interés, la cual se encuentra concentrada y con un nivel de pureza perfectible.

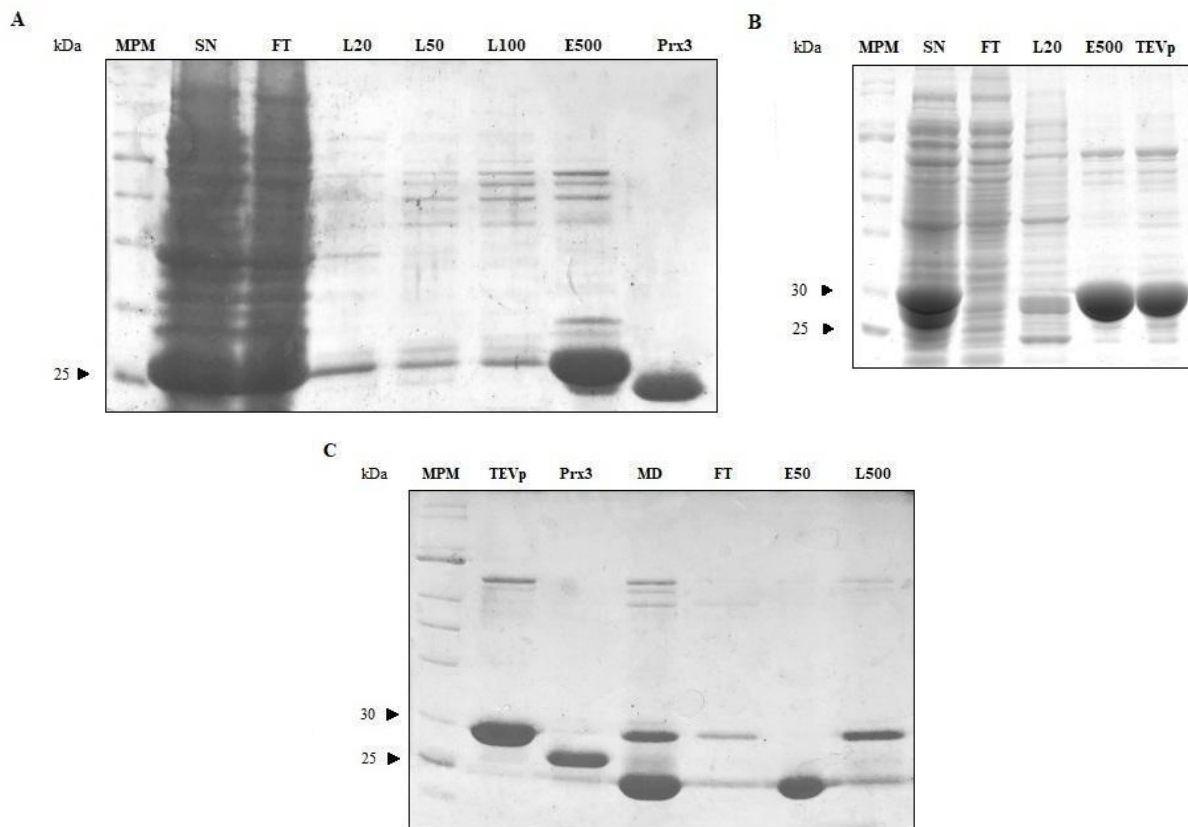


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras de la purificación de hPrx3 (A), la purificación de TEV proteasa (B) y corte de la cola de histidina de hPrx3 (C). (A) De izquierda a derecha se sembró marcador de peso molecular (MPM) y alícuotas de sobrenadante (SN), flow-through (FT), lavado con buffer A + 20 mM imidazol (L20), lavado con buffer A + 50 mM imidazol (L50), lavado con buffer A + 100 mM imidazol (L100), elución con buffer A + 500 mM imidazol (E500), y hPrx3 previamente purificada y cortada con TEV proteasa (Prx3). (B) De izquierda a derecha se sembró MPM, y alícuotas de SN, FT, L20, E500, y TEV proteasa previamente purificada (TEVp). (C) De izquierda a derecha se sembró MPM, TEV proteasa previamente purificada (TEVp), hPrx3 previo al corte (Prx3), mezcla de corte dializada (MD), alícuotas de flow-through (FT), elución con buffer A + 50 mM imidazol (E50), y lavado con buffer A + 500 mM imidazol (L500).

Con el propósito de obtener una enzima tanto estructural como funcionalmente semejante a la que se encuentra *in vivo* en células humanas, la proteína recombinante obtenida fue procesada para escindir la cola de polihistidina presente en su extremo N-terminal. En este sentido, fue aprovechada la presencia de un sitio de corte para TEV proteasa que separa la cola de histidina de la secuencia de hPrx3. Debido a esto fue necesario expresar y purificar la enzima TEV proteasa siguiendo el protocolo detallado en la *sección 3.3.2.*, permitiendo obtener la proteína de interés con un alto rendimiento (Carril E500 en Fig. 15, B).

Una vez obtenida la TEV proteasa fue posible realizar el procesamiento de la hPrx3. El corte por esta proteasa elimina la cola de histidina, dejando un residuo de serina y tres de glicina en el extremo N-terminal de la secuencia de la hPrx3, que no están presentes en la enzima nativa pero son necesarios para aumentar el rendimiento del proceso de escisión. Siendo que la enzima cortada debe ser separada de la TEV proteasa, de las colas de histidina escindidas y posiblemente de enzima que no fue sujeta a procesamiento, se realizó una nueva purificación por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados donde se aprovechó la ausencia de tag de histidina en la proteína de interés, a diferencia del resto de los componentes de la mezcla. En este sentido, hPrx3 procesada fue eluida a baja concentración de imidazol (Carril *E50* en **Fig. 15, C**) y así separada de los demás componentes que fueron principalmente retenidos por la columna y posteriormente eluidos a alta concentración de imidazol (Carril *L500* en **Fig. 15, C**). Adicionalmente, el correcto procesamiento de la enzima fue evidenciado por una disminución en el peso molecular de la proteína eluida respecto de la enzima previo a su exposición a la TEV proteasa (Carril *Prx3* en **Fig. 15, C**). De este modo, se obtuvo una enzima prácticamente análoga a la Prx3 nativa y madura, con un alto nivel de pureza.

4. 2. Evaluación del consumo de hidroperóxidos por hPrx3 mediante ensayo de FOX

Considerando la ya conocida actividad reductora de H_2O_2 que presenta hPrx3, se espera que la enzima recombinante obtenida, en estado reducido, sea capaz de consumir dicha especie en solución con una estequiometría de consumo de 1:1, en condiciones no catalíticas. Luego de incubar hPrx3 reducida (20 μM) con H_2O_2 (50 μM) por 30 s, fue posible cuantificar en forma indirecta (véase protocolo en *sección 3. 4.*) la concentración de oxidante remanente y así evidenciar el consumo de H_2O_2 en presencia de la enzima (**Fig. 16**). Es de destacar que por cada equivalente de hPrx3 se consumió 0.8 equivalente de H_2O_2 , que podría explicarse si una fracción minoritaria de la enzima se encuentra oxidada, a pesar de haber sometido a la misma a un proceso de reducción (ver *sección 4.5*). Teniendo esto en consideración puede decirse que la hPrx3 recombinante presentó la actividad esperada en presencia de H_2O_2 , permitiendo replicar el ensayo para la evaluación del consumo de AG-OOHs.

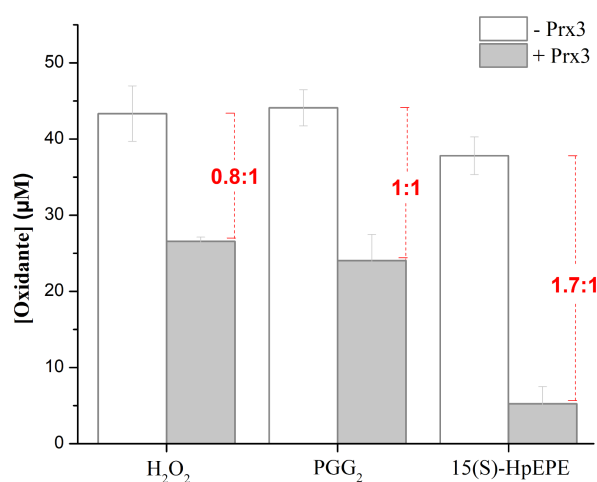


Figura 16. Evaluación del consumo de hidroperóxidos por hPrx3. Por ensayo FOX (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange) se determinó la concentración de H₂O₂, PGG₂ y 15(S)-HpEPE en ausencia y presencia de hPrx3 reducida (20 µM), luego de 30 s de incubación, en buffer fosfato de sodio (50 mM), a pH 7.8 y 25 °C. Los números en rojo indican la estequiometría de consumo de hidroperóxido, mientras que las barras de error en gris corresponden al desvío estándar de la concentración de oxidante cuantificada, dado por la realización de triplicados para cada mezcla de reacción.

Uno de los AG-OOHs evaluados corresponde a prostaglandina G₂ o ácido 9α,11α-epidioxi-15S-hidroperoxi-prosta-5Z,13E-dien-1-oico (PGG₂) (véase *Fig. 13, C*), un endoperóxido-hidroperóxido derivado de AA por acción de la enzima COX. Esta especie presenta un grupo peroxilo sobre el carbono 15 pasible de ser reducido a un grupo hidroxilo por enzimas con actividad peroxidasa. Efectivamente, al mezclar PGG₂ con hPrx3 reducida se registró consumo de 1 equivalente hidroperóxido por cada equivalente de hPrx3, levemente mayor a lo observado para H₂O₂, evidenciando actividad reductora de AG-OOHs.

De igual forma fue evaluado el consumo de ácido 15S-hidroperoxi-5Z, 8Z, 11Z, 13E, 17Z-eicosapentaenoico (15(S)-HpEPE) (véase *Fig. 13, A*), especie derivada de EPA con un grupo peroxilo sobre C15. Si bien 15(S)-HpEPE fue consumido en presencia de hPrx3 reducida, la estequiometría registrada fue de 1.7:1. En este sentido, 1.7 equivalentes de 15(S)-HpEPE fueron consumidos por equivalente de enzima, evidenciando la posibilidad de que se haya desarrollado una reacción alternativa a la resolución por formación de enlace disulfuro, la reacción de sobreoxidación. Por lo tanto, empleando el ensayo de FOX fue posible identificar actividad reductora de hidroperóxidos de ácidos grasos para hPrx3 y determinar diferencias en cuanto a la estequiometría de consumo de AG-OOHs con características estructurales divergentes.

4. 3. Estudio de la cinética de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por distintos AG-OOHs

Siguiendo la variación en el tiempo de la intensidad de fluorescencia intrínseca de hPrx3 en presencia de diferentes AG-OOHs, en buffer fosfato de sodio (50 mM) y DTPA (0.1 mM), a pH 7.8 y 12 °C, se caracterizó la cinética de oxidación y sobreoxidación de la enzima, determinando constantes de velocidad para las distintas reacciones. Además de 15(S)-HpEPE (**Fig. 17, A**) y PGG₂ (**Fig. 17, C**), la enzima fue incubada también con 15(S)-HpETE (**Fig. 17, B**), especie derivada de AA con un grupo peroxilo sobre C15 por acción de 15-LOX. Estructuralmente (véase *Fig. 13*), 15(S)-HpEPE difiere únicamente en la presencia de un doble enlace adicional respecto a 15(S)-HpETE, siendo ambos hidroperóxidos de ácidos grasos de 20 carbonos, oxidados sobre C15. Esta semejanza estructural es concordante con cinéticas de oxidación y sobreoxidación similares, con fases de caída de la fluorescencia tan rápidas que resulta difícil ajustarlas a curvas exponenciales dado que, incluso usando concentraciones muy bajas de enzima e hidroperóxido, gran parte de la reacción ocurre en el tiempo de mezclado del equipo de 1.5 ms. De todos modos, considerando un tiempo de vida media para la fase de decaimiento de la fluorescencia menor a 10 ms en presencia de concentraciones de entre 1.5 y 2 μM 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE, la constante de velocidad de oxidación por estos sustratos puede estimarse mayor a $3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por el contrario, la fase de incremento en la fluorescencia intrínseca de la enzima, en presencia de concentraciones crecientes de ambos oxidantes, pudo ser ajustada a curvas exponenciales, permitiendo obtener constantes observadas que crecen con la concentración de AG-OOH. De esta forma, se evidenció el desarrollo de la reacción de sobreoxidación de hPrx3, tanto en presencia de 15(S)-HpEPE como 15(S)-HpETE, y fue posible determinar constantes de velocidad para dicha de reacción de $(2.6 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $(1.7 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (**Fig. 17, D**).

