



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS FORMADOS POR LA $Z\alpha$ PEROXIDASA LUEGO DE CUMPLIR SU CICLO DE CATÁLISIS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. RODOLFO GUILLERMO VALLE ALTAMIRANO

DRA. MARÍA BRENDA VALDERRAMA BLANCO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (UNAM)

CD. de MÉXICO, MAYO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TEMA DE TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS FORMADOS POR LA Zo
PEROXIDASA LUEGO DE CUMPLIR SU CICLO DE CATÁLISIS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. RODOLFO GUILLERMO VALLE ALTAMIRANO

**DRA. MARÍA BRENDA VALDERRAMA BLANCO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (UNAM)**



Ciudad de México, mayo 2022.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Silvia Elena Castillo Blum
Secretario: Dr. Miquel Gimeno Seco
1er Vocal: Dr. Eduardo Bárzana García
2do Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero
3er Vocal: Dr. Eduardo Torres Ramírez

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología IBT-UNAM, en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, bajo la asesoría de la Dra. Ma. Brenda Valderrama Blanco y con apoyo del CONACyT, número de becario 273407.

Derivado de este proyecto, se publicó el artículo "*Identification of Fe(III)-OH species as a catalytic intermediate in plant peroxidases at high H₂O₂ concentration*", en la revista *New Journal of Chemistry*, DOI: 10.1039/d1nj04837f.

Tutora de Tesis



Dr. Ma. Brenda Valderrama Blanco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Biotecnología y al Posgrado en Ciencias Químicas.

A la Dra. Brenda Valderrama Blanco por la confianza, por todo el conocimiento compartido a lo largo de todos estos años y sobre todo por ser mi guía en la investigación y en el mundo profesional.

Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica y al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico y a los colaboradores el Dr. José Manuel Saniger Blesa, la Dra. Selene Rubí Islas Sánchez y el Dr. Isidro Badillo por su apoyo con los experimentos de Raman.

Al Departamento de Biotecnología, Química y Farmacia de la Universidad Siena, a la Dra. Rebecca Pogni y a la Dra. Camilla Barato por el apoyo con los experimentos de EPR.

A mi comité tutor la Dra. Silvia Castillo Blum y el Dr. Iván Castillo por su ayuda y orientación durante la realización de este trabajo.

Al jurado por su valioso tiempo y por contribuir a la mejora de este escrito con sus comentarios y consejos.

Al Dr. Enrique Rudiño y a su grupo por el apoyo durante la estancia en el laboratorio 8 del IBT.

Al M. en C. Raunel Tinoco V., a la Biol. Sonia Rojas, al Dr. Miguel Ángel Hernández V. y M. en C. Diego H. Cuervo Amaya por el apoyo técnico durante el desarrollo parte de este proyecto.

A mis amigos de la vida Guillermo Fernández, Pedro Franco, Lua Núñez, Arisbeth Almeida y Lizbeth García que vivieron de cerca este proyecto de vida tan importante y que siempre fueron un apoyo fundamental.

A mis amigos y familia Diego Cuervo y Fabricio Mendoza por todas sus valiosas aportaciones en el desarrollo de este proyecto y en la redacción de esta tesis, pero sobre todo por ser mi soporte emocional incondicional en todo momento.

Y sobre todo a mis padres, a mis hermanas y mis sobrinos por su amor, por siempre motivarme y por hacerme feliz.

Al niño que me recordó como inició mi interés y el amor por la ciencia, que cree y confía en mí siempre que la curiosidad científica lo alcanza. Gracias, Axel Guillermo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Generalidades de las hemoperoxidasas.....	3
Mecanismo de reacción de las hemoperoxidasas	9
Compuestos I y II	9
Sustrato reductor	12
Compuesto III	13
Caracterización de los intermediarios de las hemoperoxidasas.....	13
Espectroscopía de absorción.....	14
Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica “EPR”	14
Espectroscopía Raman	15
Vías de decaimiento del Compuesto III.....	16
Inactivación suicida en hemoperoxidasas.....	17
ANTECEDENTES	18
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
METODOLOGÍA.....	24
Purificación de ZoPrx.....	24
Estabilidad de ZoPrx ante H ₂ O ₂	26
Cuantificación de ZoPrx.....	26
Determinaciones de actividad enzimática mediante espectroscopía UV-Visible.....	27
Seguimiento de los ciclos catalíticos de la ZoPrx	27
Seguimiento de los ciclos catalíticos del estado basal regenerado de la ZoPrx	27
Extracción de Hemoglobina	28
Purificación de Hemoglobina	28
Cuantificación de Hemoglobina	29

Generación de especies Hidroxiladas de ZoPrx, HRPA2 y Hemoglobina	29
Experimentos de espectroscopía Raman	30
RESULTADOS	32
Desarrollo de un protocolo optimizado para la obtención de ZoPrx pura	32
Determinación de los parámetros catalíticos de hemoperoxidasas	32
Determinación de las constantes de velocidad k_1 y k_3 del ciclo catalítico de la Zo Peroxidasa	35
Cálculo de velocidades iniciales a partir de datos experimentales.....	36
Cálculo de constantes cinéticas a partir de datos de velocidad inicial de reacción.....	37
Caracterización de intermediarios catalíticos por espectroscopía UV-Visible.....	40
Caracterización de la ZoPrx por espectroscopía Raman	47
Espectroscopía paramagnética electrónica de la HRPA2.....	58
Formación de especies hidroxiladas	59
Formación y decaimiento de la especie ferrosa de HRPA2 (Fe(II))	66
Formación del compuesto III de la HRPA2 a partir de Fe(II) y O ₂	67
Mecanismo de formación y decaimiento propuesto para el CIII en hemoperoxidasas	69
CONCLUSIONES	73
REFERENCIAS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales de las muestras caracterizadas por Raman confocal AF a 532 nm.	30
Tabla 2. Condiciones experimentales de las muestras caracterizadas por Raman TriVista 557 a 405 nm.	31
Tabla 3. Datos cinéticos de la ZoPrx y HRP2 usando Guayacol como sustrato a pH 6.1.	40
Tabla 4. Asignaciones de las bandas en resonancia Raman ^{45,74,78-81}	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de HRPC, constituida principalmente por α -hélices (modificada de Veitch, 2004; el círculo azul en el centro representa al Fe del grupo hemo y los aros rojos enmarcan a los átomos de calcio) ¹⁴	4
Figura 2. Coordinación de hierro hémico en las peroxidases. Formación de un enlace de coordinación entre la histidina y el hierro en la región proximal.	5
Figura 3. Red de enlaces de hidrógeno alrededor del hemo en LiP (Poulos et al., 1993), y las moléculas de agua que interactúan en la formación de los enlaces. (tomado de Banci et al. 1997) ¹³	6
Figura 4. Sitios de unión de los iones calcio distal y proximal en HRPC. (tomado de Howes et al. 2001) ¹¹	7
Figura 5. Localización de N-glicosilaciones en la ZoPrx. Representación estructural de Richardson de las 7 glicosilaciones de la enzima, se muestra además los sitios de unión de los iones calcio (esferas grises) ²⁷	8
Figura 6. Mecanismo del ciclo catalítico de las hemoperoxidasas. (Adaptado de Veitch et al. 2004 y Hersleth et al. 2006) ⁹	9
Figura 7. Residuos de aminoácidos en la cavidad hemo de una peroxidasa típica de plantas (peroxidasa de cacahuete). El hierro en el hemo (Fe(III) en el estado basal de la enzima) se muestra como una esfera y coordinado por la His169 (His170 en HRPC). El sexto sitio de coordinación en el plano distal del hemo está vacante. (tomado de Veitch et al. 2004) ⁹	10
Figura 8. Formación del compuesto I de HRPC (Tomado de Veitch et al., 2004) ⁹	11

Figura 9. Mecanismo de reducción del compuesto I, compuesto II y oxidación del sustrato. En los recuadros se presentan los reactivos y productos de la catálisis. Las moléculas aromáticas que entran a la reacción son de sustrato reductor y las moléculas aromáticas de salida de la reacción son radicales del sustrato que posteriormente polimerizan y dan coloración a la reacción. (adaptado de Veitch et al., 2004 y Henriksen et al., 1999) ⁹	12
Figura 10. Mecanismo propuesto de inactivación por H ₂ O ₂ de la Zo peroxidasa (tomado de Valderrama, et al., 2002) ⁴	16
Figura 11. Cinética de inactivación de ZoPrx (Δ) y HRP2 (o) incubando con 1 mM de H ₂ O ₂ en ausencia de sustrato reductor en amortiguador BFS pH 6.1, 60 mM ⁴⁹ . La gráfica muestra la inactivación de la HRP2 en el tiempo y la actividad constante de la ZoPrx durante al menos 150 min ⁵⁹	18
Figura 12. Estructura tridimensional de la ZoPrx (PDB 6AS2). En azul se presentan las hélices a que confirman a la proteína. En el centro de la figura se observa el grupo hemo. Las esferas en rojo representan los átomos de calcio, arriba el calcio distal y abajo el calcio proximal. En la periferia de la estructura se muestran en verde las moléculas que representan las glicosilaciones.....	19
Figura 13. Espectro de EPR a 5 K de la ZoPrx, especie nativa. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz ³²	20
Figura 14. Espectro de EPR a 4 K del compuesto I formado en la reacción 1:8 ZoPrx:H ₂ O ₂ . El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz ³²	20
Figura 15. Espectro de EPR a 4 K en la reacción 1:10,000 ZoPrx:H ₂ O ₂ . El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz ³²	21
Figura 16. Espectro a 18 K de la ZoPrx en presencia de H ₂ O ₂ en relación 1:10,000 registrado después de 72 h. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz ³²	22
Figura 17. Espectro de absorción electrónica de la Zo Peroxidasa.	32
Figura 18. Representación gráfica de velocidades iniciales para una concentración de 5.32x10 ⁻⁹ M del estado basal nativo de la ZoPrx en presencia de 0.3 mM de H ₂ O ₂ contra diferentes concentraciones de sustrato reductor Guayacol (3-8 mM).	36

Figura 19. Representación gráfica de la Ecuación 6. Linealización del modelo de estado estacionario para la obtención de k_3 a partir de las velocidades calculadas para condición de H_2O_2 (0.3-0.7 mM).	38
Figura 20. Representación gráfica de la Ecuación 7. Linealización de la ordenada de la Ecuación 6 para la obtención de k_1 a partir de los cálculos de k_3	39
Figura 21. A) Ciclo catalítico de la ZoPrx: ZoPrx nativa (azul), CI (naranja), CII (gris) y estado basal regenerado (amarillo). B) acercamiento al intervalo 450-550 nm.....	41
Figura 22. Seguimiento del decaimiento del CIII formado por la ZoPrx incubada en 1 mM de H_2O_2	42
Figura 23. Ciclo catalítico de estado basal regenerado de la ZoPrx. Estado basal (azul), CI (naranja), CII (gris) y segundo estado basal regenerado (amarillo).....	43
Figura 24. Comparación de estado basal nativo y estados basales regenerados de la ZoPrx. ZoPrx estado basal nativo (azul), estado basal regenerado (naranja) y segundo estado basal regenerado (verde).	43
Figura 25. Comparación de los compuestos CI partiendo del estado basal nativo (azul) y CI partiendo el estado basal regenerado (naranja) de la ZoPrx.....	44
Figura 26. Comparación de los compuestos CII partiendo del estado basal nativo (azul) y CII proveniente del estado basal regenerado (naranja) de la ZoPrx.....	44
Figura 27. Seguimiento del decaimiento del CIII formado a partir de un segundo estado basal regenerado de la ZoPrx.	46
Figura 28. A) Comparación de los compuestos III. CIII partiendo del estado basal nativo de la ZoPrx (azul), CIII proveniente del estado basal regenerado de la ZoPrx (rojo) y CIII de la HRP2 (gris). B) acercamiento al intervalo 500-600 nm.	47
Figura 29. Espectro Raman del estado nativo de la HRP2 (azul) y el estado nativo de la ZoPrx (naranja), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.....	48
Figura 30. Espectro Raman de a) HRP1, b) HRPB y HRPC 1 mM, obtenido a 530.9 nm, en amortiguador BFS 200 mM pH 7, temperatura ambiente ⁷⁴	48
Figura 31. Espectro Raman del CIII de HRP2 (azul) y CIII ZoPrx (naranja) obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.	49
Figura 32. Espectro Raman del CIII de HRP 0.2 mM, obtenido a 514.5 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 7.8 y -10 °C ⁵¹	50