En el caso de PGG₂, tanto la fase de decaimiento como la de recuperación de la fluorescencia fueron de menor velocidad, permitiendo ajustarlas a curvas exponenciales. La constante de velocidad de oxidación fue obtenida a partir del incremento de la constante observada (k_{obs}) de la fase de disminución de la fluorescencia con la concentración de oxidante, siendo esta de $(2.4 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (**Fig. 17, C (inserto)**). Al igual que se realizó para 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE, se determinó la constante de sobreoxidación por PGG₂ con un valor de $(3.1 \pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (**Fig. 17, D**). Es de destacar que una Prx3 mutante (Prx3C_pS), donde la C_p fue reemplazada por un residuo de serina, no sufrió cambio alguno en la intensidad de fluorescencia intrínseca al ser incubada con PGG₂ (**Fig. 17, E**), así como tampoco se registró cambio en la fluorescencia intrínseca de hPrx3 al ser tratada con EPA, especie no oxidada de la que deriva 15(S)-HpEPE (**Fig. 17, F**). De este modo, se evidenció que la variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por la enzima está directamente relacionada con la ocurrencia de las reacciones

de oxidación y sobreoxidación del grupo tiol de la cisteína peroxidática con los sustratos peroxidados.

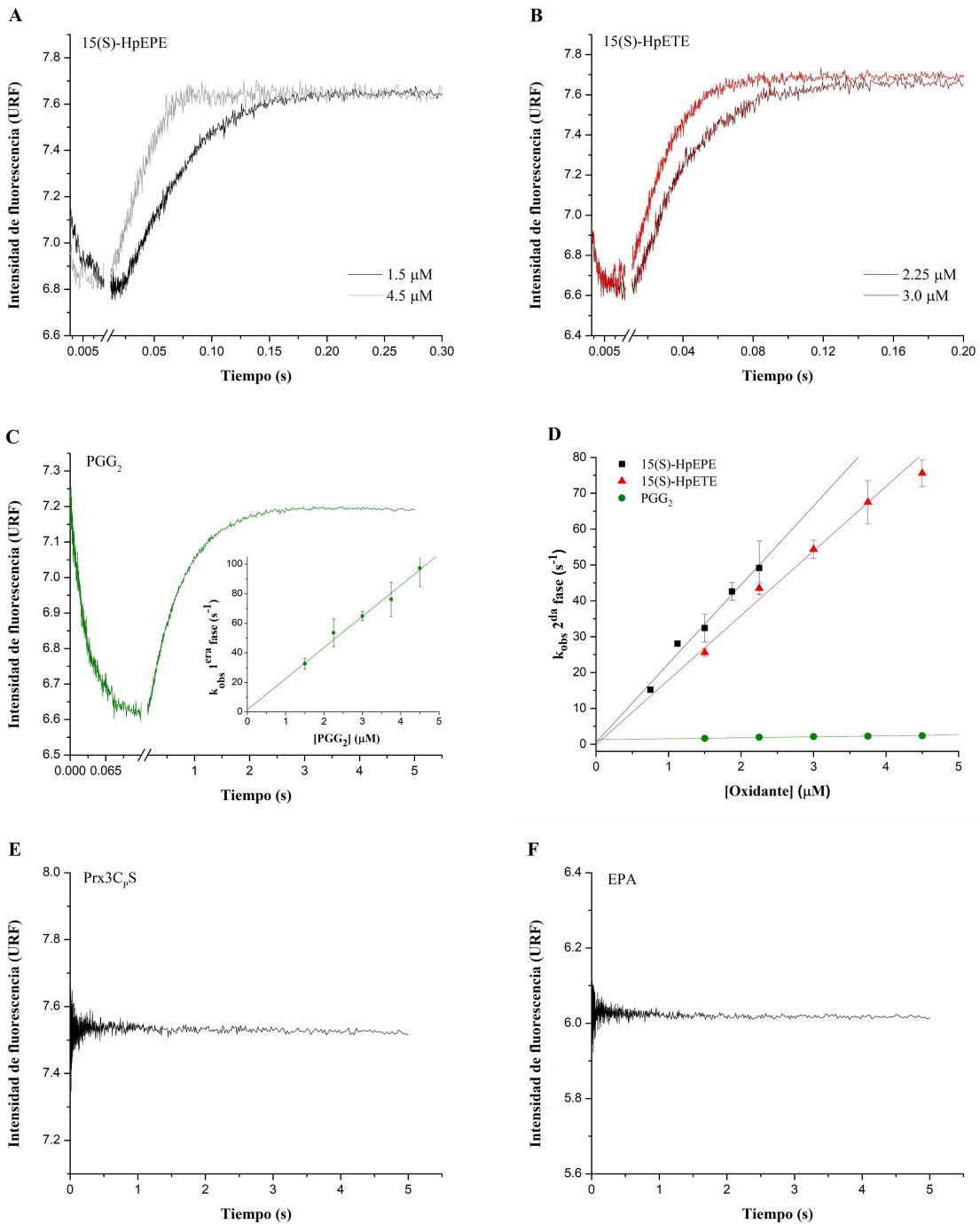


Figura 17. Determinación de las constantes de velocidad de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por variación de la fluorescencia intrínseca en el tiempo. Se muestran cursos temporales de variación en la intensidad de fluorescencia emitida ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) por hPrx3 reducida tratada con concentraciones crecientes de 15(S)-HpEPE (A), 15(S)-HpETE (B) y PGG₂ (C) en buffer fosfato de sodio (50 mM) y DTPA (0.1 mM), a pH 7.8 y 11-12°C. Las fases rápida, en el caso de PGG₂, y

lenta de cambio en la fluorescencia fueron ajustadas a curvas exponenciales, con k_{obs} que crecen en forma lineal con la concentración de sustrato, permitiendo determinar la constante de oxidación de hPrx3 por PGG₂ (**C, inserto**) y la constante de velocidad para la reacción de sobreoxidación por los diferentes AG-OOHs (**D**). Se muestran los ajustes lineales correspondientes a uno de los tres experimentos independientes realizados para cada AG-OOH, mientras que las barras de error representan el desvío estándar dado por la realización de 4 o 5 replicados para cada concentración de oxidante. Como control, se muestran los cursos temporales de intensidad de fluorescencia intrínseca para Prx3C_pS y hPrx3 (0.3 μM) tratadas con PGG₂ (0.3 μM) (**E**) y EPA (3.0 μM) (**F**), respectivamente.

Considerando la posibilidad de que *in vivo* la enzima no solo se encuentre con estos AG-OOHs libres en la matriz mitocondrial sino también unidos a fosfolípidos de membrana, resulta de interés evaluar la cinética de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por fosfolípidos esterificados con ácidos grasos peroxidados. En este sentido, se utilizó como modelo de este tipo de sustrato a 1-estearoil-2-15(S)-HpETE-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE-15(S)-HpETE) (véase *Fig. 13, D*), una molécula de glicerol esterificada en la posición *sn*-1 por un ácido graso saturado de 18 carbonos, ácido esteárico, mientras que en la posición *sn*-3 por un grupo fosfato esterificado por etanolamina y en la posición *sn*-2 por el AG-OOH, 15(S)-HpETE.

FE-15(S)-HpETE se mezcló en un espectrofotómetro de flujo detenido con hPrx3 (0.3 μM) en buffer fosfato de sodio (50 mM) y DTPA (0.1 mM), a pH 7.8 y 12 °C. Al igual que ocurrió para los AG-OOHs libres, la incubación de la enzima con el fosfolípido oxidado provocó una rápida disminución de la fluorescencia intrínseca, evidenciando el desarrollo de la reacción de oxidación de hPrx3 (**Fig. 18, A**). Las fases de decaimiento fueron ajustadas a curvas exponenciales para así obtener k_{obs} que incrementan linealmente con la concentración de FE-15(S)-HpETE. De la pendiente del ajuste lineal de k_{obs} en función de la concentración se obtuvo una constante de velocidad para la reacción de oxidación de $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (**Fig. 18, B**). Posterior a la fase de caída de la fluorescencia, se registró una fase de recuperación de la misma. Sin embargo, la k_{obs} registrada para dicha fase no muestra una dependencia con la concentración de oxidante (**Fig. 18, B (inserto)**), presentando un valor aproximado de 1.35 s^{-1} , concordante con la constante de resolución reportada para hPrx3. Por lo tanto, a diferencia de lo que se observó para los AG-OOHs libres, este método no pudo detectar el desarrollo de la reacción de sobreoxidación de hPrx3 por FE-15(S)-HpETE.

Adicionalmente, se realizaron controles incubando a la hPrx3 con un fosfolípido no oxidado y con buffer fosfato de sodio (50 mM) y DTPA (0.1 mM), pH 7.8 (**Fig. 18, C**). El fosfolípido empleado fue 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FE) (véase *Fig. 13, E*), que difiere de FE-15(S)-HpETE en el ácido graso que esterifica su posición *sn*-2, siendo éste ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado de 18 carbonos carente de

grupo peroxilo que pueda provocar la oxidación de la enzima. Si bien se registró un cambio en la fluorescencia intrínseca de hPrx3 (0.3 μM) en presencia de FE (0.3 μM), este cambio fue minoritario en comparación a la variación observada cuando la enzima se incubaba con igual concentración de FE-15(S)-HpETE y equivalente a la variación registrada en caso de incubación con buffer. Por lo tanto, dicho cambio se debe a la presencia de peróxido adventicio en la solución tampón utilizada⁸, concordante con la detección por SDS-PAGE y espectrometría de masa de dímeros de hPrx3 previamente reducida e incubada en buffer (ver secciones 4.5-4.6), y no a algún tipo de interacción específica o inespecífica entre la enzima y el fosfolípido no oxidado que pudiese estar provocando cambios en el ambiente de los residuos responsables del fenómeno fluorescente. Esto indica que la variación en la fluorescencia intrínseca de la hPrx3, en caso de tratamiento con FE-15(S)-HpETE, es consecuencia del desarrollo de las reacciones de oxidación y resolución, y no por ocurrencia de algún fenómeno físico o químico alternativo.

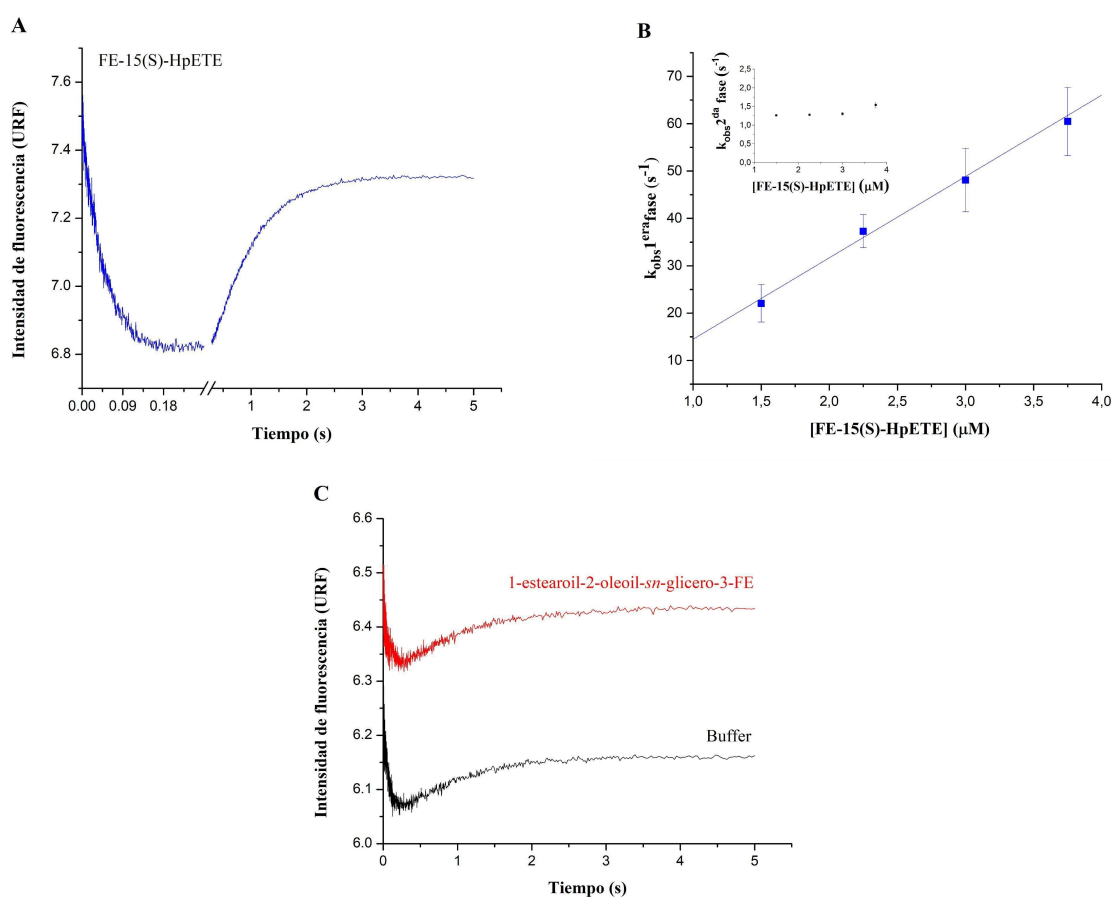


Figura 18. Cinética de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por FE-15(S)-HpETE. Se muestra un curso temporal de variación en la intensidad de fluorescencia emitida ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$) por hPrx3 reducida (0.3 μM) tratada con FE-15(S)-HpETE en buffer fosfato de sodio (50 mM) y DTPA (0.1

⁸ La presencia de H_2O_2 adventicio es variable entre experimentos independientes, razón por la que no se observa oxidación leve de hPrx3 en **Fig. 17, F** cuando se incubaba la enzima con EPA.

mM), a pH 7.8 y 12 °C **(A)**. Las fases de decaimiento de la fluorescencia fueron ajustadas a curvas exponenciales, con k_{obs} que crecen en forma lineal con la concentración de sustrato, permitiendo determinar la constante de oxidación de hPrx3 por FE-15(S)-HpEPE **(B)**, mientras que la k_{obs} para la segunda fase no sufrió variación al aumentar la concentración de oxidante con un valor aproximado de 1.35 s^{-1} **(B, inserto)**. Como control, se muestra el curso temporal de intensidad de fluorescencia intrínseca para hPrx3 incubada con buffer y FE **(C)**.