Figura 33. Espectro de Resonancia Raman de la ZoPrx a 405 nm. Estado basal (línea negra); exposición a exceso de H ₂ O ₂ (línea azul) y exposición a exceso de H ₂ ¹⁸ O ₂ (línea roja). Acercamientos a la baja y alta frecuencia.....	52
Figura 34. Sustracción de espectros de Resonancia Raman. Izquierda estado basal de la ZoPrx al espectro de la reacción ZoPrx: H ₂ O ₂ ; derecha, estado basal de la ZoPrx al espectro de la reacción de ZoPrx:H ₂ ¹⁸ O ₂	54
Figura 35. Espectro de Resonancia Raman de la HRPA2; Estado basal (línea negra); exposición a exceso de H ₂ O ₂ (línea azul) y exposición a exceso de H ₂ ¹⁸ O ₂ (línea roja). Acercamientos a la baja y alta frecuencia.....	55
Figura 36. Sustracción de espectros de resonancia Raman. Izquierda, estado basal de la HRPA2 al espectro de la reacción HRPA2: H ₂ O ₂ ; derecha estado basal de la HRPA2 al espectro de la reacción de HRPA2:H ₂ ¹⁸ O ₂	56
Figura 37. Espectros de EPR de la HRPA2. Estado basal obtenido a 5 K (línea negra superior); CI adquirido a 4 K después de la exposición a H ₂ O ₂ en relación molar 1:8 enzima:H ₂ O ₂ (línea roja superior) y CIII obtenido a 4 K después de la exposición a H ₂ O ₂ en relación molar 1:10,000 enzima:H ₂ O ₂ (línea negra inferior). El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 1 mT; potencia 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.	59
Figura 38. Espectro de Absorción electrónico de la Hemoglobina.	60
Figura 39. A) Comparación de las especies hidroxiladas y el CIII de la ZoPrx: Hb-OH (azul), ZoPrx-OH (gris) y CIII de la ZoPrx (rojo). B) acercamiento al intervalo 500-600 nm.	60
Figura 40. A) Comparación de las especies hidroxiladas y el CIII de la HRPA2: Hb-OH (azul), HRPA2-OH (naranja) y CIII de la HRPA2 (amarillo). B) acercamiento al intervalo 500-600 nm.	61
Figura 41. Espectro Raman la Hb humana 1.8 mM, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.....	62
Figura 42. Espectro Raman la Hb humana 0.1 mM, obtenido a 568.2 nm, pH 7 ⁹⁴	62
Figura 43. Espectro Raman de Hb-OH autooxidación, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y temperatura ambiente.	63
Figura 44. Espectro Raman de la HRPA1-OH 1 mM, obtenido a 530.9 nm, en amortiguador BSF 200 mM pH 9.2, temperatura ambiente ⁹³	63
Figura 45. Espectro Raman de Hb (azul) vs Hb-OH autooxidación (naranja), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.	64

Figura 46. Espectro Raman de Hb-OH autooxidación (negro) vs Hb-OH pH 12 (rojo), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y pH 12, respectivamente, temperatura ambiente.	64
Figura 47. Espectro Raman del CIII de la ZoPrx (azul) y Hb-OH (naranja), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.....	65
Figura 48. Espectro Raman del CIII de la ZoPrx pH 6.1 (verde) y Hb-OH pH 12 (rojo) y ZoPrx-OH pH 12, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM, temperatura ambiente.....	65
Figura 49. Espectro Raman del CIII de la HRPA2-OH Ph 12 (azul) y Hb-OH (naranja) Ph 6.1 Y CIII ZoPrx (rojo) pH 6.1, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM, temperatura ambiente. ...	66
Figura 50. Formación y decaimiento de la especie ferrosa de la HRPA2 obtenida de la reacción de la enzima con ditionita de sodio en exceso.	67
Figura 51. Reacción de la especie ferrosa de la HRPA2 con exceso de O ₂ . Especie ferrosa de HRPA2 (naranja); especie ferrosa más exceso de O ₂ (gris).	68
Figura 52. Reacción de la especie ferrosa de la HRPA2 con exceso de H ₂ O ₂ . HRPA2 nativa (gris); especie ferrosa de HRPA2 (amarillo); especie ferrosa más exceso de H ₂ O ₂ de 1,000 equivalentes (amarillo); especie ferrosa más exceso de H ₂ O ₂ de 10,000 equivalentes (naranja); especie ferrosa más exceso de H ₂ O ₂ de 20,000 equivalentes (negro); especie ferrosa más exceso de H ₂ O ₂ de 30,000 equivalentes (verde) y especie ferrosa más exceso de H ₂ O ₂ de 40,000 equivalentes (azul).	69

ABREVIATURA

Å	Angstrom
APX	Ascorbato peroxidasa
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BFS	Amortiguador de fosfato de sodio
CCADE	Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico
CEP	Peroxidasa de palma <i>Chamaerops excelsa</i>
CI	Compuesto I
CII	Compuesto II
CIII	Compuesto III
CM	Carboximetilcelulosa
Dit.	Ditionita de sodio
E	Enzima
EB	Estado basal
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
Eq.	Equivalentes
ES	Complejo Enzima-Sustrato
G	Guayacol
Hb	Hemoglobina
Hb-OH	Hemoglobina hidroxilada
His	Histidina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HRPA2	Peroxidasa de rábano picante isoenzima A2
HRPA2-OH	Peroxidasa de rábano picante isoenzima A2 hidroxilada
HRPC	Peroxidasa de rábano picante isoenzima C
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LiP	Lignina peroxidasa

LUCE	Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica
MQ	Mili Q
P	Producto
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PrxPNC1	Peroxidasa de cacahuete isoenzima C1
RPTP	Peroxidasa de árbol de palma real
S	Sustrato
BPS	Buffer fosfatos de sodio
Tyr	Tirosina
UV-Vis	Ultravioleta visible
ZoPrx	Zo Peroxidasa
ZoPrx-OH	Zo Peroxidasa hidroxilada

RESUMEN

Las hemoperoxidasas son enzimas que utilizan H_2O_2 como aceptor de electrones para catalizar reacciones de oxidación. Su ciclo catalítico parte de un estado basal de Fe(III) e involucra dos intermediarios identificados como compuesto I y II. El compuesto I es una especie oxoferril porfirina con un radical libre π catiónico asociado (\bullet +porfirina O=Fe(IV)). El radical libre del compuesto I se rescata con un electrón del sustrato reductor, dando lugar al compuesto II, el cual, es una oxoferril porfirina (O=Fe(IV)). El compuesto II es reducido por una segunda molécula de sustrato reductor para regresar al sitio activo a su estado basal Fe(III) , completando su ciclo catalítico.

En todas las hemoperoxidasas, este ciclo catalítico, se ve interrumpido por la inactivación de la enzima, la cual se presenta a altas concentraciones de H_2O_2 . Cuando el estado basal de la enzima es incubado en exceso de H_2O_2 se forma el compuesto III, que, clásica e históricamente se había descrito como un radical peroxil ferril porfirina ($\bullet\text{OO-Fe(III)}$).

Sin embargo, en los antecedentes de este trabajo, describimos la primera evidencia que nos llevó a replantear la identidad del compuesto III; esta evidencia es el espectro de EPR de la Zo peroxidasa (ZoPrx) en presencia de H_2O_2 en exceso, el cual, presentó señales características de hemoproteínas hidroxiladas. Así, este trabajo se centra en la caracterización del compuesto III de la ZoPrx y de la HRP2 como especies Fe(III)-OH por diferentes técnicas espectroscópicas como UV-Vis, EPR y Raman. Esta caracterización nos permitió proponer un mecanismo de formación y decaimiento del compuesto III de manera general para las hemoperoxidasas, mismo que fue analizado y corroborado por el bance redox de las semirreacciones cada uno de los pasos propuestos.

Adicionalmente, por la particular resistencia a la inactivación de la ZoPrx en presencia de H_2O_2 en exceso, se realizaron estudios de cinética enzimática de los intermediarios catalíticos, partiendo del estado basal nativo tanto de la ZoPrx y de la HRP2, así como del estado basal regenerado de la ZoPrx. Con esto se pudo concluir que, para ambas enzimas, el paso limitante de la reacción es la reducción del compuesto II a estado basal. En todos los casos, esta constante de velocidad se encuentra en el mismo orden de magnitud, aunque la constante de formación del compuesto I es un orden de magnitud mayor para la HRP2. Se realizó también la caracterización de estos intermediarios por UV-Vis de la ZoPrx partiendo de su estado basal nativo y su estado basal regenerado. En conjunto, estos datos permitieron proponer que las especies formadas pueden ser equivalentes.

ABSTRACT

Hemoperoxidases are enzymes that use H_2O_2 as an electron acceptor to catalyze oxidation reactions. Its catalytic cycle starts from the ground state of Fe(III) and involves two intermediates identified as compound I and II. Compound I is an oxoferryl porphyrin species with an associated cationic π free radical (\bullet +porphyrin O=Fe(IV)). The free radical of compound I is rescued with an electron from the reducing substrate, giving rise to compound II, which is an oxoferryl porphyrin (O=Fe(IV)). Compound II is reduced by a second molecule of reducing substrate to return the active site to its ground state Fe(III), completing its catalytic cycle.

In all the hemoperoxidases, this catalytic cycle is interrupted by the inactivation of the enzyme, which occurs at high concentrations of H_2O_2 . When the ground state of the enzyme is incubated in excess of H_2O_2 , compound III is formed, which, classically and historically, had been described as a peroxyferryl porphyrin radical ($\bullet\text{OO-Fe(III)}$).

However, in an earlier work, we obtained the EPR spectrum of Zo peroxidase (ZoPrx), our first evidence that led us to reconsider the identity of compound III; The spectrum of ZoPrx in the presence of excess H_2O_2 presented characteristic signals of hydroxylated hemoproteins. Thus, this work focuses on the characterization of compound III of ZoPrx and HRP2 as Fe(III)-OH species by different spectroscopic techniques such as UV-Vis, EPR and Raman. This characterization allowed us to propose a mechanism for the formation and decay of compound III in a general way for hemoperoxidases, which was analyzed and corroborated by the redox balance of the half-reactions of each of the proposed steps.

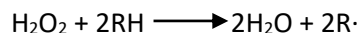
Additionally, due to the particular resistance to inactivation of ZoPrx in the presence of H_2O_2 in excess, enzymatic kinetic studies of the catalytic intermediates were performed, starting from the native basal state of both ZoPrx and HRP2, as well as from the regenerated basal state of ZoPrx. With this it could be concluded that, for both enzymes, the limiting step of the reaction is the reduction of compound II to the basal state. In all cases, this rate constant is in the same order of magnitude, although the formation constant of compound I is one order of magnitude higher for HRP2. UV-Vis characterization of these intermediates was also performed for ZoPrx starting from its native and its regenerated basal state. Taken together, these data allowed us to propose that the species formed may be equivalent.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de las hemoperoxidasas

Existe una gran variedad de proteínas y enzimas en la naturaleza que contienen como grupo prostético un grupo hemo, que consiste en una porfirina compuesta por un macrociclo tetrapirrónico que coordina hierro (ferriprotoporfirina IX), y que se encuentra en una cavidad hidrofóbica dentro de las proteínas¹. Los complejos Fe-porfirina, además de estar involucrados en el transporte de oxígeno, participan en una gran variedad de procesos catalíticos bioquímicos². Las principales funciones de las proteínas y enzimas que contienen hierro son: transferencia de electrones (enzimas y proteínas redox, citocromos); acarrear y enlazar oxígeno (hemoglobina y mioglobina); catálisis de oxidaciones acopladas a la reducción de dioxígeno y peróxido de hidrógeno (oxidadas y peroxidasas); catálisis de la descomposición de peróxido de hidrógeno (catalasas) e insertar átomos de oxígeno o dioxígeno dentro de moléculas orgánicas³.