4. 4. Evaluación de la actividad de hPrx3 en presencia de AG-OOHs

Si bien pudo identificarse consumo de AG-OOHs en presencia de hPrx3 por ensayo de FOX y caracterizar la cinética de oxidación y sobreoxidación de la enzima por cambio de fluorescencia, ambos ensayos fueron realizados bajo condiciones no catalíticas y resulta de interés evaluar la actuación de hPrx3 en presencia de un sistema reductor capaz de devolver la enzima oxidada a su forma reducida y activa. El agregado de H_2O_2 (20 μM) a un medio que contiene *EgTR*, hTrx1 y hPrx3, a pH 7.8 y 25 °C, provocó un consumo rápido de NADPH, especie dadora de electrones, evidenciado por una disminución en la absorbancia registrada a una longitud de onda de 340 nm **(Fig. 19, —)**. Esta caída en la absorbancia no fue registrada para una mezcla carente de hPrx3, así como tampoco se detectó consumo de NADPH al incubar Prx3C_pS con hidropéroxido (*no se muestra*). En este sentido, la disminución en la absorbancia del medio está directamente relacionada con el consumo de hidropéroxidos catalizado por la hPrx3, reacción que demostró dependencia con la concentración de hPrx3 y no de *EgTR* (*no se muestra*), por lo que la reducción del hidropéroxido catalizada por hPrx3 es el paso limitante en el ensayo acoplado y no la reducción de Trx catalizada por *EgTR*.

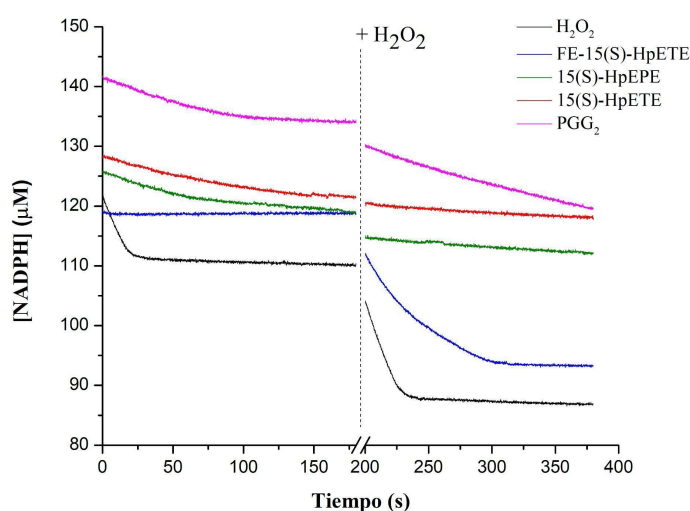


Figura 19. Evaluación de la actividad de hPrx3 en presencia de AG-OOHs. A pH 7.8 y 25 °C, se siguió el consumo de NADPH, por cambio en la absorbancia a 340 nm, en presencia de *EgTR*,

hTrx1 y hPrx3, al adicionar distintos hidroperóxidos a la mezcla de reacción (— H_2O_2 ; — FE-15(S)-HpETE; — 15(S)-HpEPE; — 15(S)-HpETE; — PGG_2). Pasados 180 s, se agregó H_2O_2 (20 μM) y se registró nuevamente consumo de NADPH.

Para la reacción con H_2O_2 (20 μM) se observó un consumo inicial rápido de aproximadamente 12 μM NADPH, seguido por un período de invariancia en la absorbancia. Considerando que los primeros 15 s de reacción no fueron registrados por cuestiones metodológicas (ver protocolo en *sección 3.6*) y que el valor de velocidad inicial, calculado a partir de la pendiente de la caída en la absorbancia en los primeros 15 s de medición, fue de 0.55 $\mu\text{M}/\text{s}$, se estima que la totalidad del H_2O_2 agregado fue consumido, razón por la que se alcanza un plateau en la absorbancia registrada. El agregado de otros 20 μM H_2O_2 provocó un nuevo decaimiento en la absorbancia del medio, con un perfil de consumo equivalente al registrado en los primeros 180 s, evidenciando que la enzima permanece activa posterior a la exposición al sustrato oxidante. El sistema Trx/TR es capaz de reducir el enlace disulfuro entre C_P y C_R que se forma durante la reacción de resolución y posterior a la oxidación de C_P a la forma sulfénico. Sin embargo, si hPrx3 sufre sobreoxidación, el sistema reductor empleado no es capaz de devolver a la enzima a su estado activo, impidiendo el consumo de nuevos equivalentes hidroperóxido. En el caso de la reacción con H_2O_2 , el segundo agregado de oxidante demostró que la enzima no perdió actividad, lo que es concordante con una constante de velocidad de sobreoxidación del orden de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (94) que determina que solo se detecte hPrx3 sobreoxidada en caso de exposición a altas concentraciones de H_2O_2 .

Perfiles de consumo de NADPH prácticamente equivalentes fueron registrados en caso de agregado de 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE (20 μM) (**Fig. 19**, —/—). Considerando que las constantes de velocidad de oxidación para hPrx3 por estos sustratos resultaron ser mayores a $3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, resultaría esperable que la enzima fuese capaz de consumir los AG-OOHs en forma rápida. Sin embargo, se registraron caídas lentas en la absorbancia, alcanzando valores prácticamente constantes sin haberse consumido la totalidad del AG-OOH agregado. Esto se explica por la rápida cinética de sobreoxidación de hPrx3 por estos oxidantes, con constantes de velocidad de sobreoxidación determinadas en este trabajo en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que llevarían a una rápida inactivación de la enzima por sobreoxidación. Efectivamente, la posterior adición de H_2O_2 no disparó el consumo de NADPH, permaneciendo la absorbancia prácticamente invariable, lo que revela la inactividad de la hPrx3 como consecuencia de su exposición a estos AG-OOHs.

Por otra parte, la incubación de hPrx3 con PGG_2 (**Fig. 19**, —) indujo un primer decaimiento lento en la absorbancia, seguido por un consumo modesto de NADPH luego de agregado el H_2O_2 , indicio de inactivación parcial de la enzima por exposición al AG-OOH. Esto es consistente con una constante de velocidad de sobreoxidación de hPrx3

por PGG₂ intermedia respecto a las constantes determinadas para la reacción con H₂O₂, 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE.

En cuanto a la reacción con FE-15(S)-HpETE (**Fig. 19, —**), no se registró consumo de NADPH y la posterior adición de H₂O₂ indujo caída en la absorbancia, evidenciando que la enzima se encontraba activa. Este hallazgo está en discrepancia con las cinéticas de oxidación y sobreoxidación determinadas por cambio de fluorescencia, siendo que se definió una constante de velocidad del orden de 10⁷ M⁻¹s⁻¹ para la primera reacción, mientras que la segunda reacción no fue detectada. En este sentido, se esperaría un consumo de NADPH similar al observado para la reacción con H₂O₂. Adicionalmente, la actividad enzimática detectada al agregar H₂O₂ posterior al agregado de FE-15(S)-HpETE no tiene las mismas características que la registrada cuando la enzima se trata únicamente con H₂O₂ sin exposición previa a dicho AG-OOH. Por lo tanto, si bien el fosfolípido parece no estar reaccionando con hPrx3 en las condiciones del ensayo, de algún modo modifica la actividad de alguno de los componentes del sistema.

Esto lleva a hipotetizar la posibilidad de que FE-15(S)-HpETE no sea efectivamente reducido por hPrx3 y el cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína observado en la *sección 4.3* se deba a un fenómeno de unión entre el fosfolípido y la enzima, alterando la actividad enzimática de esta última. Sin embargo, la incubación de hPrx3 con un fosfolípido que se encuentra esterificado por ácidos grasos no oxidados (FE) no provocó variación en la fluorescencia intrínseca de la enzima (véase *Fig. 18, C*), por lo que dicho cambio debe estar directamente relacionado con el desarrollo de reacción. Por otra parte, deben considerarse las diferencias en la concentración de FE-15(S)-HpETE empleada en cada uno de los ensayos, siendo que las determinaciones cinéticas fueron realizadas utilizando concentraciones de entre 1.5 y 3.75 μM, mientras que en el ensayo acoplado se adicionó 20 μM fosfolípido. Si bien se desconoce la CMC de FE-15(S)-HpETE, es posible que la concentración de fosfolípido utilizada para evaluar la actividad enzimática haya superado la CMC, disminuyendo la disponibilidad de sustrato en solución para reaccionar con hPrx3. De todos modos, la inactividad de hPrx3 en presencia de FE-15(S)-HpETE no puede explicarse únicamente a la luz de estos supuestos, siendo necesario evaluar resultados adicionales.

4. 5. Evaluación de la oxidación y sobreoxidación de hPrx3 tratada con distintos AG-OOHs por SDS-PAGE y western blot

Considerando que el desarrollo de las reacciones de oxidación y sobreoxidación repercute en la estructura cuaternaria de la hPrx3, fue posible analizar el estado redox de la enzima posterior a su incubación con distintos hidroperóxidos por separación de las formas monoméricas y diméricas covalentes por electroforesis desnaturante. Bajo condiciones

no reductoras, hPrx3 sin tratar se separó en dos bandas, una mayoritaria con un peso molecular menor a 25 kDa y otra minoritaria con un peso molecular algo mayor a 40 kDa (**Fig. 20, carril 1**). El peso de la banda mayoritaria es consistente con el peso molecular del monómero de hPrx3 recombinante, con un valor de 21797 Da, determinado a partir de su secuencia aminoacídica y confirmado por nuestro grupo de investigación mediante espectrometría de masas. En este sentido, la banda minoritaria observada correspondería a la enzima en su forma dimérica, dada por la formación de enlace disulfuro entre C_P y C_R como resolución de la oxidación de C_P a ácido cisteín sulfénico. Si bien hPrx3 fue reducida previo a la realización del ensayo, una porción minoritaria de la misma se encuentra como dímero, exhibiendo la presencia de peróxido adventicio en el medio capaz de provocar la oxidación de la enzima, lo que ha sido previamente reportado por Peskin et al. 2007 (113). Cuando la misma muestra fue corrida en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro, β-ME, la totalidad de la enzima corrió como una única banda de 22 kDa (**Fig. 20, carril 2**). Por lo tanto, la banda de mayor peso molecular detectada en el carril 1 corresponde efectivamente a un homodímero, cuyo enlace disulfuro intersubunidades es reversible por β-ME.

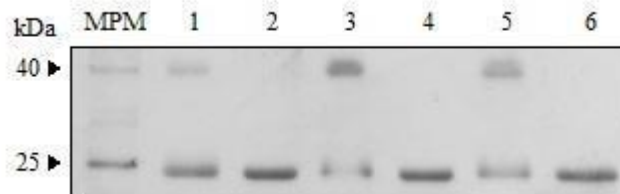


Figura 20. Oxidación de hPrx3 y evaluación de la reversibilidad del dímero por β-mercaptoetanol. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de hPrx3 reducida (5 µM) sin tratar (Carriles 1 y 2) e incubada con H₂O₂ (500 µM) (Carriles 3 y 4) y 15(S)-HpETE (10 µM) (Carriles 5 y 6). Las muestras sembradas en los carriles 2, 4 y 6 fueron tratadas adicionalmente con β-mercaptoetanol.

Para las muestras de hPrx3 tratada con H₂O₂ (500 µM) y 15(S)-HpETE (10 µM), se detectó un aumento en la porción de enzima dimérica respecto de lo observado para hPrx3 sin tratar (**Fig. 20, carriles 3 y 5**). A su vez, en ambos casos, el dímero de hPrx3 es reversible por exposición a β-ME (**Fig. 20, carriles 4 y 6**), lo que evidencia que la presencia de enzima en forma dimérica en los carriles 3 y 5 se debe al desarrollo de la reacción de oxidación y posterior resolución por formación de enlace disulfuro. Es de destacar que a las concentraciones de oxidante empleadas se detectó hPrx3 monomérica. Sin embargo, el estado de oxidación de dicha enzima no puede confirmarse por este ensayo, siendo que la hPrx3 monomérica puede encontrarse tanto reducida como sobreoxidada.

Para obtener información adicional, la enzima reducida (5 µM) fue tratada con concentraciones variables de H₂O₂, 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE y sometida a

electroforesis desnaturizante en condiciones no reductoras y análisis por western blot, empleando anticuerpo primario anti-Prx $\text{SO}_2^-/\text{SO}_3^-$. Cuando hPrx3 se mezcla con H_2O_2 en una proporción 1:1, toda la enzima se detectó como dímero (**Fig. 21, A**), consistente con la cinética de oxidación rápida ya reportada para la reacción entre hPrx3 y H_2O_2 .