Así, las hemoperoxidasas son un grupo de hemoproteínas que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos aromáticos usando al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como aceptor de electrones⁴.



Dentro de este grupo encontramos a las hemoperoxidasas no animales, las cuales se dividen en tres clases, siendo la clase III la que comprende a las de plantas secretadas fuera de la célula o transportadas dentro de vacuolas^{5,6}. Esta clase incluye a las peroxidasas de rábano, de las que se conocen al menos 15 isoenzimas⁷ dentro de las cuales la isoenzima C, o HRPC por sus siglas en inglés (Horseradish peroxidase isoenzyme C), ha sido una de las más estudiadas^{5,8,9,10}.

Las peroxidasas de clase III se caracterizan por estar conformadas por una cadena polipeptídica única de aproximadamente 300 aminoácidos, una protoporfirina IX de Fe(III) (grupo hemo b) y por otros elementos indispensables para mantener la estructura y la actividad de la proteína, tales como las glicosilaciones, átomos de calcio y puentes disulfuro^{11,12}. Las hemoperoxidasas de plantas presentan dominios altamente conservados como la región proximal, caracterizada por la presencia de un residuo de His que participa como el quinto ligante en la coordinación del hierro en el grupo hemo, y la región distal que se caracteriza por la presencia de residuos de His y Arg,

presumiblemente indispensables para llevar a cabo la actividad catalítica y que se localizan en el lado disponible o vacante del hemo para la sexta coordinación del hierro^{5,13}.

En estas proteínas, el grupo hemo que es de tipo b, presenta grupos metilo en las posiciones 1, 3, 5 y 8, grupos vinilo en las posiciones 2 y 4, y grupos propionato en posiciones 6 y 7 (1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfirina-6,7 ácido dipropiónico, en la nomenclatura IUPAC). La estructura de las hemoperoxidasas consiste principalmente en α -hélices altamente conservadas (de 10 a 12), dos hojas β , con el hemo localizado entre los dominios distal y proximal (Figura 1), y un número alto de N-glicosilaciones en la superficie conformadas por oligosacáridos ramificados^{13,14}

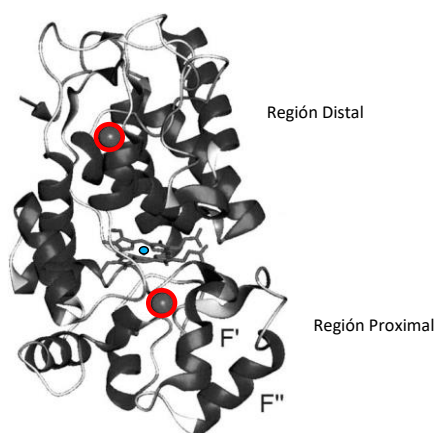


Figura 1. Estructura tridimensional de HRPc, constituida principalmente por α -hélices (modificada de Veitch, 2004; el círculo azul en el centro representa al Fe del grupo hemo y los aros rojos enmarcan a los átomos de calcio)¹⁴.

En su estado basal, el Fe(III) dentro del grupo hemo se encuentra pentacoordinado, por átomos de nitrógeno de los pirroles en la porfirina ocupando las cuatro posiciones de plano ecuatorial; la quinta posición o quinto sitio de coordinación es ocupado comúnmente por un átomo de nitrógeno del grupo imidazol de la His proximal, que proviene de la cadena lateral y que es de carácter aniónico debido a la presencia de un enlace de hidrógeno fuerte formado entre la histidina y un ácido aspártico, un residuo altamente conservado en las peroxidases¹⁵ (Figura 2). La coordinación al quinto ligante es responsable de la modulación de la reactividad de la enzima y confiere un valor bajo y negativo del potencial de reducción del hierro lo que le permite estabilizar estados de oxidación altos¹³.

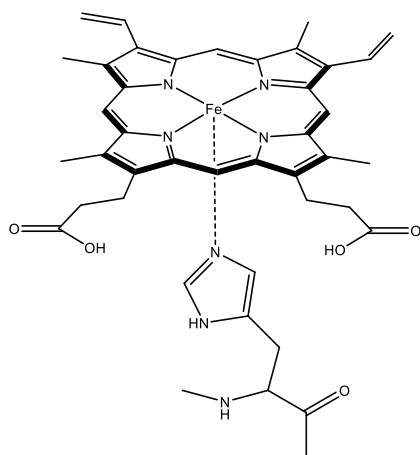


Figura 2. Coordinación de hierro hémico en las peroxidasas. Formación de un enlace de coordinación entre la histidina y el hierro en la región proximal.

El sexto sitio de coordinación en el hierro se encuentra vacante, lo que le genera un estado de alto espín $S=5/2$ ¹³. Este sitio se orienta hacia la región distal del grupo hemo, que es donde se da la interacción con su sustrato natural H_2O_2 , y en donde se llevan a cabo muchas de las reacciones de las peroxidasas¹⁶. La región distal se caracteriza por la presencia de dos residuos de aminoácidos invariantes o conservados que son la histidina y arginina distales que forman una cavidad hidrofílica. Estos dos residuos estabilizan, a su vez, un cúmulo de moléculas de agua mediante interacciones de enlace de hidrógeno, esto aunado al fuerte enlace Fe-N que se presenta entre el hierro y la histidina proximal, previenen que el hierro pueda ser coordinado por alguna molécula de agua¹³.

Las evidencias cristalográficas y el análisis espectroscópico de especies, obtenidas por mutaciones de las peroxidasas del rábano blanco, han permitido identificar la presencia de una red de interacciones de enlace de hidrógeno que se extiende desde la región distal hasta la región proximal de la cavidad del grupo hemo, involucrando incluso los dos sitios de unión de los iones calcio. Dentro de esta red se han identificado al menos cuatro moléculas de agua invariantes en el sitio activo de las hemoperoxidasas, las cuales se encuentran presentes tanto en la cavidad distal como en la proximal, enlazadas por enlaces de hidrógeno a residuos hidrofílicos altamente conservados (Figura 3). La función de la red anteriormente descrita ha sido propuesta como conductora del flujo de electrones que ocurre entre ambas regiones (distal y proximal) de la peroxidasa¹⁷. La representación de estas características se muestra en la Figura 3 con estructura

cristalográfica de la lignina peroxidasa (LiP), demostrando la generalidad de estas características en las hemoperoxidasas.

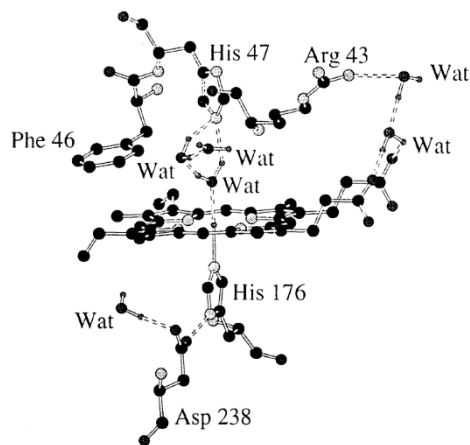


Figura 3. Red de enlaces de hidrógeno alrededor del hemo en LiP (Poulos et al., 1993)¹⁸, y las moléculas de agua que interactúan en la formación de los enlaces. (tomado de Banci et al. 1997)¹³.

La presencia de los iones calcio es de gran importancia estructural y sus sitios de unión se encuentran conservados en las peroxidases de plantas. Uno de estos sitios de unión a calcio se encuentra localizado en la región proximal y otro más en la región distal. El sitio proximal se caracteriza por la presencia de ocho átomos de oxígeno provenientes del esqueleto de la proteína y de la cadena lateral de los residuos de aminoácidos; este sitio se encuentra alejado de la superficie de la proteína por lo que es menos accesible a moléculas de disolvente y ocasiona que el ion de calcio se encuentre fuertemente enlazado. El sitio de unión a calcio en la región distal consta de siete átomos de oxígeno que también provienen del esqueleto de la proteína, así como de las cadenas laterales de los residuos; este sitio se encuentra más cercano a la superficie lo que lo hace más accesible para las moléculas disolvente, traducándose en una menor fuerza de unión en comparación a su homólogo en la región proximal¹³ Figura 4.

La importancia estructural de la presencia de estos iones calcio ha sido demostrada gracias a que la remoción de cualquiera de los dos iones lleva a la disminución de la actividad enzimática, de la misma manera, la remoción de ambos iones lleva a la pérdida total de la actividad, posiblemente debido a la inestabilidad del plegamiento en estas condiciones, es decir, la estructura de la enzima se ve comprometida al grado que se impide el acceso de los sustratos a sus regiones de interacción para llevar a cabo la catálisis¹⁹. Los puentes disulfuro, que también son de importancia estructural se presentan en sitios en donde los residuos de cisteína son conservados en las

peroxidasas de plantas. La HRP2 los presenta, por ejemplo, en las posiciones 11-91, 44-49, 176-208 y 97-299^{20,21}.

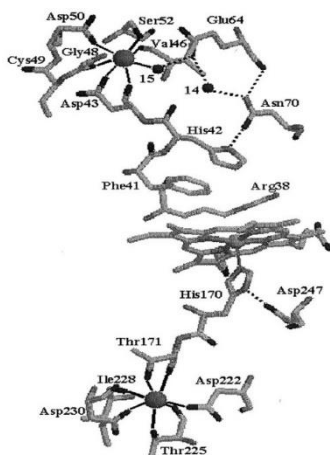


Figura 4. Sitios de unión de los iones calcio distal y proximal en HRP2. (tomado de Howes et al. 2001)¹¹.

La presencia de glicosilaciones en las proteínas es importante ya que normalmente confiere solubilidad y disminuye la flexibilidad de la cadena principal, proporcionando estabilidad estructural y protección contra la proteólisis²². En particular, las hemoperoxidasas son proteínas altamente glicosiladas, llegando a representar hasta el 30 % de la masa total²³. Por ejemplo, la HRP2 que posee ocho glicosilaciones²¹; por estudios fisicoquímicos realizados en la familia de las HRP se sabe que, bajo condiciones particulares la desglicosilación de las mismas no repercute en su actividad enzimática ni en el acceso o interacción con los sustratos, pero sí disminuye considerablemente su solubilidad en una solución de sulfato de amonio²⁴. Otro caso interesante es el de las peroxidasas de cacahuate prxPNC1 la cual tiene tres glicosilaciones (N-60, N-144 y N-185) y en las que se ha podido identificar que la desglicosilación de la enzima en las posiciones N-60 y N-144 interfiere en la apropiada interacción con guayacol como sustrato reductor, lo que se traduce en una disminución de la actividad catalítica, mientras que la remoción de la glicosilación en la posición N-185 repercute en la termoestabilidad de la proteína²⁵. De la misma manera, el gran número de glicosilaciones identificadas en la peroxidasa del árbol palma real (RPTP) han demostrado conferir su tan alta y característica termoestabilidad²⁶. En el caso de la ZoPrx se ha identificado que presenta al menos siete N-glicosilaciones²⁷ (Figura 5) al igual que la HRP2²⁸.

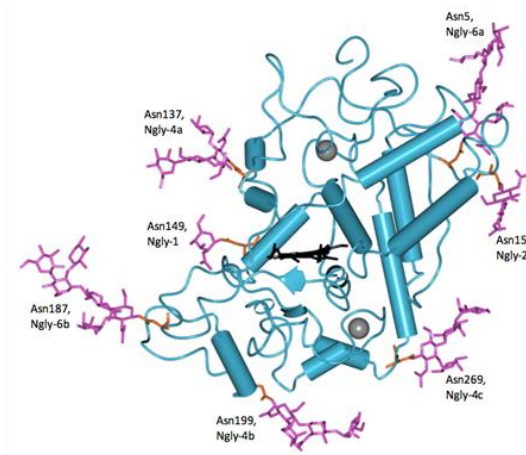


Figura 5. Localización de N-glicosilaciones en la ZoPrx. Representación estructural de Richardson de las 7 glicosilaciones de la enzima, se muestra además los sitios de unión de los iones calcio (esferas grises)²⁷.