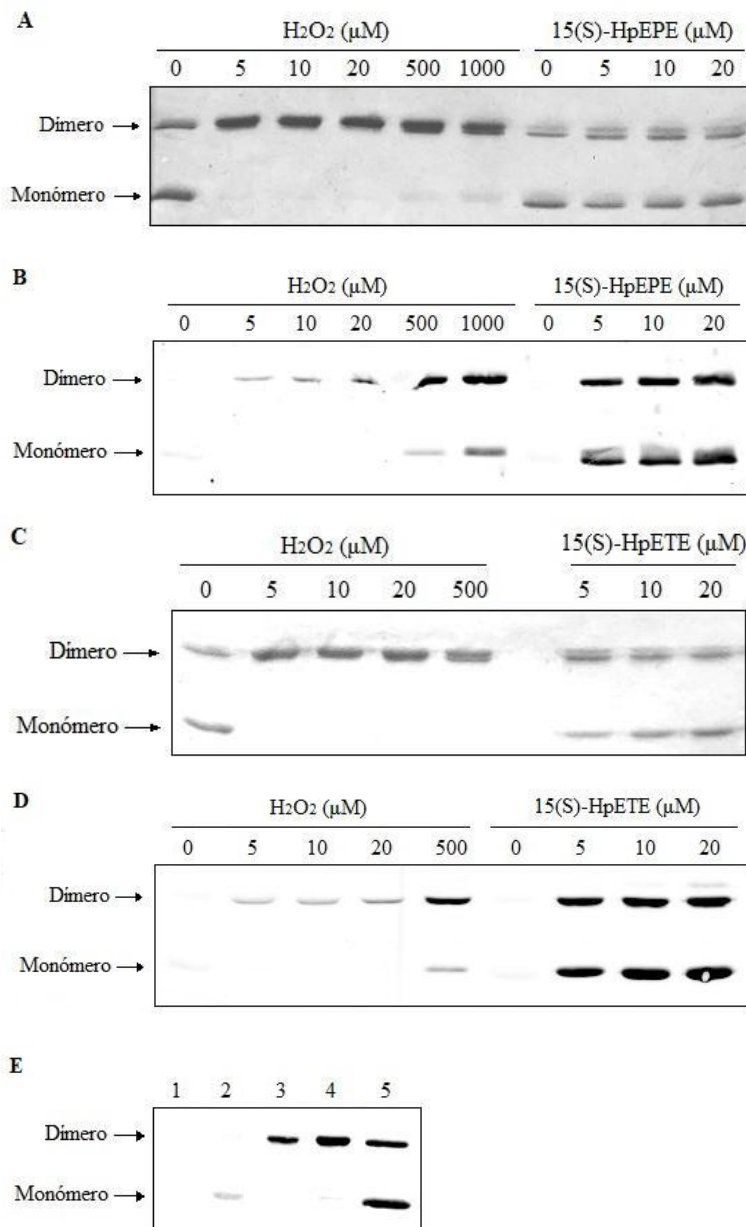


Figura 21. Oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por H_2O_2 y distintos AG-OOHs. Se trató Prx3 (5 μM) con concentraciones crecientes de H_2O_2 (5-500/1000 μM), 15(S)-HpEPE (5-20 μM) y 15(S)-HpETE (5-20 μM). Cada mezcla de reacción fue corrida en un gel de 15% poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y no reductoras (**A**), (**C**). Los resultados de las electroforesis fueron analizados por western blot, empleando anticuerpos anti-Prx $\text{SO}_2^-/\text{SO}_3^-$ (**B**), (**D**). Igual análisis por western blot fue realizado para Prx3 reducida (20 μM) sin tratar (Carril 2) y tratada con H_2O_2 (Carril 3) y PGG_2 (Carril 4) (50 μM). Se agregó un control negativo con BSA (Carril 1) y un control positivo con Prx3 tratada con 15(S)-HpEPE (Carril 5) (**E**).

Al aumentar la concentración de H_2O_2 aparece una porción minoritaria de enzima monomérica. El análisis por western blot (**Fig. 21, B**) arrojó que dicha porción de hPrx3 se encuentra sobreoxidada, siendo que fue reconocida por el anticuerpo empleado. En este sentido, monómeros de hPrx3 sobreoxidados sólo son detectados cuando la enzima es expuesta a altas concentraciones de H_2O_2 . Asimismo, el aumento en la concentración de

oxidante provocó un incremento en la porción de hPrx3 dimérica sobreoxidada. El dímero de hPrx3 está formado por dos subunidades, cada una con su C_P y C_R, capaces de formar enlace disulfuro con C_R y C_P, respectivamente, de la subunidad adyacente. Por lo tanto, la enzima en su forma dimérica podrá presentar dos enlaces disulfuro o uno, en caso de que una de las C_P haya sido sobreoxidada, lo que explica la detección de grupos -SO₂⁻/SO₃⁻ sobre hPrx3 dimérica.

A diferencia de lo que se observó para la reacción con H₂O₂, cuando hPrx3 se trató con 15(S)-HpEPE o 15(S)-HpETE en una proporción 1:1 y fue sometida a SDS-PAGE no reductora, la enzima se detectó como dímero y como monómero, destacando la separación de la banda de mayor peso molecular en dos bandas contiguas que corresponden a la enzima en forma dimérica con uno o dos enlaces disulfuro intercatenarios (**Fig. 21, A y C**). El análisis por western blot de dichas muestras revelan que no fue siquiera necesario incubar a la enzima con exceso de oxidante para detectar alto grado de sobreoxidación (**Fig. 21, B y D**). Si bien esto concuerda con una cinética de sobreoxidación rápida, para una reacción, cuya constante de velocidad es del orden de 10⁷ M⁻¹s⁻¹ a pH 7.8 y 12 °C, que compite con una reacción de resolución de constante ~1.4 s⁻¹ en iguales condiciones de pH y temperatura, en caso de exceso de oxidante se esperaría que el grupo C_P-SOH de la enzima se encuentre con otro equivalente AG-OOH antes de que pueda darse el encuentro con C_R y desarrollarse la formación de enlace disulfuro. Sin embargo, para todas las concentraciones de oxidante empleadas, se detecta hPrx3 dimérica, tanto con uno como con dos enlaces disulfuro.

En el caso de PGG₂, la reacción con hPrx3 provocó un nivel de sobreoxidación algo superior al detectado para igual concentración de H₂O₂, con un leve aumento en la proporción de dímero y monómero sobreoxidado (**Fig. 21, E**), pero considerablemente inferior al observado para 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE. Este resultado es concordante con la constante de velocidad de sobreoxidación de hPrx3 por PGG₂ que resultó ser intermedia respecto a los oxidantes mencionados. Por otra parte, al igual que se procedió para las reacciones entre hPrx3 y 15(S)-HpEPE/15(S)-HpETE, se evaluó el estado redox de hPrx3 posterior a la incubación con distintas concentraciones de FE-15(S)-HpETE. La electroforesis desnaturalizante reveló que cuando la enzima fue tratada con el fosfolípido, en una proporción 1:1, nuevamente se encontró enzima en forma dimérica y monomérica (**Fig. 22, A**). Sin embargo, la proporción de dímero aumenta lentamente con la concentración, mientras que la de monómero disminuye. El resultado del western blot evidencia que el monómero de hPrx3 detectado por SDS-PAGE no se encuentra sobreoxidado, por lo que corresponde a enzima en estado reducido (**Fig. 22, B**).

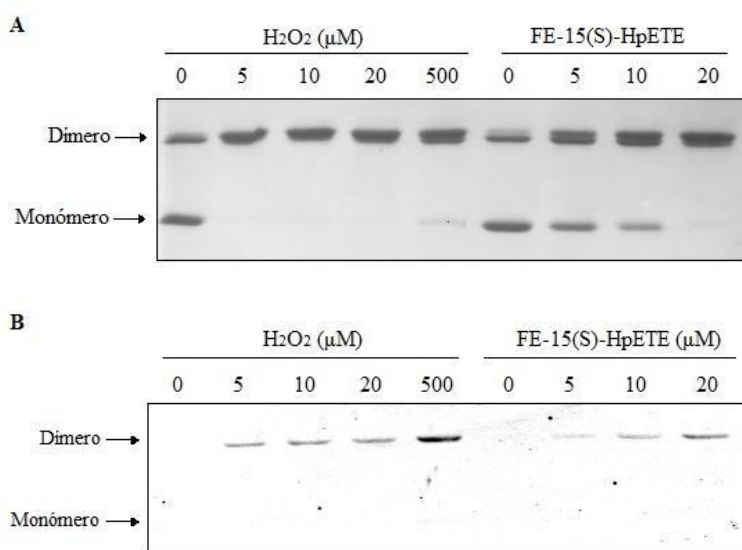


Figura 22. Oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por FE-15(S)-HpETE. Se trató Prx3 (5 μM) con concentraciones crecientes de H_2O_2 (5-500/1000 μM) y FE-15(S)-HpETE (5-20 μM). Cada mezcla de reacción fue corrida en un gel de 15% poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y no reductoras **(A)**. Los resultados de las electroforesis fueron analizados por western blot, empleando anticuerpos anti-Prx $\text{SO}_2^-/\text{SO}_3^-$ **(B)**.

La presencia de hPrx3 reducida en una mezcla de reacción con igual proporción de enzima y FE-15(S)-HpETE, que se consume lentamente con el agregado de concentraciones mayores de sustrato, revela una velocidad de reacción lenta que no concuerda con la constante de velocidad de oxidación determinada por cambio de fluorescencia, en un valor de $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, semejante a la constante determinada para la reacción H_2O_2 . En cambio, este resultado se ajusta mejor a lo observado en el ensayo acoplado que no permitió observar consumo de FE-15(S)-HpETE por hPrx3 durante un período de 3 minutos de incubación.

4. 6. Detección de sobreoxidación en hPrx3 por reacción con H_2O_2 , 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE mediante espectrometría de masa

El fenómeno de sobreoxidación de hPrx3 no solo puede ser detectado utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente formas sulfiniladas y sulfoniladas de Prx sino también por aumentos discretos en el peso molecular de la enzima detectables por espectrometría de masa. Considerando que se pretende relacionar incrementos de 32 o 48 Da en el peso molecular de la proteína, que significarían adición de dos o tres átomos de oxígeno a la C_p como consecuencia de la reacción con el oxidante, fue fundamental asegurarse que aquellos grupos tiol que permanecieran reducidos posterior a la incubación con el sustrato no se oxiden en forma artefactual durante el almacenamiento o a lo largo de su pasaje por el HPLC-Masa. En este sentido, luego de que hPrx3 reducida fuese incubada con los distintos hidroperóxidos, se realizó un tratamiento con exceso de IA, agente alquilante de grupos tioles libres, como modo de bloquear los tioles reducidos remanentes. La reacción entre IA y una cisteína libre tiene como producto la adición de

un sustituyente carbamidometil (CAM) al grupo tiol del residuo aminoacídico, lo que lleva a un aumento predecible en el peso molecular de 57 Da que debe ser tenido en cuenta a la hora de analizar los espectros de masa.

Cuando hPrx3 reducida sin tratar fue sometida a espectrometría de masa, la enzima fue detectada mayoritariamente en forma monomérica, aunque el dímero de hPrx3 también fue detectado, al igual que se observó por SDS-PAGE no reductora (*sección 4.5*). El espectro correspondiente a la hPrx3 monomérica mostró dos picos mayoritarios con un aumento en el peso molecular de 114 y 171 Da respecto del peso de la enzima sin modificaciones (21797 Da), consistente con el agregado de 2 y 3 grupos CAM, respectivamente (**Fig. 23, A**). Adicionalmente, se detectó un pico minoritario cuyo peso molecular revela la adición de 4 sustituyentes de este tipo. Es importante mencionar que si bien la secuencia aminoacídica de hPrx3 madura presenta solo 3 residuos de cisteína, ha sido demostrado que IA puede reaccionar con grupos amino de cadenas laterales de otros residuos y del extremo N-terminal (114), lo que explica la aparición de especies con más de 3 grupos CAM adicionados. Análogamente, el espectro para la hPrx3 dimérica mostró picos correspondientes a especies con un peso molecular aumentado en 114, 171 y 228 Da, que concuerda con la adición de 2, 3 y 4 grupos CAM a la enzima (**Tabla 1**). En ningún caso se detectaron picos cuyo peso asignado revelase la adición de átomos de oxígeno.