Las peroxidases de clase III han sido ampliamente estudiadas y eso ha permitido identificar las relaciones que guardan a diferentes niveles estructurales con su variedad de participaciones fisiológicas en las plantas, tales como lignificación, el entrecruzamiento de polímeros en la pared celular y la resistencia a la infección por organismos patógenos^{20,21}.

Además, las hemoperoxidasas de plantas han demostrado tener potencial aplicación biotecnológica en biosensores²⁹, en inmunoensayos³⁰, en procesos industriales como biorremediación y tratamiento de aguas residuales³¹ e incluso como agentes en el tratamiento de cáncer⁷. Sin embargo, sus usos comerciales se han visto limitados por su baja estabilidad en presencia de su sustrato natural, H_2O_2 ⁴. Si bien el H_2O_2 es indispensable para llevar a cabo la catálisis, la estabilidad de la enzima se ve disminuida cuando ésta es expuesta por un periodo de tiempo prolongado o en presencia de un exceso de este, ya que el sitio activo se ve afectado electrónicamente y/o estructuralmente, llevando a la inactivación o degradación de la proteína³². Esto ha llevado a la tarea de estudiar y racionalizar su comportamiento catalítico a través de la caracterización de los intermediarios involucrados en su ciclo de catálisis y proponer el mecanismo de la formación de estos intermediarios.

Mecanismo de reacción de las hemoperoxidasas

La relación entre los diferentes componentes de la estructura de las peroxidasas y su función puede ser estudiada en dos pasos: 1) la reacción con H_2O_2 y 2) la interacción con el sustrato reductor (RH), mismos pasos que son comprendidos por el mecanismo catalítico de la enzima como se muestra en la Figura 6⁹.

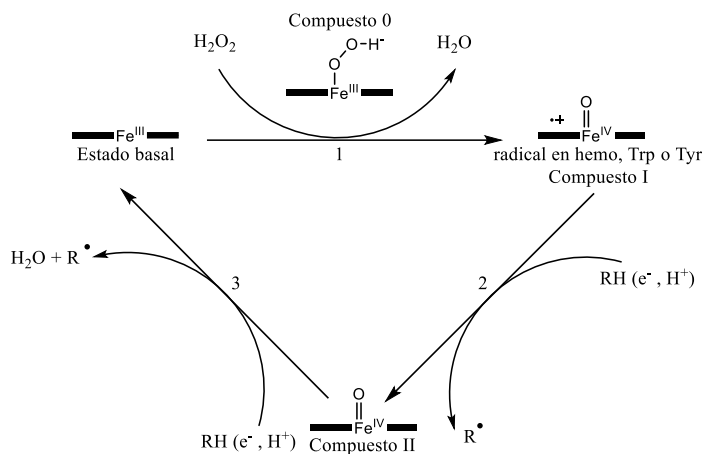


Figura 6. Mecanismo del ciclo catalítico de las hemoperoxidasas. (Adaptado de Veitch et al. 2004 y Hersleth et al. 2006)^{9,33}.

Compuestos I y II

En el primer paso del ciclo, la reacción del estado basal de la peroxidasa con H_2O_2 lleva a la formación de un intermediario de alto estado de oxidación, conocido como Compuesto I (CI), que se caracteriza por ser un centro oxoferrilporfirina de $\text{Fe}(\text{IV})$ con un radical catión, una especie paramagnética con un espectro característico en EPR⁶³. En el primero de los dos pasos subsecuentes la reducción en un electrón lleva a la formación del Compuesto II (CII) mientras que el sustrato reductor "RH" es oxidado a su producto radicalario "R•". El CII es también una especie oxoferril de $\text{Fe}(\text{IV})$; sin embargo, es diamagnética, es decir, es una especie inactiva o silenciosa en EPR. El segundo paso de reducción en un electrón completa el ciclo catalítico de las peroxidasas, una segunda molécula de sustrato reductor oxida al correspondiente producto radicalario, lo que lleva al restablecimiento del estado basal de la enzima^{9,12}.

La relación estructural entre los aminoácidos en la cavidad del grupo hemo que se han identificado como involucrados en la catálisis es altamente conservada en todas las peroxidasas de plantas de

clase III. Por ejemplo, en la peroxidasa de cacahuate se ha identificado que la His169 (histidina proximal) se encuentra directamente coordinada al átomo de hierro a través del átomo de nitrógeno de la cadena lateral Nε2 (Figura 6)¹².

En la región distal del plano del hemo los residuos identificados como conservados son Arg38, His42 y Asn70; la His42 se encuentra a una mayor distancia del átomo de hierro que la His169 en la región proximal, dejando así el sexto sitio de coordinación vacante y disponible para participar en la nueva coordinación de un ligante, por ejemplo, cianuro, azida, flúor, CO y NO (Figura 7). Estas observaciones han permitido identificar que la arquitectura del hemo en la que un hierro férrico de alto espín se encuentra coordinado a una histidina en la región proximal, y la presencia de los residuos histidina y arginina conservados en la región distal, es indispensable para la formación del Cl¹².

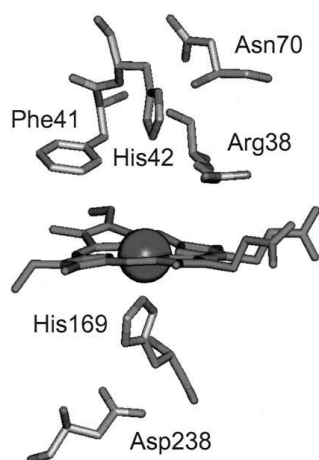


Figura 7. Residuos de aminoácidos en la cavidad hemo de una peroxidasa típica de plantas (peroxidasa de cacahuate). El hierro en el hemo (Fe(III) en el estado basal de la enzima) se muestra como una esfera y coordinado por la His169 (His170 en HRPC). El sexto sitio de coordinación en el plano distal del hemo está vacante. (tomado de Veitch et al. 2004)⁹.

El mecanismo para la catálisis de las hemoperoxidasas en el cual se ha asignado a la His y la Arg distales los papeles más importantes y específicos de la peroxidasa fue propuesto por Poulos y Kraut, basados en la estructura cristalográfica de la Citocromo *c* peroxidasa³⁴. Con este modelo se establecieron dos principios importantes en el mecanismo, en el primero, el átomo de nitrógeno Nε2 de la histidina distal actúa como aceptor de un protón proporcionado por el H₂O que se encuentra enlazado en el sexto sitio de coordinación del átomo de hierro y, el segundo, que la Arg participa en la estabilización de la carga cuando ocurre la formación del Cl. Dado que tanto la Arg

como la His distales son invariantes en todos las integrantes de la superfamilia de las peroxidasa de plantas, es posible sugerir que el mecanismo de las peroxidasa de clase III ocurre por esta vía.

La Figura 8 muestra la representación de cómo llevan a cabo su función los residuos presentes en la cavidad distal para formar el CI en HRPC, pudiendo observarse que el átomo de oxígeno en el ferril se encuentra enlazado a través de enlaces de hidrógeno al NεH de la Arg38 y a una molécula de agua que a su vez se está enlazada a la Arg38 y la His42, esta molécula de agua es formada por ruptura heterolítica en la unión del H₂O₂⁹.

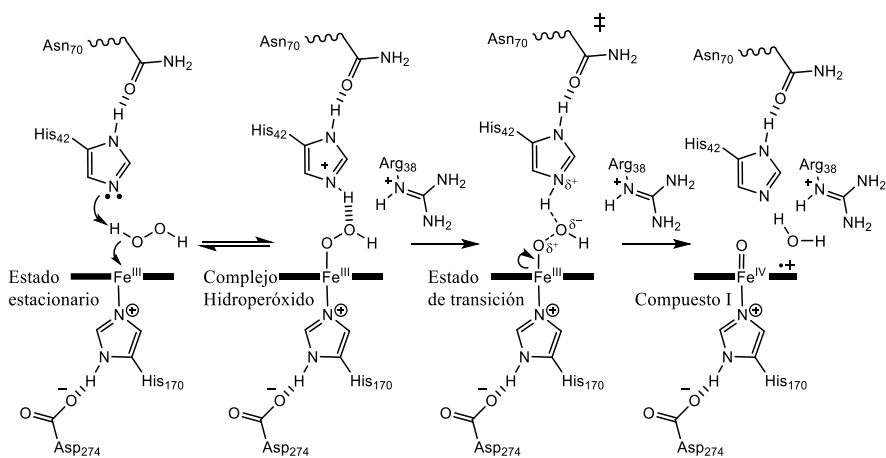


Figura 8. Formación del compuesto I de HRPC (Tomado de Veitch et al., 2004)⁹.

La reducción en un electrón del CI lleva a la formación un segundo intermediario, conocido como CII, oxidado en un electrón respecto a la hemoperoxidasa en estado férrico. Como se ha podido observar, la reducción del CI a CII y la reducción subsecuente del CII resulta en el regreso de la proteína o del radical de porfirina a su estado basal. La reducción en un electrón del CII al estado basal de la proteína involucra la reducción del hierro oxoferril a estado férrico, y también la reducción de un átomo de oxígeno a agua (Figura 9)³⁵.

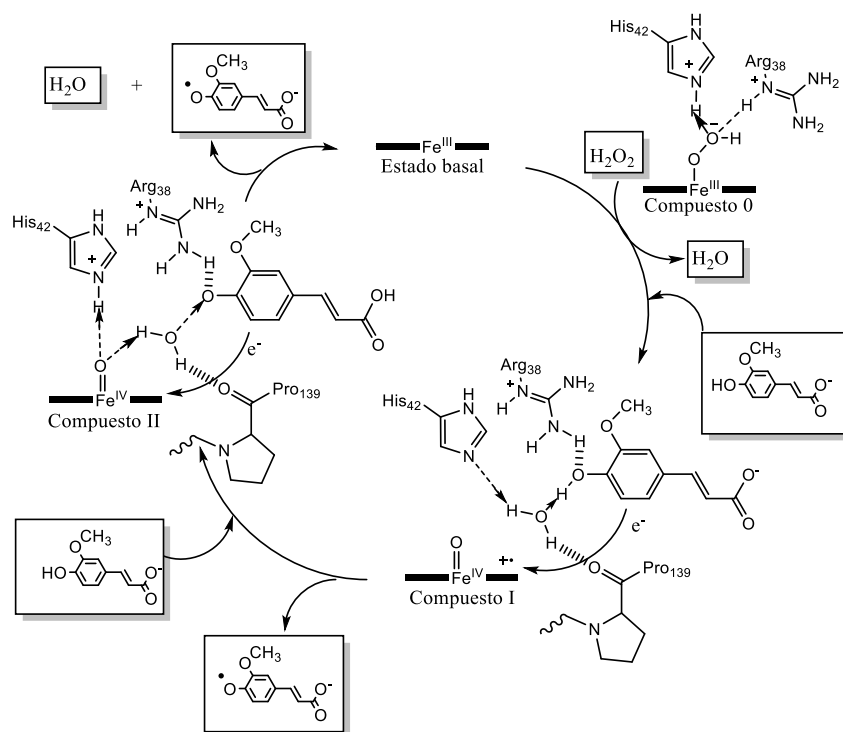


Figura 9. Mecanismo de reducción del compuesto I, compuesto II y oxidación del sustrato. En los recuadros se presentan los reactivos y productos de la catálisis. Las moléculas aromáticas que entran a la reacción son de sustrato reductor y las moléculas aromáticas de salida de la reacción son radicales del sustrato que posteriormente polimerizan y dan coloración a la reacción. (adaptado de Veitch et al., 2004 y Henriksen et al., 1999)^{9,36}.

Sustrato reductor

Las peroxidasas de plantas se describen como enzimas con una amplia especificidad de sustratos, ya que existe un número relativamente pequeño de restricciones para determinar su sustrato reductor (RH) dominado por el poder oxidante de CI y CII, además de la accesibilidad del sitio de interacción con el sustrato entre otros factores. Sin embargo, se han demostrado interacciones particularmente favorecidas con algunos sustratos^{9,13}.

Los dos pasos de reducción, para formar el CII a partir de CI y el estado basal a partir de CII requieren la participación de un sustrato reductor, los típicos ejemplos de sustratos reductores para las peroxidasas de plantas son aminas aromáticas, indoles, ácidos fenólicos, fenoles y azo-colorantes (Figura 9). El perfil de los productos de la reacción catalizada por peroxidasas es complejo debido a la formación de dímeros y oligómeros más grandes que a su vez pueden actuar como sustratos en la reacción⁹.

En la reacción de oxidación de moléculas de sustrato por peroxidasas la transferencia de electrones ocurre simultáneamente (Figura 9). El enlace de hidrógeno entre el NH₂ de la Arg38 y el oxígeno fenólico asiste la transferencia de un protón que va del fenol al oxígeno ferril o a la histidina distal. Para CI, el destino final del protón es la histidina distal. En el caso de la reducción del CII, la arginina distal asiste la transferencia del protón con un enlace de hidrógeno entre el oxígeno fenólico y una segunda molécula de sustrato. En este caso, el destino final del protón es el oxígeno del ferril y se transfiere un electrón al grupo hemo. La transferencia de ambos protones puede involucrar una molécula de agua, que se encuentra posicionada de manera equidistante entre la histidina del sitio activo y del oxígeno del ferril en el compuesto I y II³⁶.

Experimentos basados en la inactivación de la enzima han permitido determinar sitios potenciales para la oxidación del sustrato. Mediante la incubación de la peroxidasa con H₂O₂ y un agente reactivo (reductor) como fenilhidrazina o azida de sodio, los radicales libres que se generan reaccionan formando aductos hémicos que reflejan el ambiente local del sitio de interacción del sustrato⁹.

Compuesto III

En ausencia de sustrato reductor y en presencia de una alta concentración de H₂O₂, las hemoperoxidasas tienden a la inactivación en la cual el H₂O₂ convierte al CI en un compuesto muy reactivo, llamado compuesto III (CIII), que es un radical peroxil ferril Fe(III) porfirina y que puede seguir diferentes vías de oxidación o decaimiento^{4,37}.

El CIII de peroxidasas fue reportado por primera vez por Keilin y Mann en la reacción de HRP en presencia de exceso de H₂O₂³⁸. El CIII se ha sugerido histórica o clásicamente como una especie análoga a la oxihemoglobina y a la oximioglobina, ya que en todos los casos se encuentra un hierro hemo de bajo espín con una histidina ocupando la quinta posición de coordinación en la región proximal y una molécula de dioxígeno coordinando la sexta posición^{39,40}.

Caracterización de los intermediarios de las hemoperoxidasas

Todos los intermediarios del ciclo catalítico de las peroxidasas (estado basal, CI, CII y CIII) han sido caracterizados bioquímica, catalítica y espectroscópicamente, encontrándose propiedades

espectroscópicas muy particulares como su espectro de absorción⁴¹, de dicroísmo circular¹⁵, de espectroscopía paramagnética electrónica^{39,15}, y de espectroscopía Raman⁴² entre otras.

Espectroscopía de absorción

En el espectro de absorción, la característica principal de la estructura electrónica del grupo porfirina se encuentra en la región visible siendo la banda Soret la banda típica de este grupo en las hemoproteínas. La estructura electrónica de la porfirina se ve modificada cuando la configuración electrónica del hierro es alterada, lo que ocurre cuando se cambia el número o tipo de ligantes que ocupan la quinta y sexta posición en el átomo de hierro, de esta manera es posible hacer el seguimiento de cada una de las especies formadas durante las reacciones que ocurren en la catálisis en condiciones estequiométricamente controladas. Por ejemplo, el espectro del estado nativo de las peroxidasas de clase III presenta las siguientes características: la banda Soret centrada en ~403 nm, y dos bandas de menor intensidad con máximos en ~500 y ~630 nm que corresponden a transiciones d de menor energía que la banda Soret, también llamadas bandas α y β debido a que la densidad electrónica de la que provienen las transiciones se concentra en los C_α y C_β del anillo pirrólico. Estas bandas responden a la adición de H_2O_2 y/o de sustrato reductor permitiendo reconocer cambios en el número de coordinación y/o el estado de oxidación del centro metálico como indicador de la estructura electrónica de la porfirina^{41,15}.

Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica “EPR”

Para los sistemas biológicos que presentan uno o más electrones desapareados, la espectroscopía paramagnética electrónica proporciona información de la estructura electrónica y geométrica del sitio a partir de datos magnéticos como los valores de g, el acoplamiento hiperfino y parámetros de momentos cuadrupolares⁴³. El estado férrico de las hemoproteínas puede transitar entre estados de bajo espín ($S=1/2$) y alto espín ($S=3/2$ o $S=5/2$). La diferencia entre estados obedece a la teoría de campo-ligante y depende de la naturaleza de los ligantes axiales, un ejemplo sería, el estado nativo de la Zo peroxidasa (ZoPrx), que es una especie pentacoordinada con una His como quinto ligante en la posición proximal y el sexto sitio vacante, esta especie presenta un espectro en EPR a 5 K, pH 6.1 en amortiguador de fosfatos de sodio (BFS) señales características de alto espín ($S=5/2$) $g=6.03$ y 1.99 así como también pequeñas señales correspondientes a mezcla de espines ($3/2$ y $5/2$) $g=5.73$, 5.43 , 4.64 y 3.43 ^{32,44}, luego de la adición de un equivalente de H_2O_2 al estado nativo de la enzima se genera el CI, una especie formada en las mismas condiciones

experimentales y que es una especie hexacoordinada que presenta una coordinación por His en la región proximal y oxígeno en la sexta posición o región distal y que se caracteriza por un radical catión con un espectro de espín intermedio ($S=3/2$) y señales en $g=2.7$ y 1.99 . Los datos aquí presentados para la ZoPrx, son resultados obtenidos de mi trabajo de maestría³².

Espectroscopía Raman

La espectroscopia de Resonancia Raman proporciona información de las frecuencias vibracionales moleculares en la región del infrarrojo del espectro electromagnético (10^{12} - 10^{14} Hz). Se sintoniza mediante excitación láser cercana a una banda de absorción de la muestra, correspondiente a una transición electrónica. Ciertos modos vibracionales, acoplados a esa transición electrónica, exhiben un claro incremento en las señales respecto a todas las demás transiciones, reduciendo la complejidad del espectro, permitiendo ver sólo unos pocos modos vibracionales a la vez. Dado que las transiciones electrónicas resonantes están asociadas con el sitio activo, esta técnica ofrece una prueba de las características estructurales del mismo. Las hemoproteínas proporcionan información particular de las vibraciones de porfirina en el espectro de resonancia Raman en la región de alta frecuencia entre 1000 - 1800 nm^{42,45,46}, mismas que se pueden clasificar y analizar por sus propiedades de simetría, permitiendo conocer características del spin y los cambios de estado de oxidación en el grupo hemo. Estas últimas facilitan el registro de cambios estructurales por modificaciones en la unión de los ligantes o transferencia de electrones en la hemoproteína. Por ejemplo, las vibraciones de derivados de hemoproteínas con ligantes coordinados al hierro como los hidroxilados "OH" son principalmente reconocidos por vibraciones en la región de baja frecuencia 400 - 600 nm^{47,48,49}.

Los diferentes intermediarios formados por las hemoperoxidasas en su ciclo catalítico han sido caracterizados por espectroscopía Raman^{42,46,50}. En particular, el CIII ha sido poco estudiado. Sin embargo, se tiene registro de un espectro Raman del CIII de la HRP, en el que, excitado a 457.9 , 488.0 y 515.5 nm, se favorece un incremento en las bandas a frecuencias de 1506 , 1584 y 1639 cm⁻¹ que se relacionan con la presencia de oxígeno coordinado en la sexta posición del hemo y son atribuidas a la expansión del anillo de porfirina porque el átomo de hierro es empujado dentro del plano del macrociclo; sin embargo, no fue posible relacionar ninguna banda en la región de baja frecuencia con la coordinación del oxígeno al centro metálico^{15,51}.

Vías de decaimiento del Compuesto III

Se ha propuesto que el CIII formado por las hemoperoxidasas puede seguir tres vías de decaimiento, las cuales se ilustran en la Figura 10. La primera vía, muestra la inactivación debida al potencial de esta especie reactiva para oxidar el anillo de porfirina llevando a la destrucción del grupo hemo. En la segunda, se ilustra el decaimiento del CIII al estado basal después de la oxidación y listo para volver a iniciar el ciclo catalítico. La tercera, muestra la liberación espontánea de un radical hidropéroxido mediante el decaimiento unimolecular del CIII, aunque el grupo hemo no sufre ninguna alteración, los radicales formados en el decaimiento reaccionan con los aminoácidos de la cadena llevando a la oxidación de la proteína^{4,37}.

Anteriormente, las hemoperoxidasas conocidas habían mostrado una alta sensibilidad a la inactivación en presencia de H_2O_2 , lo que ha sido una limitante importante para sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Con anterioridad se han publicado diversos estudios de este fenómeno incluyendo la aplicación de la ingeniería de proteínas en la búsqueda de una mayor estabilidad¹⁵. Igualmente se ha realizado la búsqueda de nuevas fuentes de hemoperoxidasas con características más estables. A pesar de todos estos esfuerzos no se había logrado el diseño o purificación de una enzima con una estabilidad ante el H_2O_2 suficientemente alta para poder desarrollar todo su potencial.

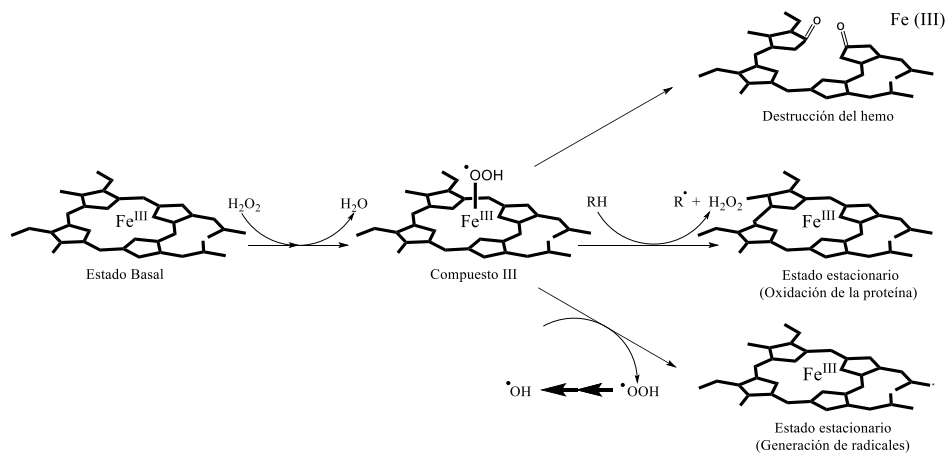


Figura 10. Mecanismo propuesto de inactivación por H_2O_2 de la Zo peroxidasa (tomado de Valderrama, et al., 2002)⁴.

Inactivación suicida en hemoperoxidasas

El proceso conocido como inactivación suicida ocurre de manera clásica y generalizada en las hemoperoxidasas^{4,52}. Se trata de la pérdida de actividad en presencia de uno de sus sustratos, H₂O₂ especialmente en ausencia de un sustrato reductor; sin embargo, el mecanismo por el que sucede dicha inactivación es complejo debido a las diferentes reacciones que pueden ocurrir luego de la reacción del hemo con H₂O, y hasta ahora, no ha sido completamente descrito⁴. Cómo ya se mencionó anteriormente, la exposición a H₂O₂ en ausencia de sustrato reductor lleva a la formación del CIII, descrita como una reacción parcialmente mediada por un radical superóxido libre y se considera clave en la inactivación de las peroxidasas. Así, tras la formación del CIII, una fracción de este compuesto decaerá en una especie inactiva por la liberación espontánea de radicales libres que oxidan la estructura proteica de la enzima⁴. Este mecanismo de reacción ha sido confirmado en otras hemoproteínas⁵³.