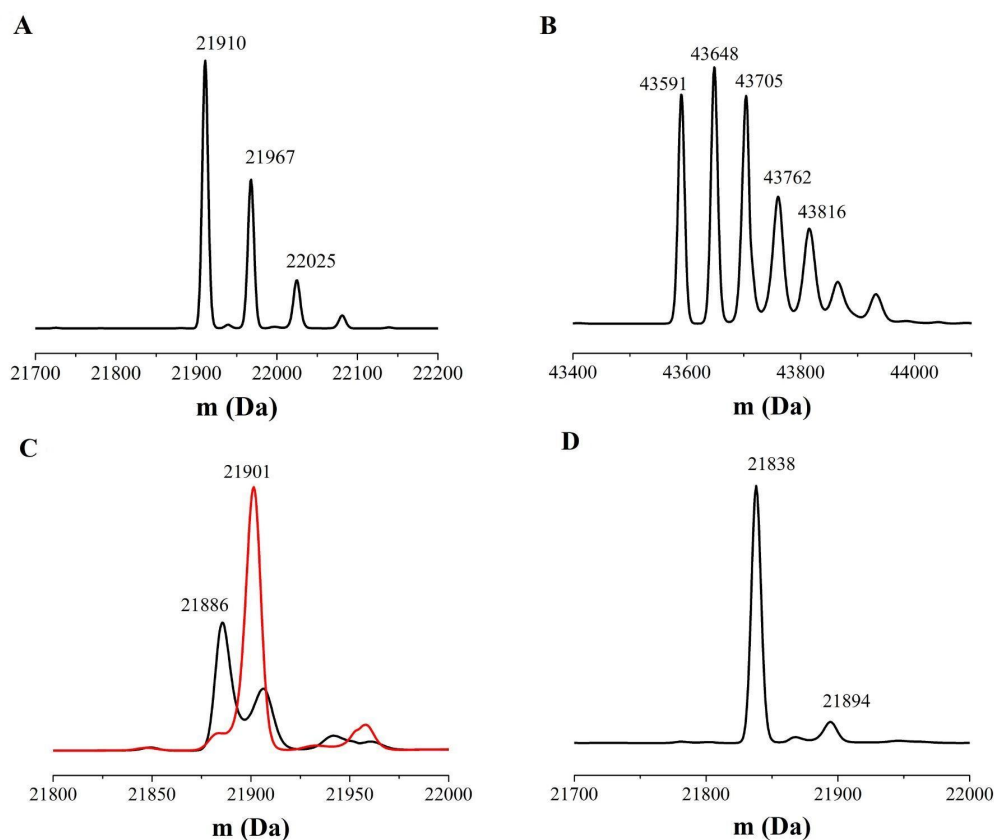


Figura 23. Análisis por espectrometría de masas de la oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE. hPrx3 reducida (10 μ M) fue incubada con buffer fosfato de sodio

(50 mM) y DTPA (0.1 mM), a pH 7.8 **(A)**, con H₂O₂ (20 μM) **(B)**, y con 15(S)-HpEPE (— 10 y — 20 μM). hPrx3 mutante en la cisteína peroxidática (Prx3C_pS) (10 μM) fue tratada con 15(S)-HpEPE (20 μM) **(D)**. Todas las muestras fueron incubadas con IA (5 mM) por 30 minutos y posteriormente, desaladas y sometidas a HPLC-Masa.

El espectro para la muestra de hPrx3 reducida tratada con H₂O₂ en una proporción 1:2 solo evidenció la presencia de enzima en forma dimérica (**Fig. 23, B**), coincidente con lo observado por SDS-PAGE no reductora (*sección 4.5*). En este caso, los picos mayoritarios presentaron pesos moleculares que pueden asignarse a dímero de hPrx3 sin modificar con un peso de 43591 Da, y otras dos especies con un incremento en su peso de 57 y 114 Da que se relaciona con la adición de 1 y 2 sustituyentes CAM. Por lo tanto, a las concentraciones empleadas, la enzima detectada se encuentra oxidada a la forma dimérica, mientras que no se detecta hPrx3 sobreoxidada.

Tabla 1. Asignación de picos en espectros de masa a especies moleculares. El peso molecular de la subunidad de hPrx3 y de Prx3C_pS es de 21797 y 21781 Da, respectivamente.

MUESTRA	PM (Da)	DESCRIPCIÓN
hPrx3 (10μM) (monómero mayoritario)	21910.7	hPrx3 (monómero) + 2CAM
	21967.6	hPrx3 (monómero) + 3CAM
	22024.5	hPrx3 (monómero) + 4CAM
	43707.9	hPrx3 (dímero) + 2CAM
	43766.5	hPrx3 (dímero) + 3CAM
	43824.0	hPrx3 (dímero) + 4CAM
hPrx3 (10 μM) + H₂O₂ (20 μM) (solo dímero detectado)	43591.1	hPrx3 (dímero)
	43648.8	hPrx3 (dímero) + CAM
	43705.1	hPrx3 (dímero) + 2CAM
	43761.7	hPrx3 (dímero) + 3CAM
hPrx3 (10 μM) + 15(S)-HpEPE (10 μM) (monómero mayoritario)	21886.2	hPrx3 (monómero) + CAM + 32 (SO ₂ ⁻)
	43593.8	hPrx3 (dímero)
	43696.3	hPrx3 (dímero) + CAM + 48 (SO ₃ ⁻)
hPrx3 (10 μM) + 15(S)-HpEPE (20 μM) (monómero mayoritario)	21901.1	hPrx3 (monómero) + CAM + 48 (SO ₃ ⁻)
	43700.1	hPrx3 (dímero) + CAM + 48 (SO ₃ ⁻)
hPrx3C_pS (10 μM) + 15(S)-HpEPE (20 μM)	21838.1	Prx3C _p S (monómero) + CAM
	21894.2	Prx3C _p S (monómero) + 2CAM

Cuando hPrx3 reducida (10 μM) fue incubada con 15(S)-HpEPE en igual concentración, se detectó mayoritariamente enzima en forma monomérica con un peso molecular aumentado en 89 Da (**Fig. 23, C —**). Dicho incremento es equivalente a la adición de un grupo CAM y dos átomos de oxígeno, con un peso de 57 y 32 Da, respectivamente, lo que

da un indicio de posible sobreoxidación de C_p -SH a C_p -SO₂H. Asimismo, el dímero de hPrx3 fue detectado tanto sin modificar como con un incremento en su peso de 104 Da, lo que correspondería a una especie a la que se adicionó un sustituyente CAM y tres átomos de oxígeno. En este sentido, se estaría evidenciando la sobreoxidación del tiol peroxidático a la forma sulfonylada. Al duplicar la concentración de 15(S)-HpEPE a la que se expuso la enzima, las especies mayoritarias detectadas, tanto monomérica como dimérica, presentaron un aumento en su peso correspondiente al agregado de un grupo CAM y tres átomos de oxígeno (**Fig. 23, C — / Tabla 1**). Por lo tanto, por este método pudo detectarse hPrx3 sobreoxidada por 15(S)-HpEPE, incluso cuando la enzima fue tratada con oxidante en una proporción de 1:1, al igual que se detectó por western blot.

Para hPrx3 reducida (10 μ M) tratada con 15(S)-HpETE (10 y 20 μ M) se detectaron productos similares a los observados para las muestras incubadas con 15(S)-HpEPE, con un incremento en su peso asignable a la adición de 1 o 2 grupos CAM y dos átomos de oxígeno, en el caso de incubación con la menor concentración de oxidante, o tres átomos de oxígeno, para la enzima tratada con la mayor concentración de AG-OOH (*no se muestra*). Si bien se detectan especies con un incremento discreto en el peso concordante con la adición de dos o tres átomos de oxígeno, tanto para la enzima tratada con 15(S)-HpEPE como 15(S)-HpETE, no es posible asegurar solo en base a estos resultados que la adición de estos átomos haya ocurrido efectivamente a nivel de C_p , existiendo la posibilidad de que haya ocurrido oxidación no específica de otros residuos aminoacídicos.

En este sentido, se realizó un control incubando Prx3C_pS (10 μ M) con 15(S)-HpEPE (20 μ M) y se sometió la muestra al mismo protocolo que las anteriores, permitiendo detectar un producto mayoritario con un peso correspondiente a 21838 Da (**Fig. 23, D**), con un aumento de 57 Da respecto de la enzima sin modificar (21781 Da). Por lo tanto, la enzima detectada se encuentra en forma monomérica, lo que resulta esperable por la ausencia de C_p capaz de formar enlace disulfuro con C_R , y presenta una modificación responsable del incremento en masa que corresponde a la adición de un sustituyente CAM. Esto evidencia que en ausencia de C_p no se registra un aumento en el peso que se corresponda con la adición de átomos de oxígeno. En consecuencia, se deduce que efectivamente incrementos de 32 y 48 Da en el peso de hPrx3 tratada con 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE son resultado de la sobreoxidación de C_p -SH a C_p -SO₂H y C_p -SO₃H.

5. Discusión

Los resultados obtenidos sugieren que hPrx3 es capaz de reducir AG-OOHs libres en forma rápida. Adicionalmente, estos sustratos conducen a la inactivación de la enzima por sobreoxidación de la C_p. En primer lugar, la cuantificación por ensayo de FOX de AG-OOHs en solución en presencia y ausencia de hPrx3, permitió evidenciar consumo de estos hidroperóxidos e inferir que la enzima efectivamente presenta actividad reductora de AG-OOHs libres. Adicionalmente, el ensayo arrojó estequiometrías de consumo dispares para los oxidantes empleados, siendo esta de 1:1 y 1.7:1 en caso de reacción con PGG₂ y 15(S)-HpEPE, respectivamente. El consumo de PGG₂ por hPrx3 fue discretamente mayor al observado para H₂O₂ (0.8:1), mientras que la estequiometría de consumo de 15(S)-HpEPE por hPrx3 dió un primer indicio de desarrollo de sobreoxidación por reacción con una especie oxidada derivada de EPA.

Bajo condiciones catalíticas, se registró un consumo lento de 15(S)-HpEPE en comparación al de H₂O₂, concordante con una actividad enzimática escasa, que fue confirmada por el posterior agregado de H₂O₂ al medio y la ausencia de consumo de NADPH. Un comportamiento equivalente fue registrado para la enzima en presencia de 15(S)-HpETE, mientras que hPrx3 tratada con PGG₂ demostró actividad reducida. Considerando que el sistema reductor Trx/TR es incapaz de reducir C_p-SO_{2/3}H a C_p-SH, la falta de actividad enzimática exhibida por hPrx3 luego de incubada con AG-OOHs libres evidencia nuevamente el fenómeno de sobreoxidación.

La sobreoxidación de hPrx3 fue confirmada por detección de formas sulfiniladas y sulfoniladas de la cisteína peroxidática de la enzima por western blot y espectrometría de masas. Cuando la enzima fue tratada con concentraciones equimolares de 15(S)-HpEPE o 15(S)-HpETE, se detectó tanto dímero como monómero de hPrx3 sobreoxidado por ambas técnicas. Por su parte, la espectrometría de masas permitió detectar aumentos en el peso molecular de la enzima consistentes con el agregado de tres átomos de oxígeno, cuando hPrx3 fue incubada con exceso de 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE. En cambio, el tratamiento de Prx3C_pS con igual concentración de 15(S)-HpEPE no exhibió dicho incremento en su peso, confirmando que el corrimiento en el peso de la enzima salvaje se debe específicamente a la sobreoxidación de C_p a C_p-SO₃H. La formación de ácido sulfónico en la C_p de hPrx3 ha sido reportada en trabajos previos tanto *in vitro* como *in vivo* (115).

La cinética entre hPrx3 y AG-OOHs libres fue caracterizada a partir de cambios en la fluorescencia intrínseca que experimenta la enzima durante las reacciones de oxidación, reducción y sobreoxidación. Mediante este método se determinaron constantes de velocidad de oxidación del orden de 10⁷ M⁻¹s⁻¹ para los tres AG-OOHs libres evaluados, evidenciando una cinética rápida comparable a la de las reacciones con H₂O₂ y

peroxinitrito. En cambio, las constantes de velocidad de las reacciones de sobreoxidación varían en función de la estructura molecular de los AG-OOHs, con valores de $(2.6 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(1.7 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $(3.1 \pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para 15(S)-HpEPE, 15(S)-HpETE y PGG₂, respectivamente. Estas constantes son 4 y 2 órdenes de magnitud mayores, respectivamente, que la constante determinada para la reacción de sobreoxidación por H₂O₂ (**Tabla 2**). Siendo que hPrx3 es considerada resistente a la sobreoxidación por H₂O₂ en comparación a las isoformas citosólicas de Prx humana (88), siendo necesaria la exposición a altas concentraciones de H₂O₂ para evidenciar sobreoxidación por western blot, los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían explicar al menos parcialmente el hallazgo de hPrx3 sobreoxidada *in vivo*, en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (115–117), gracias a la cinética rápida de sobreoxidación de la enzima por exposición a AG-OOHs.

Tabla 2. Constantes de velocidad de oxidación y sobreoxidación de hPrx3 para distintos hidroperóxidos.

Hidroperóxido	$k_{\text{oxidación}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{sobreoxidación}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	Referencias
H ₂ O ₂	2.0×10^7 ⁽¹⁾	6×10^3 ⁽¹⁾ ; 1.1×10^3 ⁽²⁾	(56, 94, 118)
Peroxinitrito	1.0×10^7 ⁽³⁾	No determinada	(94)
15(S)-HpEPE	$> 3.5 \times 10^7$ ⁽⁴⁾	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^7$ ⁽⁴⁾	Este trabajo
15(S)-HpETE	$> 3.5 \times 10^7$ ⁽⁴⁾	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^7$ ⁽⁴⁾	Este trabajo
PGG ₂	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^7$ ⁽⁴⁾	$(3.1 \pm 0.7) \times 10^5$ ⁽⁴⁾	Este trabajo

(1) pH 7.4, 25 °C; (2) pH 7.8, 14 °C; (3) pH 7.8, 25 °C; (4) pH 7.8, 11-12 °C.