Bajo estas condiciones, existen modelos que pretenden resolver la cinética de inactivación de las peroxidasas. Por ejemplo, para la APX (ascorbato peroxidasa)⁵⁴, HRP⁵⁵ y la CEP (peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*)⁵² el modelo de inactivación es consistente con un comportamiento de cinética de saturación y son dependientes del tiempo y del pH. Con la intención de evitar la inactivación de las peroxidasas, se han empleado distintos métodos siendo el más sencillo incrementar la concentración de sustrato reductor, ya que se sabe que en presencia de este último el proceso de inactivación es controlado debido a la competencia entre el H₂O₂ y el sustrato reductor por los intermediarios formados por la enzima^{4,56}. Otras propuestas que buscan evitar el proceso de inactivación consisten en la adición de aminoácidos como histidina, tirosina y cisteína por su potencial para proteger a la peroxidasa del efecto de inactivación suicida causado por la presencia de H₂O₂ mediante la captura de radicales libres⁵⁷ o mediante la adición de iones metálicos como Ni²⁺ en concentraciones controladas⁵⁸. Otro factor que se ha identificado como importante es la presencia de glicosilaciones que han evidenciado su importancia para proteger a las enzimas de la inactivación suicida evitando la proteólisis^{52,55}.

ANTECEDENTES

En trabajos previos, se realizó la identificación, purificación y caracterización bioquímica de la enzima Zo Peroxidasa a partir de raíces de rábano japonés (*Raphanus sativus* variedad Daikon), la cual ha mostrado resistencia a la inactivación por H_2O_2 . La estabilidad oxidativa de la ZoPrx fue evidenciada por su cinética de inactivación a concentraciones catalíticas de H_2O_2 (1 mM) en ausencia de sustrato reductor. En estas condiciones, las ZoPrx mantuvo el 100 % de su actividad por 150 min., tiempo al cual la actividad de la hemoperoxidasa de referencia se perdió completamente (Figura 11)^{59,60}.

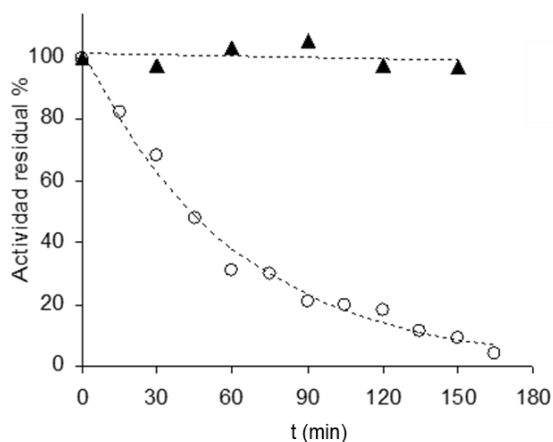


Figura 11. Cinética de inactivación de ZoPrx (Δ) y HRP2 (o) incubando con 1 mM de H_2O_2 en ausencia de sustrato reductor en amortiguador BFS pH 6.1, 60 mM⁴⁹. La gráfica muestra la inactivación de la HRP2 en el tiempo y la actividad constante de la ZoPrx durante al menos 150 min⁵⁹.

La estructura cristalográfica de la ZoPrx fue resuelta a 2.05 Å (PDB 6AS2), su representación tridimensional puede apreciarse en la Figura 12. La ZoPrx presenta un sitio activo típico de hemo peroxidasas de plantas o clase III, el cual, consta de un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX de Fe(III)), con dos regiones altamente conservadas, conocidas como región distal (caracterizada por la presencia de dos residuos de aminoácido His y Arg), esta es la región en la que se da la interacción del sustrato para la catálisis de la enzima y región proximal que presenta un residuo His conservado como quinto ligante del hierro. Presenta, además, dos iones calcio conservados, uno en la región distal y otro en la proximal, ambos heptacoordinados por átomos de oxígeno provenientes de los residuos de aminoácidos circundantes. Se pueden observar también las glicosilaciones, que son características de las peroxidasas. Para la ZoPrx se describen siete N-

glicosilaciones bien caracterizadas; estas cadenas de N-glicanos está compuesta por N-acetilglucosamina, fucosa, manosa y xilosa, aunque cada cadena es distinta en longitud y la posición de los azúcares varía²⁷. Este mismo tipo de glicosilaciones también han sido predichas en otras peroxidases de plantas como la HRP2⁶¹. Todas estas características identificadas en la ZoPrx son conservadas, es decir, se han identificado previamente en otras peroxidases de plantas, como se explica en la introducción de este trabajo, evidenciado que no existen diferencias estructurales sustanciales en el sitio activo de la ZoPrx respecto a las otras enzimas de plantas caracterizadas cristalográficamente.

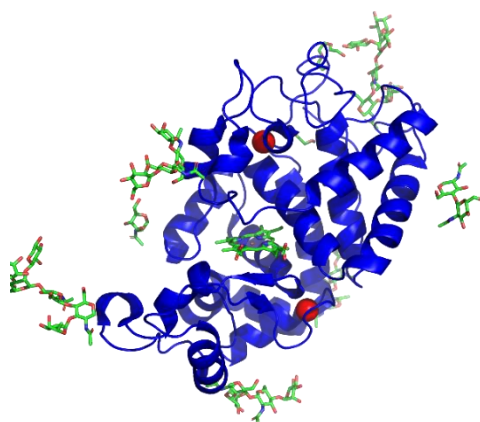


Figura 12. Estructura tridimensional de la ZoPrx (PDB 6AS2). En azul se presentan las hélices a que confirman a la proteína. En el centro de la figura se observa el grupo hemo. Las esferas en rojo representan los átomos de calcio, arriba el calcio distal y abajo el calcio proximal. En la periferia de la estructura se muestran en verde las moléculas que representan las glicosilaciones.

En un trabajo previo del grupo se realizó la caracterización de la ZoPrx por EPR³², la cual, en el estado basal, mostró un espectro típico de las peroxidases de clase III, presentando un Fe(III) de alto espín con señales en valores de $g=6.03$ y 1.99 (Figura 13)⁶². La señal en 4.64 pueden deberse a la presencia de la forma de espín cuántico mixto, estados férricos de alto espín (QM: $S=3/2$ y $S=5/2$)⁴⁴.

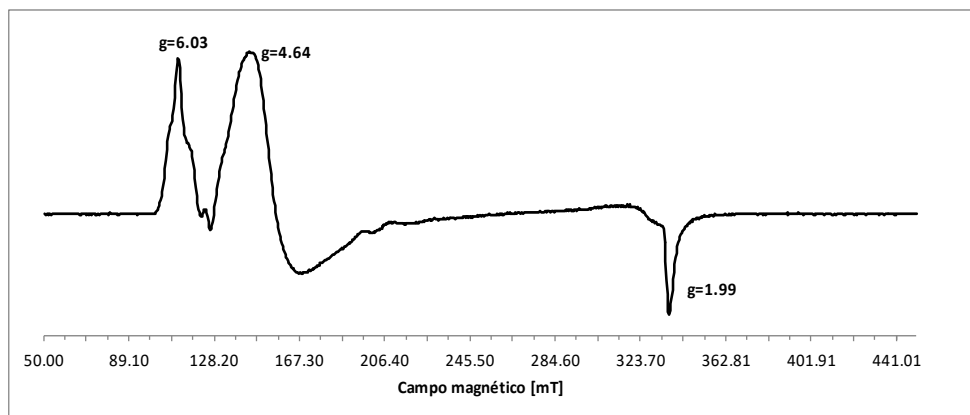


Figura 13. Espectro de EPR a 5 K de la ZoPrx, especie nativa. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz³².

Para el espectro de EPR del CI de la ZoPrx se obtuvieron valores típicos de g de un radical π catión a 2.7 y 1.99, señales características de este tipo de compuestos formados por peroxidasas de plantas⁶³ y que demuestran la conversión total del estado nativo a CI (Figura 14).

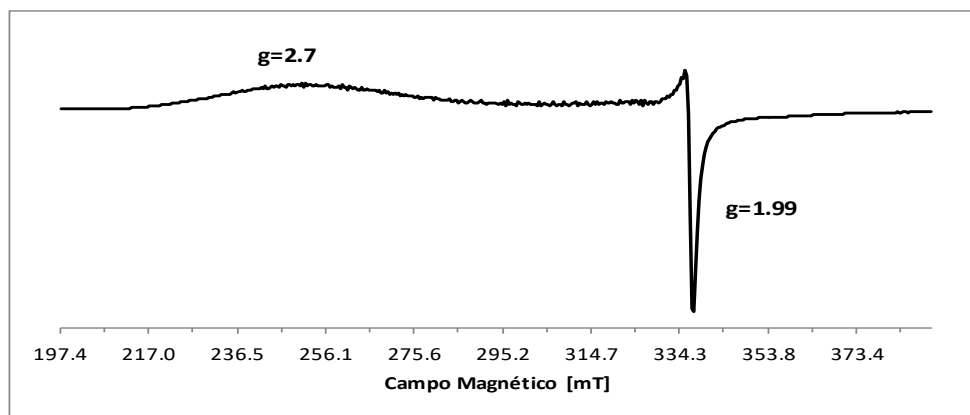


Figura 14. Espectro de EPR a 4 K del compuesto I formado en la reacción 1:8 ZoPrx:H₂O₂. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz³².

Como se mencionó previamente, en las hemoperoxidasas de clase III el CIII se ha descrito como un compuesto no activo en EPR, una especie “diamagnética” posiblemente debido al equilibrio teórico sugerido en la literatura para esta especie, mismo que se presenta entre la especie oxihemo, que es descrita como un átomo de oxígeno de una molécula de dioxígeno enlazado a un hierro de bajo espín (Fe(II)-O₂) y un radical superóxido antiferromagnéticamente acoplado a un hierro de bajo espín (Fe(III)-O₂•⁻)^{15,64}.

Uno de los resultados más relevantes que obtuvimos en este trabajo previo fue la caracterización del CIII formado por la ZoPrx en condiciones de exceso de H_2O_2 ; con las que se esperaba, por ausencia de la señal, identificar la formación del mismo. Sin embargo, el espectro de este CIII en el espectro de EPR presenta señales con valores de $g=6$ y 2 que corresponden a Fe(III) de alto espín, lo que indica la restauración parcial del estado basal. Adicionalmente, se observó una señal con valor de $g=4.3$ que es típico de Fe libre, lo que sugiere la posibilidad de la desnaturalización parcial de la proteína ante el exceso de H_2O_2 . Por el tamaño de la señal en $g=2$, podría tratarse de un radical en solución (Figura 15)³². De particular importancia, las señales con valores de $g=2.57$, 2.18 y 1.85 son características de Fe(III) de bajo espín, incompatibles con el modelo aceptado a la fecha (Figura 15)⁶⁵

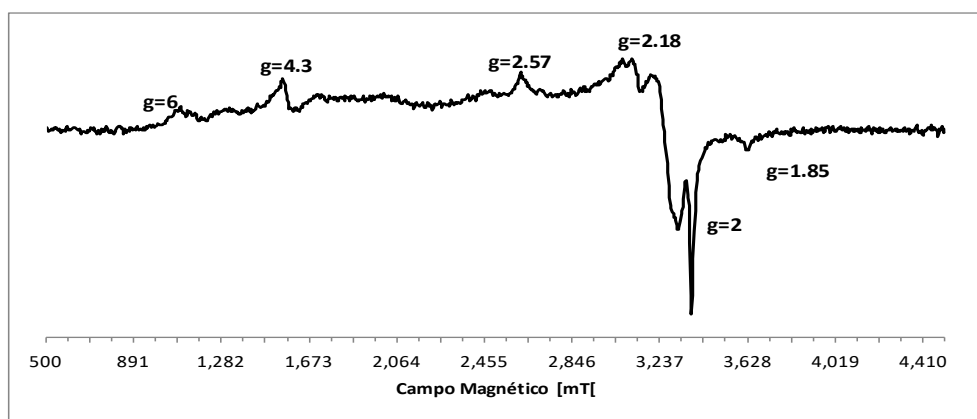


Figura 15. Espectro de EPR a 4 K en la reacción 1:10,000 ZoPrx: H_2O_2 . El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz³².

El decaimiento del espectro del CIII de la ZoPrx después de 72 h de reposo evolucionó a señales consistentes con el estado basal ($g=6.2$ y 2) y una señal a $g=4.3$ asignada a hierro en solución (Figura 16)³² aunque no en la misma proporción. Esto es consistente con los datos obtenidos por el grupo en cuanto a su estabilidad y actividad residual, así como las señales espectroscópicas en UV-Vis, donde la recuperación es prácticamente completa^{59,60}.