Constantes de velocidad de sobreoxidación de hPrx3 por 15(S)-HpEPE y 15(S)-HpETE en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ implicarían que, en las condiciones en las que se realizaron los ensayos de espectrometría de masa y western blot, prácticamente la totalidad de la enzima fuese encontrada como monómero sobreoxidado, dado que la reacción de resolución con una constante de $\sim 1.4 \text{ s}^{-1}$ no es competencia frente a la reacción de sobreoxidación con una constante observada de $\sim 400 \text{ s}^{-1}$, para una concentración de oxidante de 20 μM . Sin embargo, ambas técnicas mencionadas detectaron dímero sobreoxidado, el cual presenta una de sus C_p en la forma C_p-SO_{2/3}H, mientras que la otra C_p formó un puente disulfuro con C_R. Esto evidencia que la cinética determinada no es representativa de lo que ocurre en todos los sitios activos de la enzima, demostrando asimetrías entre la reactividad de los mismos. Este mismo comportamiento fue registrado por Poynton et al. (2016) para la reacción entre hPrx3 (5 μM) y H₂O₂ (1-20 mM), donde incluso a las concentraciones mayores de oxidante la especie sobreoxidada mayoritaria resultó ser dímero sobreoxidado y no monómero, sugiriendo nuevamente diferencias entre la reactividad de distintos sitios activos (119). Esto es concordante también con

reportes previos de cooperatividad para otras Prxs de la misma subfamilia, incluyendo TXNPrx de *Trypanosoma brucei brucei*, para la cual fue reportado que luego de desarrollada la oxidación de uno de sus sitios activos, otras subunidades presentaron una menor reactividad frente a hidroperóxidos como consecuencia de cambios conformacionales (120).

Además de la cooperatividad intra y/o inter-dímero, existen otras particularidades que hPrx3 compartiría con otros miembros de la familia de las Prxs. La capacidad de la hPrx3 para reducir AG-OOHs libres fue en principio hipotetizada a partir del conocimiento de otras Prx con actividad reductora de AG-OOHs, incluyendo AhpE, PrxQ B y Prx2, habiéndose detectado un parche hidrofóbico en la superficie de AhpE capaz de interactuar con la cadena alifática de este tipo de sustratos. En esta línea, trabajos realizados por el Dr. Ari Zeida, integrante de nuestro grupo de investigación, simularon la unión de 15(S)-HpETE a hPrx3 por docking molecular, revelando la presencia de un parche hidrofóbico próximo al sitio activo con el que podría interactuar el AG-OOH, incluso posicionándose de forma tal que orienta el grupo peroxilo hacia C_p-S^- (**Fig. 24**). En este sentido, las características estructurales de la enzima y su capacidad de interacción con sustratos de tipo lipídico van en línea con la reactividad demostrada en este trabajo y constituyen un primer intento de elucidar las bases moleculares de la misma.

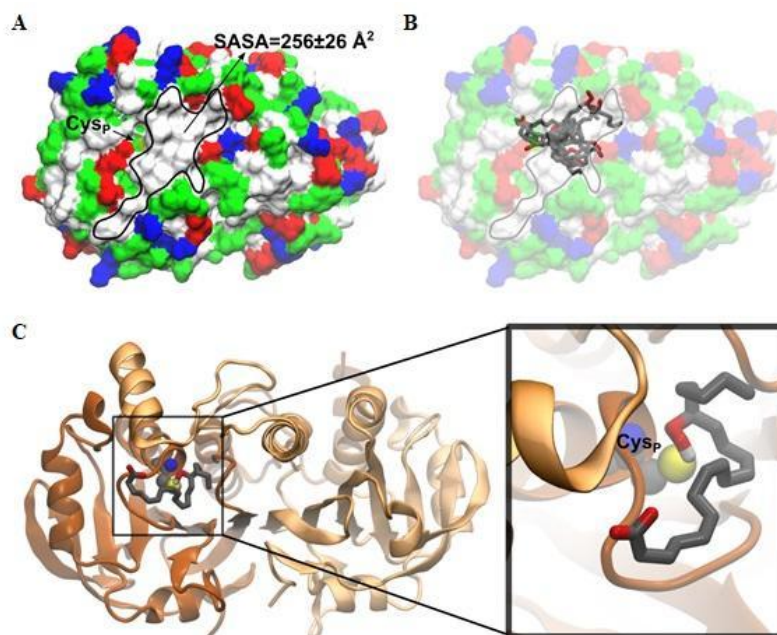


Figura 24. Simulación de la unión de 15(S)-HpETE a hPrx3 por docking molecular. (A) Representación de la superficie del dímero de hPrx3 con presencia de un parche hidrofóbico (delimitado en negro) próximo a C_p . (B) Superposición de estructuras de 15(S)-HpETE mejor rankeadas en energía sobre el dímero de hPrx3 obtenido por docking molecular. (C) Estructura

representativa del cluster más poblado del docking molecular de 15(S)-HpETE con el dímero de hPrx3. Imágenes cedidas por el Dr. Ari Zeida.

Debe tenerse en cuenta que hPrx3 no solo presenta alta reactividad con AG-OOHs libres sino que además se caracteriza por ser abundante a nivel de la matriz mitocondrial, con una concentración que varía en función del tipo celular, en el rango de 10 a 120 μM (94). Por lo tanto, hPrx3 sería un importante blanco de los AG-OOHs libres en este compartimiento subcelular. En la mitocondria, los AG-OOHs libres son formados endógenamente así como importados desde el citosol (25, 39), por lo que resulta fundamental la presencia de enzimas capaces de reducir estas especies para regular su participación en señalización redox y evitar aumentos en su concentración que induzcan estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

Otro posible blanco de los AG-OOHs es Prx5. Esta peroxidasa de amplia distribución celular está presente a nivel mitocondrial con una concentración reportada de 16 μM (121). Si bien no ha sido determinada la cinética de oxidación de Prx5 por AG-OOHs, la enzima reacciona rápidamente con hidroperóxidos orgánicos sintéticos como *tert*-butil hidroperóxido e hidroperóxido de cumeno (97). Si esta reactividad fuese extrapolable a los sustratos discutidos en el presente trabajo, y considerando su relativa abundancia a nivel mitocondrial, Prx5 también sería un importante reductor de AG-OOHs libres.

Otras enzimas con actividad peroxidasa frente a AG-OOHs son isoformas de la familia de glutatión peroxidadas. GPx1 es capaz de reducir H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos sintéticos en forma rápida, con constantes de velocidad en el orden de 10^6 y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (122). Asimismo, presenta una distribución ubicua, con localización citosólica, mitocondrial y, en algunos casos, peroxisomal (123). Sin embargo, se encuentra mayoritariamente a nivel citoplasmático, con un porcentaje de enzima a nivel mitocondrial de aproximadamente 10% (124). Su concentración reportada en hepatocitos es de 2 μM (95), por lo que estaría de 10 a 100 veces menos concentrada que Prx3 y Prx5 en mitocondria. Esto sugiere una contribución minoritaria de GPx1 a la reducción de AG-OOHs libres en este compartimiento, en comparación con Prx3 que sería un importante blanco de estos oxidantes mitocondriales (**Tabla 3**).

Tabla 3. Blancos mitocondriales de AG-OOHs libres no endoperóxido.

Blanco	k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) *	Concentración (μM)	k x Concentración (s^{-1})
Prx3	$> 3.5 \times 10^7$ ^(a)	10 - 120	$> 350 - > 4200$
Prx5	5.0×10^6 ^(b) / 8.5×10^7 ^(c)	16	80 / 1360
GPx1	4.2×10^6 ^(b)	< 2	< 8.4

*Constantes determinadas para la reacción con 15(S)-HpEPE/15(S)-HpETE (a), *tert*-butil hidroperóxido (b) e hidroperóxido de cumeno (c). La reactividad de Prx5 y GPx1 humana con AG-OOHs libres naturales no se encuentra reportada.

GPx4, otra glutatión peroxidasa dependiente de selenio, es reconocida por su particular actividad reductora de hidroperóxidos unidos a fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol. No solo reduce los AG-OOHs libres y unidos a lípidos más complejos sino que además puede ejercer esta actividad a nivel de membranas (125). En este sentido, es considerada un inhibidor de lipoperoxidación de membranas y ferroptosis, y resulta indispensable para la viabilidad de ratones, siendo letal el silenciamiento sistémico del gen de GPx4 en estos organismos (126). Esta enzima presenta tres isoformas, una citosólica, otra mitocondrial y una nuclear. Ratones knock-out para GPx4 mitocondrial son viables pero, debido a que esta isoforma está vinculada con la integridad estructural y funcional de espermatozoides, su silenciamiento causa infertilidad en machos (127, 128). En este sentido, la forma mitocondrial de GPx4 abunda en espermatozoides pero no así en la mayoría de los tipos celulares. Por lo tanto, a pesar de ser capaz de reducir AG-OOHs, no constituye un blanco preferencial para estos oxidantes en mitocondrias de células somáticas.

Sin embargo, ha sido reportado que la expresión de una forma mutada de GPx4 en fibroblastos embrionarios de ratón induce un aumento en la expresión de Prx3 (129), mientras que la sobreexpresión de Prx3 en ratones knockout-condicional de GPx4 en neuronas mitiga los síntomas de una forma leve de ferroptosis en motoneuronas de médula espinal (130). A la luz de estos hallazgos surge la hipótesis de que hPrx3 sea capaz de reducir AG-OOHs unidos a fosfolípidos, siendo así capaz de compensar al menos en parte la función de GPx4. Sin embargo, el presente trabajo no permite confirmar dicha premisa, habiendo discrepancias entre los resultados obtenidos por distintas técnicas.

La incubación de hPrx3 con un hidroperóxido de fosfolípido, FE-15(S)-HpETE, exhibió una fase de decaimiento rápido de la fluorescencia intrínseca, cuya k_{obs} mostró dependencia con la concentración de oxidante, evidenciando el desarrollo de la reacción de oxidación de la enzima y permitiendo determinar una constante de velocidad para dicha reacción de $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Adicionalmente, este método no permitió detectar el desarrollo de la reacción de sobreoxidación de hPrx3 por FE-15(S)-HpETE, siendo que la k_{obs} de la fase de recuperación de la fluorescencia no creció con el aumento en la concentración de hidroperóxido lipídico.

En cambio, bajo condiciones catalíticas, no se registró consumo de FE-15(S)-HpETE, confirmándose posteriormente que la enzima permaneció parcialmente activa luego de ser incubada con dicho sustrato. En este sentido, el hidroperóxido de fosfolípido empleado no funcionó como sustrato en ensayo de cinética de estado estacionario, imposibilitando detectar su consumo por hPrx3. Por otra parte, la distribución entre

formas diméricas y monoméricas de hPrx3 tratada con concentraciones crecientes de FE-15(S)-HpETE en una SDS-PAGE no reductora, permite inferir una cinética de oxidación lenta en comparación a la observada para H₂O₂. Si bien no se obtiene en forma cuantitativa una constante de velocidad de oxidación por este método, es claro que lo detectado no es concordante con una $k_{\text{oxidación}}$ igual a $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y ausencia de sobreoxidación, siendo que en tal caso se esperaría una distribución dímero-monómero semejante a la de hPrx3 tratada con H₂O₂.

Las características propias de cada método hacen necesario trabajar a concentraciones distintas de FE-15(S)-HpETE. La determinación cinética por cambio de fluorescencia permite trabajar en el rango de 1.5 y 3.75 μM , mientras que tanto el ensayo acoplado de actividad como la evaluación de oxidación y sobreoxidación por SDS-PAGE/western blot requieren el empleo de concentraciones mayores de oxidante. Esta diferencia en las concentraciones evaluadas podría explicar parcialmente las discrepancias encontradas, sin embargo, es necesario continuar explorando otras técnicas que permitan dar luz respecto a la reacción entre hPrx3 y AG-OOHs unidos a fosfolípidos.

Si bien no fue posible evaluar con claridad la actividad reductora de hidroperóxidos de fosfolípidos, la caracterización en detalle de la capacidad de hPrx3 para reducir AG-OOHs libres resulta relevante no solo por confirmar a la enzima como un importante blanco de estos sustratos sino también por aportar conocimiento que pueda contribuir a un mejor entendimiento del intrincado fenómeno de señalización redox. En forma general, se ha propuesto que las Prxs funcionan como compuertas o “floodgates”, que previenen la oxidación de blancos moleculares por hidroperóxidos, hasta que se abren como consecuencia de la inactivación por sobreoxidación u otras modificaciones postraduccionales, para así permitir la oxidación de dichos blancos y desencadenar vías de señalización intracelulares (69). En el caso de hPrx3, si bien exhibe una rápida cinética de oxidación por H₂O₂, la sobreoxidación por este oxidante es lenta, por lo que existen ciertas limitaciones cinéticas para el desarrollo de señalización por este modelo. En este sentido, la menor resistencia a la sobreoxidación de hPrx3 por AG-OOHs aquí determinada podría contribuir a este fenómeno, inactivando rápidamente a la enzima y permitiendo la oxidación de otros blancos implicados en señalización por fosforilación, control transcripcional, etc.