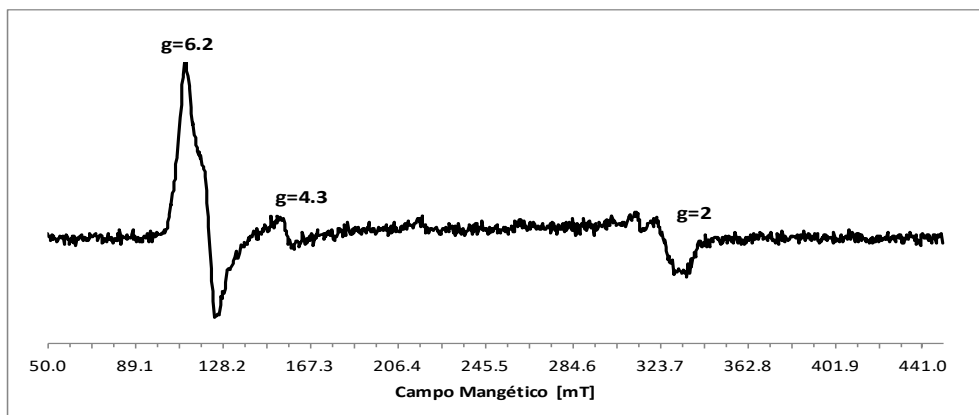


Figura 16. Espectro a 18 K de la ZoPrx en presencia de H_2O_2 en relación 1:10,000 registrado después de 72 h. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz³².

El CIII formado por la ZoPrx, es particularmente interesante ya que, además de restablecer el estado basal de la proteína como una de sus vías de decaimiento, abre un panorama totalmente nuevo respecto a la estabilidad de las hemoperoxidasas. Estos resultados abrieron las perspectivas de nuestro trabajo y fueron la clave para el desarrollo del proyecto que se presenta en este escrito.

HIPÓTESIS

La caracterización estructural y electrónica del Compuesto III de las hemoperoxidasas permitirá replantear el modelo mecanístico de inactivación en presencia de H_2O_2 .

OBJETIVO

Identificar y caracterizar los cambios estructurales y/o electrónicos ocurridos en el sitio activo de la Zo peroxidasa antes y después de la exposición a H_2O_2 en exceso.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterización catalítica de los intermediarios formados por la ZoPrx relacionados con su ciclo catalítico (CI, CII y CIII) antes y después de la exposición a un exceso de H_2O_2 .
- Caracterización espectroscópica de los intermediarios formados por la ZoPrx relacionados con su ciclo catalítico (CI, CII y CIII) antes y después de la exposición a un exceso de H_2O_2 .
- Planteamiento de un modelo de mecanismo de reacción que incorpore toda la información generada en este proyecto y que sea consistente con la estequiometría y el balance redox de las reacciones individuales.

METODOLOGÍA

Purificación de ZoPrx

Se utilizaron lotes de 50 kg de nabo blanco también conocido como rábano japonés obtenidos de un mercado local; se mantuvieron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se procesaron con un extractor común para obtener aproximadamente 40 L de jugo. El extracto fue equilibrado con la adición de amortiguador de fosfato de sodio (BFS) 1 M pH 6.1 para ajustar el pH a 6.1 y a una concentración final de 10 mM de fosfato de sodio. El mismo día se centrifugó el jugo en línea a 14,000 g por 20 min y se concentró el sobrenadante por ultrafiltración usando una celda Amicón con membrana de 100 kDa. El concentrado, luego de este paso, se centrifugó en lote por periodos de 20 min a 10,000 rpm y se continuó la concentración en una celda Amicón con una celda de 10 kDa hasta un aproximado de un litro de líquido.

Con este concentrado se inició la purificación por cromatografía en tres pasos usando primero la matriz de intercambio catiónico fuerte Macro-Prep High S (Bio-Rad). La columna se preparó y empacó con NaCl 1 M en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y posteriormente fue lavada para remover el NaCl y equilibrar a pH constante con amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, a continuación, se inyectó el extracto con un flujo de 2 mL/min. Una vez eluido todo el extracto se lavó la columna con amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 hasta recuperar todo lo que no se retuvo y que contiene a la ZoPrx. Como paso final de esta etapa de purificación, la fracción retenida en la columna fue recuperada con NaCl 1 M en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1. A ambas fracciones se les realizó evaluación de actividad y estabilidad oxidativa para comprobar que la ZoPrx se encontrara en la fracción no retenida.

En el segundo paso de la cromatografía, la fracción no retenida en la columna del primer paso se cargó en una matriz de intercambio aniónico fuerte Macro-Prep High Q (Bio-Rad) previamente empacada con NaCl 1 M en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y lavada para remover el NaCl, hasta equilibrar con amortiguador BFS 10 mM pH 6.1. Se obtuvieron dos fracciones, la primera no se retuvo por la columna que contenía a la ZoPrx y otra que sí se retuvo. La fracción que fue retenida se recuperó eluyendo con NaCl 1 M en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1. De la misma manera que el paso anterior, se realizaron ensayos de actividad y estabilidad oxidativa de ambas fracciones para corroborar la presencia de la ZoPrx en la fracción no retenida.

La fracción no retenida en el segundo paso de la cromatografía se concentró en una celda Amicón con una membrana de corte de 10 kDa con presión de 1.5 Psi (libra-fuerza por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés), para posteriormente dializarla contra 10 volúmenes de amortiguador de acetatos 20 mM pH 4.5 a 4 °C durante la noche. Al día siguiente se hizo un cambio de amortiguador de acetatos 20 mM pH 4.5 y se dejó dializar un día más. El volumen recuperado de la diálisis se cargó en una matriz de intercambio aniónico débil Macro-Prep CM (Bio-Rad) previamente empacada con NaCl 1 M en amortiguador de acetatos 20 mM pH 4.5 y equilibrada con el mismo amortiguador sin NaCl con un flujo de 2 mL/min. La fracción retenida en la columna fue eluida con NaCl 1 M en amortiguador de acetatos 20 mM pH 4.5 y ambas fracciones se les realizó ensayos estabilidad oxidativa.

La fracción que no se retuvo en la resina y que contenía a la ZoPrx se colectó y se dializó durante la noche contra 10 volúmenes de amortiguador BFS 100 mM pH 6.1 y se concentró en una celda Amicón con membrana de corte de 10 kDa. Posteriormente, se llevó a saturación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y a continuación se cargó a una matriz de interacción hidrofóbica Macro-Prep t-Butil HIC (Bio-Rad) equilibrada con una solución de sulfato de amonio 3 M en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1. La preparación se eluyó con un gradiente lineal descendiente de la misma sal de amonio de 3 a 0 M. Las fracciones que contenían a la ZoPrx se colectaron y se dializaron contra 10 volúmenes de amortiguador BFS 100 mM pH 6.1 para posteriormente concentrarse en Amicón con una membrana de corte de 10 kDa. La fracción concentrada fue cargada en una columna de permeación en gel Sephadex G-75 (GE) previamente equilibrada con amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 preparado en agua tetra destilada; la fracción fue eluida con el mismo amortiguador y concentrada en centricones con membranas de corte de 30 kDa.

La identificación de la actividad de peroxidasa durante la purificación se realizó mediante el monitoreo de la de oxidación de guayacol (*o*-Metoxifenol) 16 mM ($\epsilon_{470}=26.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) como sustrato, dependiente de H₂O₂ 10 mM en 1 mL de amortiguador BFS 60 mM pH 6.1. Para seleccionar las fracciones con mayor estabilidad al H₂O₂ las cuales indicaban la presencia de la ZoPrx, se incubaron alícuotas de las fracciones recuperadas de los diferentes pasos durante 1.5 h en presencia de 10 mM H₂O₂ y se determinó la actividad residual usando guayacol 16 mM como sustrato reductor en amortiguador BFS 60 mM pH 6.1. Solamente aquellas fracciones con actividad de oxidación de guayacol resistentes a la incubación a exceso de H₂O₂ fueron colectadas para el procesamiento posterior.

Para determinar la pureza de la fracción final se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con azul de Coomassie y revelados en un fotodocumentador Bio-Rad.

Estabilidad de ZoPrx ante H₂O₂

La estabilidad de las diferentes preparaciones de ZoPrx ante H₂O₂ se evaluó mediante el seguimiento de la cinética de inactivación en una mezcla de reacción con ZoPrx pura (4.2x10⁻⁵ M) y H₂O₂ 10 mM y amortiguador BFS 60 mM pH 6.1 en un volumen final de 1 mL. Se tomaron alícuotas de la mezcla a tiempos determinados y se estimó su actividad residual mediante la determinación de la velocidad inicial de oxidación de guayacol 16 mM en amortiguador BFS 60 mM pH 6.1 dependiente de H₂O₂ 10 mM en un volumen final de 1 mL.

Cuantificación de ZoPrx

La concentración de la proteína pura fue estimada por dos métodos complementarios. Por un lado, se utilizó el método Bradford con el reactivo Bradford 5X (Bio-rad), H₂O mili-Q (MQ) y una dilución de proteína 1:500 (en H₂O). Las mediciones fueron realizadas en una celda desechable de 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro a 595 nm (UV Lambda 900 Perkin Elmer Instruments utilizando el software UV WinLab L800/L900 Ver 3.00.03). El blanco para esta determinación fue preparado con 200 µL de Bradford más 800 µL de H₂O MQ. Las muestras se prepararon por triplicado con 200 µL de Bradford, 100 µL de la dilución de proteína y 700 µL de H₂O MQ. La cuantificación se realizó contra una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina entre 0.1 y 0.9 µg/mL, con una pendiente de 0.0651 y un índice de correlación lineal de R=0.99693.

Por otro lado, se aprovechó la banda Soret característica de las hemoperoxidasas a partir de la ecuación de Lambert-Beer $c = \frac{A}{\epsilon l}$ y el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{403}=109.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se diluyó una alícuota de la proteína pura en una celda de 1 cm hasta alcanzar un valor máximo de aproximadamente 1 UAbs; el espectro de absorción se generó realizando un barrido de longitudes de onda de 250-650 nm, del que se extrajo el valor de la absorbancia a 403 nm. Los resultados obtenidos por ambos métodos fueron del mismo orden de magnitud.

Determinaciones de actividad enzimática mediante espectroscopía UV-Visible

Los experimentos de actividad enzimática fueron realizados en un espectrofotómetro UV-Visible doble haz (UV Lambda 900 Perkin Elmer Instruments utilizando el software UV WinLab L800/L900 Ver 3.00.03), a temperatura ambiente en celdas desechables de 1mL (BioRad). Los espectros fueron obtenidos mediante barridos de longitud de onda de 250 a 650 nm. Todas las reacciones se realizaron en 1 mL de volumen final. Los equivalentes de H_2O_2 y de sustrato reductor (Guayacol) utilizados en los ciclos catalíticos fueron calculados y ajustados a partir de la concentración particular de enzima en cada experimento. Para esto, se utilizó amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 excepto para los experimentos de hidroxilación de la enzima en los que se utilizó amortiguador BFS 10 mM pH 12.

Seguimiento de los ciclos catalíticos de la ZoPrx

Se llevaron a cabo tres ciclos catalíticos de la ZoPrx con la titulación previa de la enzima $5 \mu M$ con H_2O_2 y/o guayacol como sustrato reductor. Cada paso del ciclo fue llevado a cabo agregando un equivalente de H_2O_2 para la formación de CI, 1 equivalente de guayacol para CII y 1 equivalente más de sustrato reductor para reestablecer el estado basal de la enzima. Cada vez que se completó un ciclo la reacción fue lavada tres veces por centrifugación en centricones con una membrana de corte de 10 kDa con un mililitro de amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 cada vez.