Alternativamente, otro modelo de señalización redox propone a las Prxs como sensores de hidroperóxidos que luego de oxidados traspasan dicha señal por oxidación específica de blancos moleculares secundarios. La transferencia de señal desde la Prx involucraría la reacción de C_p-SOH o C_p-S-S-C_R con un tiol de la proteína blanco para formar un enlace disulfuro transitorio (66). hPrx3 podría también contribuir a la señalización por este modelo funcionando como sensor de AG-OOHs libres, gracias a su alta reactividad y abundancia en el compartimento mitocondrial. Asimismo, la reacción de hPrx3 con estos

oxidantes da como producto una variedad de especies oxidadas, como consecuencia de la asimetría en la reactividad de los distintos sitios activos de la enzima. Esta particularidad podría ser aprovechada para la transferencia de señales específicas, siendo que distintas especies de hPrx3 oxidada podrían interactuar en forma específica con distintos blancos moleculares, desencadenando vías de señalización diferenciales.

6. Conclusiones

Este trabajo logró identificar actividad peroxidasa para hPrx3 frente a AG-OOHs libres y caracterizarla por múltiples metodologías. La enzima fue capaz de catalizar la reducción de estos sustratos *in vitro*, oxidándose y sobreoxidándose en forma rápida. Aprovechando el cambio en la fluorescencia intrínseca experimentado por la enzima durante las reacciones de oxidación, reducción y sobreoxidación, se determinaron constantes de velocidad de oxidación del orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para los tres AG-OOHs libres evaluados, mientras que las constantes de velocidad de sobreoxidación presentaron valores diferenciales en función de la estructura molecular de los AG-OOHs, siendo de $(2.6 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(1.7 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $(3.1 \pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción con 15(S)-HpEPE, 15(S)-HpETE y PGG₂, respectivamente. Por lo tanto, la enzima reducida presenta una alta reactividad para estos AG-OOHs libres, comparable a la reactividad presentada para H₂O₂ y peroxinitrito. En cambio, la cinética de sobreoxidación es considerablemente más rápida para AG-OOHs libres que para H₂O₂.

Un estudio más exhaustivo de la sobreoxidación de hPrx3 por AG-OOHs libres fue logrado empleando metodologías de ensayo acoplado, espectrometría de masas y western blot. Se detectó hPrx3 sobreoxidada tanto por 15(S)-HpEPE como por 15(S)-HpETE, incluso cuando la enzima fue tratada con oxidante en una proporción de 1:1. Si bien estos resultados son consistentes con una rápida sobreoxidación de Prx3 por AG-OOHs libres, tanto por espectrometría de masa como por SDS-PAGE no reductora se detectó dímero sobreoxidado, especie que no se esperaría encontrar en alta proporción para una reacción con constante de velocidad en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ que, a la concentración de hidroperóxidos utilizada, compite con una reacción de resolución con constante de $\sim 1.4 \text{ s}^{-1}$. Esta discrepancia es interpretada en base a las asimetrías entre los sitios activos de la enzima dodecamérica, previamente reportado para otros miembros de la familia de las Prxs.

Por otra parte, el trabajo presentó limitaciones para evaluar la capacidad de hPrx3 para reducir AG-OOHs unidos a fosfolípidos. Mientras que la fluorimetría de flujo detenido determinó una cinética de oxidación rápida, con una constante de velocidad en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, no se registró consumo de FE-15(S)-HpETE en ensayo acoplado, impidiendo evidenciar actividad reductora de este sustrato bajo condiciones catalíticas. Paralelamente, en función de la distribución de la enzima entre formas diméricas y monoméricas en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no reductoras, y mediante análisis por western blot, se registró leve oxidación y sobreoxidación de hPrx3 por FE-15(S)-HpETE. En este sentido, es necesario continuar el estudio de la reactividad de hPrx3 con estos hidroperóxidos lipídicos complejos, recurriendo a técnicas alternativas que permitan dirimir las discrepancias encontradas.

Hasta el momento, solo se había descrito reactividad de hPrx3 con H₂O₂ y peroxinitrito, por lo que la identificación y caracterización de actividad reductora de AG-OOHs libres amplía el conocimiento acerca de esta enzima y su funcionalidad. De acuerdo con su abundancia a nivel de la matriz mitocondrial y las cinéticas rápidas de oxidación y sobreoxidación por AG-OOHs libres demostradas en el presente trabajo, hPrx3 representaría un importante blanco de AG-OOHs libres *in vivo*, lo que puede tener implicancias interesantes de explorar en la participación de la enzima en procesos de señalización redox.

Parte de los resultados aquí presentados fueron publicados en la revista *Antioxidants* (131)

7. Bibliografia

1. Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th Ed., W. H. Freeman, New York
2. Venditti, P., Di Stefano, L., and Di Meo, S. (2013) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. **13**, 71–82
3. Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. **148**, 1145–1159
4. Waypa, G. B., Smith, K. A., and Schumacker, P. T. (2016) O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. *Mol. Aspects Med.* **47–48**, 76–89
5. Bender, T., and Martinou, J.-C. (2013) Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**
6. Chen, Y., Azad, M. B., and Gibson, S. B. (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 1040–1052
7. Maryanovich, M., and Gross, A. (2013) A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* **23**, 129–134
8. Gurung, P., Lukens, J. R., and Kanneganti, T.-D. (2015) Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol. Med.* **21**, 193–201
9. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., and Malik, A. B. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1126–1167
10. Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., and Yu, Z. (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International journal of molecular medicine.* **44**, 3–15
11. Wei, Y.-H., and Lee, H.-C. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med.* **227**, 671–682
12. Lambert, A. J., and Brand, M. D. (2009) Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol. Biol.* **554**, 165–181
13. Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 639–645
14. Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* **552**, 335–344
15. Jezek, P., and Hlavatá, L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2478–2503
16. Brand, M. D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**, 466–472

17. Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., and Brand, M. D. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* **1**, 304–312
18. Kao, M. P. C., Ang, D. S. C., Pall, A., and Struthers, A. D. (2010) Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J. Hum. Hypertens.* **24**, 1–8
19. Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., and Beal, M. F. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci.* **24**, 7779–7788
20. Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Rubbo, H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite. in *Nitric oxide*, pp. 57–82, Elsevier
21. Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J. M., Romero, N., Castro, L., Thomson, L., and Radi, R. (2010) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration. in *Nitric Oxide*, pp. 61–102, Elsevier
22. Spiteller, G. (2002) Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 30–44
23. Colbeau, A., Nachbaur, J., and Vignais, P. M. (1971) Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **249**, 462–492
24. Angelova, P. R., Esteras, N., and Abramov, A. Y. (2021) Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med. Res. Rev.* **41**, 770–784
25. Pallast, S., Arai, K., Wang, X., Lo, E. H., and van Leyen, K. (2009) 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J. Neurochem.* **111**, 882–889
26. Hajeyah, A. A., Griffiths, W. J., Wang, Y., Finch, A. J., and O'Donnell, V. B. (2020) The biosynthesis of enzymatically oxidized lipids. *Front Endocrinol.* **11**, 591819
27. Andreani, M., Olivier, J., and Béréziat, G. (2004) Control of Eicosanoid Production by Cellular and Secreted Phospholipase A2. *The Eicosanoids*
28. Smith, W. L., and Murphy, R. C. (2002) Chapter 13 The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th edition*, pp. 341–371, New Comprehensive Biochemistry, Elsevier, **36**, 341–371
29. Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A. (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 986–1000
30. Liou, J.-Y., Aleksic, N., Chen, S.-F., Han, T.-J., Shyue, S.-K., and Wu, K. K. (2005) Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp. Cell Res.* **306**, 75–84
31. Mayes, P. A., and Botham, K. M. (2003) Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids. *Harper's Illustrated Biochemistry, 26th Ed. (Lange Medical Books, New York)*

32. Kühn, H. (1996) Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog. Lipid Res.* **35**, 203–226
33. Choudhary, R., Kumar, M., and Katyal, A. (2022) 12/15-Lipoxygenase debilitates mitochondrial health in intermittent hypobaric hypoxia induced neuronal damage: An in vivo study. *Redox Biol.* **49**, 102228
34. Morgan, A. H., Dioszeghy, V., Maskrey, B. H., Thomas, C. P., Clark, S. R., Mathie, S. A., Lloyd, C. M., Kühn, H., Topley, N., Coles, B. C., Taylor, P. R., Jones, S. A., and O'Donnell, V. B. (2009) Phosphatidylethanolamine-esterified eicosanoids in the mouse: tissue localization and inflammation-dependent formation in Th-2 disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 21185–21191
35. Maskrey, B. H., Bermúdez-Fajardo, A., Morgan, A. H., Stewart-Jones, E., Dioszeghy, V., Taylor, G. W., Baker, P. R. S., Coles, B., Coffey, M. J., Kühn, H., and O'Donnell, V. B. (2009) Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry.* **284**, 25460
36. O'Donnell, V. B., Aldrovandi, M., Murphy, R. C., and Krönke, G. (2019) Enzymatically oxidized phospholipids assume center stage as essential regulators of innate immunity and cell death. *Sci. Signal*
37. Clark, S. R., Guy, C. J., Scurr, M. J., Taylor, P. R., Kift-Morgan, A. P., Hammond, V. J., Thomas, C. P., Coles, B., Roberts, G. W., Eberl, M., Jones, S. A., Topley, N., Kotecha, S., and O'Donnell, V. B. (2011) Esterified eicosanoids are acutely generated by 5-lipoxygenase in primary human neutrophils and in human and murine infection. *Blood.* **117**, 2033–2043
38. Thomas, C. P., Morgan, L. T., Maskrey, B. H., Murphy, R. C., Kühn, H., Hazen, S. L., Goodall, A. H., Hamali, H. A., Collins, P. W., and O'Donnell, V. B. (2010) Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependent thrombin generation. *J. Biol. Chem.* **285**, 6891–6903
39. Tyurina, Y. Y., Poloyac, S. M., Tyurin, V. A., Kapralov, A. A., Jiang, J., Anthonymuthu, T. S., Kapralova, V. I., Vikulina, A. S., Jung, M.-Y., Epperly, M. W., Mohammadyani, D., Klein-Seetharaman, J., Jackson, T. C., Kochanek, P. M., Pitt, B. R., Greenberger, J. S., Vladimirov, Y. A., Bayır, H., and Kagan, V. E. (2014) A mitochondrial pathway for biosynthesis of lipid mediators. *Nat. Chem.* **6**, 542–552
40. Hannibal, L., Tomasina, F., Capdevila, D. A., Demicheli, V., Tórtora, V., Alvarez-Paggi, D., Jemmerson, R., Murgida, D. H., and Radi, R. (2016) Alternative conformations of cytochrome c: structure, function, and detection. *Biochemistry.* **55**, 407–428
41. Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97–112
42. Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., and Utsumi, K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2495–2505
43. Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., and Ruggiero, F. M. (2010) Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1286–1295
44. Mailer, K. (1990) Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 59–64

45. Piacenza, L., Zeida, A., Trujillo, M., and Radi, R. (2022) The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. *Physiol. Rev.* **102**, 1881–1906
46. Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., and Freeman, B. A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**, 22028–22034
47. Salvi, M., Battaglia, V., Brunati, A. M., La Rocca, N., Tibaldi, E., Pietrangeli, P., Marcocci, L., Mondovì, B., Rossi, C. A., and Toninello, A. (2007) Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J. Biol. Chem.* **282**, 24407–24415
48. Panfili, E., Sandri, G., and Ernster, L. (1991) Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.* **290**, 35–37
49. Tanaka, T., Nakamura, H., Nishiyama, A., Hosoi, F., Masutani, H., Wada, H., and Yodoi, J. (2000) Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection against oxidative stress and aging. *Free radical research.* **33**, 851–855
50. Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237–271
51. Michelet, L., Zaffagnini, M., and Lemaire, D. (2009) Thioredoxins and Related Proteins. in *The Chlamydomonas Sourcebook*, pp. 401–443, Elsevier
52. Zhang, H., Du, Y., Zhang, X., Lu, J., and Holmgren, A. (2014) Glutaredoxin 2 reduces both thioredoxin 2 and thioredoxin 1 and protects cells from apoptosis induced by auranofin and 4-hydroxynonenal. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 669–681
53. Johansson, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2004) Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **279**, 7537–7543
54. Arnér, E. S. J., Zhong, L., and Holmgren, A. (1999) Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. in *Oxidants and antioxidants part B*, pp. 226–239, Methods in Enzymology, Elsevier, **300**, 226–239
55. Nishinaka, Y., Nakamura, H., Masutani, H., and Yodoi, J. (2001) Redox control of cellular function by thioredoxin; a new therapeutic direction in host defence. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis.* **49**, 285–92
56. Cox, A. G., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* **425**, 313–325
57. Copley, S. D., Novak, W. R. P., and Babbitt, P. C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry.* **43**, 13981–13995
58. Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 795–815
59. Trujillo, M., Tairum, C. A., de Oliveira, M. A., and Netto, L. E. (2022) Thiol- and selenol-based peroxidases: Structure and catalytic properties. in *Redox Chemistry and Biology of Thiols*, pp. 277–305, Elsevier

60. Sarma, G. N., Nickel, C., Rahlfs, S., Fischer, M., Becker, K., and Karplus, P. A. (2005) Crystal structure of a novel *Plasmodium falciparum* 1-Cys peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* **346**, 1021–1034
61. Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lázaro, J. J., and Dietz, K.-J. (2008) Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin. *Biochemistry.* **47**, 7196–7204
62. Wood, Z. A., Schröder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40
63. Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* **276**, 2469–2477
64. Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins. in *Peroxiredoxin Systems* (Flohé, L., and Harris, J. R. eds), pp. 61–81, Subcellular Biochemistry, Springer Netherlands, Dordrecht, **44**, 61–81
65. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015) Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 435–445
66. Zeida, A., Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Denicola, A., Estrin, D. A., and Radi, R. (2019) Catalysis of peroxide reduction by fast reacting protein thiols. *Chem. Rev.* **119**, 10829–10855
67. Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., Poole, L. B., Denicola, A., and Ferrer-Sueta, G. (2018) Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry.* **57**, 3416–3424
68. Veal, E. A., Underwood, Z. E., Tomalin, L. E., Morgan, B. A., and Pillay, C. S. (2018) Hyperoxidation of peroxiredoxins: gain or loss of function? *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 574–590
69. Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science.* **300**, 650–653
70. Kumsta, C., and Jakob, U. (2009) Redox-regulated chaperones. *Biochemistry.* **48**, 4666–4676
71. Moon, J. C., Hah, Y.-S., Kim, W. Y., Jung, B. G., Jang, H. H., Lee, J. R., Kim, S. Y., Lee, Y. M., Jeon, M. G., Kim, C. W., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**, 28775–28784
72. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.* **117**, 625–635
73. Fourquet, S., Huang, M.-E., D’Autreaux, B., and Toledano, M. B. (2008) The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1565–1576

74. Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 549–561
75. Rebelo, A. P., Eidhof, I., Cintra, V. P., Guillot-Noel, L., Pereira, C. V., Timmann, D., Traschütz, A., Schöls, L., Coarelli, G., Durr, A., Anheim, M., Tranchant, C., van de Warrenburg, B., Guissart, C., Koenig, M., Howell, J., Moraes, C. T., Schenck, A., Stevanin, G., Züchner, S., Synofzik, M., and PREPARE network (2021) Biallelic loss-of-function variations in PRDX3 cause cerebellar ataxia. *Brain*. **144**, 1467–1481
76. Alió Del Barrio, J. L., Chung, D. D., Al-Shymali, O., Barrington, A., Jatavallabhula, K., Swamy, V. S., Yébara, P., Angélica Henríquez-Recine, M., Boto-de-Los-Bueis, A., Alió, J. L., and Aldave, A. J. (2020) Punctiform and Polychromatic Pre-Descemet Corneal Dystrophy: Clinical Evaluation and Identification of the Genetic Basis. *Am. J. Ophthalmol.* **212**, 88–97
77. Noh, D. Y., Ahn, S. J., Lee, R. A., Kim, S. W., Park, I. A., and Chae, H. Z. (2001) Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res.* **21**, 2085–2090
78. Choi, J. H., Kim, T. N., Kim, S., Baek, S.-H., Kim, J. H., Lee, S. R., and Kim, J.-R. (2002) Overexpression of mitochondrial thioredoxin reductase and peroxiredoxin III in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res.* **22**, 3331–3335
79. Kim, S. H., Fountoulakis, M., Cairns, N., and Lubec, G. (2001) Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer’s disease and Down syndrome. *J. Neural Transm. Suppl.*
80. Cao, Z., Roszak, A. W., Gourlay, L. J., Lindsay, J. G., and Isaacs, N. W. (2005) Bovine mitochondrial peroxiredoxin III forms a two-ring catenane. *Structure*. **13**, 1661–1664
81. Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*. **41**, 5493–5504
82. Liebthal, M., Kushwah, M. S., Kukura, P., and Dietz, K.-J. (2021) Single molecule mass photometry reveals the dynamic oligomerization of human and plant peroxiredoxins. *iScience*. **24**, 103258
83. Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J. Biol. Chem.* **288**, 14170–14177
84. Dalla Rizza, J., Randall, L. M., Santos, J., Ferrer-Sueta, G., and Denicola, A. (2019) Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2. *Protein Sci.* **28**, 191–201
85. Peskin, A. V., Meotti, F. C., de Souza, L. F., Anderson, R. F., Winterbourn, C. C., and Salvador, A. (2020) Intra-dimer cooperativity between the active site cysteines during the oxidation of peroxiredoxin 2. *Free Radic. Biol. Med.* **158**, 115–125
86. Carvalho, L. A. C., Truzzi, D. R., Fallani, T. S., Alves, S. V., Toledo, J. C., Augusto, O., Netto, L. E. S., and Meotti, F. C. (2017) Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *J. Biol. Chem.* **292**, 8705–8715
87. Bolduc, J. A., Nelson, K. J., Haynes, A. C., Lee, J., Reisz, J. A., Graff, A. H., Clodfelter, J. E., Parsonage, D., Poole, L. B., Furdui, C. M., and Lowther, W. T. (2018) Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **293**, 11901–11912

88. Cox, A. G., Pearson, A. G., Pullar, J. M., Jönsson, T. J., Lowther, W. T., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem. J.* **421**, 51–58
89. Cordray, P., Doyle, K., Edes, K., Moos, P. J., and Fitzpatrick, F. A. (2007) Oxidation of 2-Cys-peroxiredoxins by arachidonic acid peroxide metabolites of lipoxygenases and cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **282**, 32623–32629
90. Noh, Y. H., Baek, J. Y., Jeong, W., Rhee, S. G., and Chang, T.-S. (2009) Sulfiredoxin Translocation into Mitochondria Plays a Crucial Role in Reducing Hyperoxidized Peroxiredoxin III. *J. Biol. Chem.* **284**, 8470–8477
91. Cox, A. G., Peskin, A. V., Paton, L. N., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. *Biochemistry.* **48**, 6495–6501
92. Hanschmann, E.-M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 1539–1605
93. Hanschmann, E.-M., Lönn, M. E., Schütte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2010) Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J. Biol. Chem.* **285**, 40699–40705
94. De Armas, M. I., Esteves, R., Viera, N., Reyes, A. M., Mastrogiovanni, M., Alegria, T. G. P., Netto, L. E. S., Tórtora, V., Radi, R., and Trujillo, M. (2019) Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **130**, 369–378
95. Arteel, G. E., Briviba, K., and Sies, H. (1999) Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* **445**, 226–230
96. Flohé, L., Loschen, G., Günzler, W. A., and Eichele, E. (1972) Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* **353**, 987–999
97. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J.-P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 95–106
98. De Simoni, S., Goemaere, J., and Knoops, B. (2008) Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP+. *Neurosci. Lett.* **433**, 219–224
99. Kameritsch, P., Singer, M., Nuernbergk, C., Rios, N., Reyes, A. M., Schmidt, K., Kirsch, J., Schneider, H., Müller, S., Pogoda, K., Cui, R., Kirchner, T., de Wit, C., Lange-Sperandio, B., Pohl, U., Conrad, M., Radi, R., and Beck, H. (2021) The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity. *Proc Natl Acad Sci USA.*
100. Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 464–473

101. Zeida, A., Reyes, A. M., Lichtig, P., Hugo, M., Vazquez, D. S., Santos, J., González Flecha, F. L., Radi, R., Estrin, D. A., and Trujillo, M. (2015) Molecular Basis of Hydroperoxide Specificity in Peroxiredoxins: The Case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. **54**, 7237–7247
102. Reyes, A. M., Vazquez, D. S., Zeida, A., Hugo, M., Piñeyro, M. D., De Armas, M. I., Estrin, D., Radi, R., Santos, J., and Trujillo, M. (2016) PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free Radic. Biol. Med.* **101**, 249–260
103. Castro, H., Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Lünsdorf, H., Wissing, J., and Tomás, A. M. (2002) Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1563–1574
104. Cha, M. K., Yun, C. H., and Kim, I. H. (2000) Interaction of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane. *Biochemistry*. **39**, 6944–6950
105. Baek, J. Y., Park, S., Park, J., Jang, J. Y., Wang, S. B., Kim, S. R., Woo, H. A., Lim, K. M., and Chang, T.-S. (2017) Protective Role of Mitochondrial Peroxiredoxin III against UVB-Induced Apoptosis of Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 1333–1342
106. Zhang, Y., Park, J., Han, S.-J., Lim, Y., Park, I., Kim, J.-S., Woo, H. A., and Lee, S.-R. (2019) Peroxiredoxin III Protects Tumor Suppressor PTEN from Oxidation by 15-Hydroperoxy-eicosatetraenoic Acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 2828493
107. Bhattacharya, A., Lustgarten, M., Shi, Y., Liu, Y., Jang, Y. C., Pulliam, D., Jernigan, A. L., and Van Remmen, H. (2011) Increased mitochondrial matrix-directed superoxide production by fatty acid hydroperoxides in skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 592–601
108. 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
109. Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., and Wolff, S. P. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202**, 384–389
110. Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., and Wolff, S. P. (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. **26**, 853–856
111. Pompeia, C., Lima, T., and Curi, R. (2003) Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem. Funct.* **21**, 97–104
112. Serth, J., Lautwein, A., Frech, M., Wittinghofer, A., and Pingoud, A. (1991) The inhibition of the GTPase activating protein-Ha-ras interaction by acidic lipids is due to physical association of the C-terminal domain of the GTPase activating protein with micellar structures. *EMBO J.* **10**, 1325–1330
113. Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J. Biol. Chem.* **282**, 11885–11892

114. Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smeekens, J., and Wu, R. (2017) Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics. *Mol. Biosyst.* **13**, 2574–2582
115. Musicco, C., Capelli, V., Pesce, V., Timperio, A. M., Calvani, M., Mosconi, L., Zolla, L., Cantatore, P., and Gadaleta, M. N. (2009) Accumulation of overoxidized Peroxiredoxin III in aged rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* **1787**, 890–896
116. Bae, S. H., Woo, H. A., Sung, S. H., Lee, H. E., Lee, S. K., Kil, I. S., and Rhee, S. G. (2009) Induction of sulfiredoxin via an Nrf2-dependent pathway and hyperoxidation of peroxiredoxin III in the lungs of mice exposed to hyperoxia. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 937–948
117. Collins, J. A., Wood, S. T., Nelson, K. J., Rowe, M. A., Carlson, C. S., Chubinskaya, S., Poole, L. B., Furdui, C. M., and Loeser, R. F. (2016) Oxidative Stress Promotes Peroxiredoxin Hyperoxidation and Attenuates Pro-survival Signaling in Aging Chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **291**, 6641–6654
118. Peskin, A. V., Pace, P. E., and Winterbourn, C. C. (2019) Enhanced hyperoxidation of peroxiredoxin 2 and peroxiredoxin 3 in the presence of bicarbonate/CO₂. *Free Radic. Biol. Med.* **145**, 1–7
119. Poynton, R. A., Peskin, A. V., Haynes, A. C., Lowther, W. T., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2016) Kinetic analysis of structural influences on the susceptibility of peroxiredoxins 2 and 3 to hyperoxidation. *Biochem. J.* **473**, 411–421
120. Budde, H., Flohé, L., Hecht, H.-J., Hofmann, B., Stehr, M., Wissing, J., and Lünsdorf, H. (2003) Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in trypanoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem.* **384**, 619–633
121. De Simoni, S., Linard, D., Hermans, E., Knoop, B., and Goemaere, J. (2013) Mitochondrial peroxiredoxin-5 as potential modulator of mitochondria-ER crosstalk in MPP⁺-induced cell death. *J. Neurochem.* **125**, 473–485
122. Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**, 1486–1500
123. Lubos, E., Loscalzo, J., and Handy, D. E. (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1957–1997
124. Chang, T.-S., Cho, C.-S., Park, S., Yu, S., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 41975–41984
125. Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F., and Girotti, A. W. (1990) Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* **1045**, 252–260
126. Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibata, T., Belter, J. G., Motta, L., Richardson, A., and Prolla, T. A. (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse

- development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 496–502
127. Schneider, M., Förster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., Neumüller, C., Deutsch, M. J., Walch, A., Hrabé de Angelis, M., Wurst, W., Ursini, F., Roveri, A., Maleszewski, M., Maiorino, M., and Conrad, M. (2009) Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.* **23**, 3233–3242
 128. Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**, 3289–3303
 129. Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., Roveri, A., Peng, X., Porto Freitas, F., Seibt, T., Mehr, L., Aichler, M., Walch, A., Lamp, D., Jastroch, M., Miyamoto, S., Wurst, W., Ursini, F., Arnér, E. S. J., Fradejas-Villar, N., Schweizer, U., Zischka, H., Friedmann Angeli, J. P., and Conrad, M. (2018) Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell.* **172**, 409-422
 130. Evans, R. C., Chen, L., Na, R., Yoo, K., and Ran, Q. (2022) The gpx4^{niko} mouse is a versatile model for testing interventions targeting ferroptotic cell death of spinal motor neurons. *Neurotox. Res.* **40**, 373–383
 131. Cardozo, G., Mastrogiovanni, M., Zeida, A., Viera, N., Radi, R., Reyes, A. M., and Trujillo, M. (2023) Mitochondrial peroxiredoxin 3 is rapidly oxidized and hyperoxidized by fatty acid hydroperoxides. *Antioxidants*