Seguimiento de los ciclos catalíticos del estado basal regenerado de la ZoPrx

Una vez caracterizados tres ciclos completos a partir del estado nativo de la proteína se llevó a cabo la incubación de la misma muestra de enzima en presencia de 1 mM de H_2O_2 (condiciones de exceso de H_2O_2) a temperatura ambiente y por 24 h. La formación del CIII fue comprobada por la banda característica del mismo que se observa a 417 nm y posteriormente se comprobó el restablecimiento del estado basal luego de 24 h (producto del decaimiento del CIII). Una vez obtenido el estado basal la reacción fue lavada por centrifugación como se describió en el apartado anterior.

Luego de recuperar la muestra ya sin H_2O_2 se llevaron a cabo tres ciclos también con adición de equivalentes de H_2O_2 y/o guayacol previamente determinadas. Fue necesario ajustar las cantidades en equivalentes para la formación de los intermediarios, siendo suficientes 0.75

equivalentes de H_2O_2 para Cl, 0.75 equivalente molares de sustrato reductor para la formación de CII y restablecimiento del estado basal respectivamente.

Extracción de Hemoglobina

Se extrajeron aproximadamente 10 mL de sangre total humana de un voluntario en tubos de uso clínico para muestras de sangre (con EDTA como anticoagulante). En dos tubos falcón nuevos, se colocaron 5 mL de sangre en cada uno y se llevaron a 15 mL de volumen total con solución salina comercial (0.9 % de NaCl); se lavaron por centrifugación en una centrifuga de columpio a 3,000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, el sobrenadante que contiene plasma sanguíneo, plaquetas, entre otros, se separó por decantación.

El volumen en los tubos se volvió a llevar a 15 mL con solución salina y se homogenizó mezclando lentamente para no romper las células antes de centrifugar por 20 min a 3,000 rpm. Este paso se repitió una vez más. Luego de los tres lavados con solución salina, se agregó 1 volumen (5 mL) de agua tetradestilada para lisar las células y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas. Posteriormente, se descongelaron y centrifugaron a 10,000 rpm por 30 min para separar los residuos celulares. El sobrenadante se recuperó en un tubo falcón y se mantuvo en frío hasta la purificación. Todos los residuos derivados del trabajo con sangre se trataron con hipoclorito de sodio por 20 min antes de desecharse en la tarja.

El protocolo de purificación de hemoglobina (Hb) fue adaptado de diferentes métodos de extracción de glóbulos rojos y purificación de Hb^{66,67}.

Purificación de Hemoglobina

Se preparó una columna con aproximadamente 30 mL de la matriz de intercambio aniónico fuerte ESHMUNO S de Merck empacada usando dos volúmenes de agua MQ, dos volúmenes de NaCl 1 M en amortiguador BFS 10 mM pH 5.6 y equilibrada con amortiguador BFS 10 mM pH 5.6 hasta alcanzar el pH del amortiguador (aproximadamente 4 volúmenes).

La hemoglobina extraída de la sangre total se diluyó en amortiguador de elución BFS 10 mM pH 5.6 en una relación 1:1 y se cargó en la columna. La proteína fue eluida con un gradiente de pH de 5.6 a 8.6 en amortiguador BFS 10 mM (aproximadamente 6 volúmenes). Las fracciones colectadas

fueron analizadas en un gel nativo de acrilamida al 12 % para determinar la pureza de las mismas. Las fracciones que presentaban solo una banda de ~64 kDa en el gel se reunieron y concentraron en un centrifugado de 10 kDa a 4,000 rpm y 4 °C.

Cuantificación de Hemoglobina

La concentración de la Hemoglobina fue estimada con la ecuación de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar a 403 nm⁶⁸ $\epsilon_{403 \text{ nm}} = 141 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a partir de su espectro de UV-Vis generado con un barrido de 250 a 650 nm en que se pudo observar la presencia de la banda Soret, característica de las hemoproteínas en 403 nm.

Generación de especies Hidroxiladas de ZoPrx, HRP2 y Hemoglobina

Para la formación de las especies hidroxiladas se lavaron alícuotas de ZoPrx y Hb con 5 volúmenes de amortiguador BFS 10 mM pH 12 por centrifugación en microconos de 10 kDa a 4,000 rpm y 4 °C. En el caso de la HRP2, la proteína fue lavada con 10 volúmenes de amortiguador BFS 10 mM pH 12 ya que se requería retirar la sal de sulfato de amonio contenida en el amortiguador de almacenamiento y ajustar el pH.

La especie hidroxilada de la hemoglobina se generó por autooxidación⁶⁹, incubando una fracción de la proteína pura a 37 °C por 7 días. Se hizo el seguimiento del cambio en el espectro de absorción periódicamente para detectar cambios importantes en las bandas.

Para la formación del CIII clásico en las hemoperoxidasas a partir de otras vías se diseñó el siguiente experimento. Una alícuota de HRP2 diluida en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 fue tratada con un exceso de ditionita de sodio para reducir el Fe(III) del estado nativo de la enzima a Fe(II). El decaimiento espontáneo de la especie de Fe(II) fue monitoreado hasta reestablecer la banda de la banda Soret característica del Fe(III) del estado nativo de la enzima. Posteriormente, una alícuota fresca de HRP2 fue tratada con ditionita de sodio en exceso y burbujeada con N₂ para desplazar el O₂ de la solución, a continuación, se burbujeó con O₂ hasta saturar la solución de O₂ e inmediatamente se determinó su espectro de UV-Vis buscando el desplazamiento de la banda Soret hacia 418 nm. Alternativamente, a una alícuota tratada en las mismas condiciones y burbujeada con N₂ se le adicionó H₂O₂ en exceso para ensayar una segunda vía de formación del CIII clásico, este experimento fue seguido también por UV-Vis.

Experimentos de espectroscopía Raman

Los experimentos de espectroscopía Raman se realizaron en el Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica “LUCE”, en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico “CCADET”, con el apoyo del Dr. José Manuel Saniger Blesa, la Dra. Selene Rubí Islas Sánchez y el Dr. Isidro Badillo.

Para los experimentos a 532 nm se utilizó un microscopio confocal AF acoplado a espectroscopía Raman con un láser de 532 nm. Los experimentos se realizaron en solución acuosa en una celda de cuarzo a temperatura ambiente utilizando diferentes concentraciones de proteína (Tabla 1). Las reacciones se realizaron con un volumen de 40 μ L de enzima en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 con una relación molar 1:1,000 de H_2O_2 cuando procede, excepto las muestras HSPA2-OH, Hb-OH y ZoPrx-OH que fueron diluidas en amortiguador BFS 10 mM pH 12. La HSPA2 fue previamente lavada por centrifugación en microconos de 10 kDa a 4,000 rpm y 4 °C con 10 volúmenes de amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 para para remover el sulfato de amonio que contiene el amortiguador de almacenamiento.

Tabla 1. Condiciones experimentales de las muestras caracterizadas por Raman confocal AF a 532 nm.

Muestra	Proteína (mM)	Reacción con H_2O_2	pH
HRPA2	0.25	-	6.1
ZoPrx	0.42	-	6.1
CIII HRPA2	0.25	1:1,000	6.1
CIII ZoPrx	0.42	1:1,000	6.1
Hb	1.80	-	6.1
Hb-OH autooxidación	0.60	-	6.1
HRPA2-OH	0.25	-	12
Hb-OH	0.60	-	12
ZoPrx-OH	0.42	.	12

Adicionalmente, algunas de las condiciones experimentales de la Tabla 1 se ensayaron en sólido (KBr) y se realizó también una primera ronda de experimentos a 405 nm considerando algunas de las condiciones experimentales antes mencionadas en el equipo Raman Dispersivo Trivista, así como a 532 nm en un equipo Raman dispersivo AlmegaXR, Thermo-Nicolet.

Para la segunda ronda de los experimentos a 405 nm se utilizó un espectrómetro micro-Raman TriVista 557 con láser de excitación de Kr⁺ de 405 nm. Las reacciones se llevaron a cabo en una celda de cuarzo plana con un volumen de gota de aproximadamente 20 μ L, todas las reacciones fueron llevadas a cabo en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y a temperatura ambiente. De la misma manera que para los experimentos a 532 nm, la HRP2 fue previamente lavada por centrifugación en microconos de 10 kDa a 4,000 rpm y 4 °C con 10 volúmenes de amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 para remover el sulfato de amonio que contiene el amortiguador de almacenamiento. Adicionalmente, se realizaron experimentos de marcaje isotópico con H₂O₂ cargado con ¹⁸O como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales de las muestras caracterizadas por Raman TriVista 557 a 405 nm.

Muestra	Proteína [mM]	Reacción con H ₂ O ₂ 0.6 M
ZoPrx	0.23	1:1,000
CIII ZoPrx	0.23	1:1,000
CIII ZoPrx ¹⁸ O	0.23	1:1,000
HRPA2	0.37	1:1,000
CIII HRPA2	0.37	1:1,000
CIII HRPA2 ¹⁸ O	0.37	1:1,000

RESULTADOS

Desarrollo de un protocolo optimizado para la obtención de ZoPrx pura

A partir de varios lotes de 50 kg de rábano japonés se obtuvieron aproximadamente 25 litros de jugo por cada lote. Mediante tres pasos de cromatografía de intercambio iónico, uno de interacción hidrofóbica y un refinado por permeación en gel, se obtuvieron 2.7 mg/mL de proteína pura ZoPrx, con una concentración de 0.42 mM, misma que presentó una estabilidad aproximada del 80 % de su actividad residual en presencia de 10 mM H₂O₂ utilizando guayacol 16 mM como agente reductor.

La ZoPrx presentó el espectro característico para hemoproteínas con un máximo a 403 nm banda Soret (Figura 17) y un valor Rz de 3 (relación entre el valor de absorbancia en la banda Soret y la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben las proteínas). Este valor es intrínseco de cada hemoperoxidasa y sirve como parámetro indicador para evaluar el grado de pureza de las proteínas, es decir, un valor de Rz igual o superior a 3 se traducen en un grado de pureza adecuado y aceptable. Esto fue corroborado por la presencia de una sola banda en un gel nativo de acrilamida al 12 %.

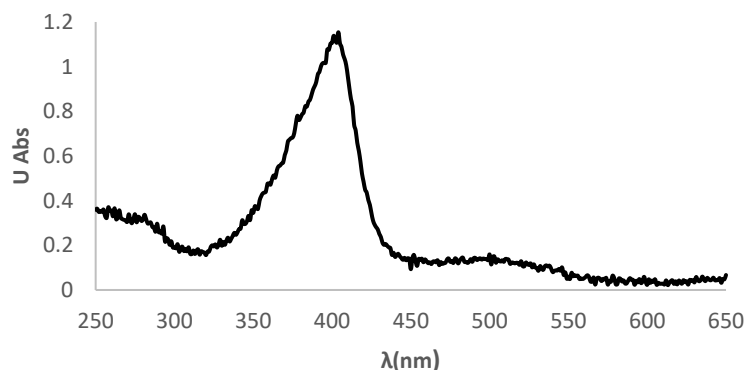


Figura 17. Espectro de absorción electrónica de la Zo Peroxidasa.

Determinación de los parámetros catalíticos de hemoperoxidasas

Uno de los métodos más utilizados para comprender el mecanismo catalítico de las enzimas es la determinación de la velocidad de reacción y la respuesta de ésta al variar los parámetros experimentales. Un factor clave que afecta la velocidad de reacción es la concentración de

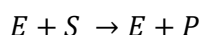
sustrato (S) presente. En 1903, Henri y Wurtz, propusieron la formación del complejo enzima-sustrato (ES) como paso necesario para la catálisis⁷⁰.

En 1913, basados en dos reacciones en las que interviene el complejo ES, que es la formación (un paso reversible de la reacción) y descomposición del mismo, Michaelis y Menten propusieron un modelo matemático que describe el comportamiento cinético válido para todas las enzimas en las que se vea involucrada sólo una molécula de sustrato (Ecuación 1)⁷⁰.



Ecuación 1. Formación-descomposición del complejo ES.

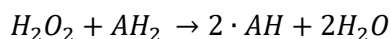
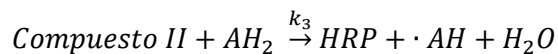
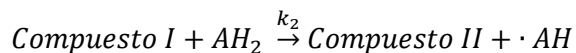
Sin embargo, existen enzimas que involucran más de un sustrato en su ciclo catalítico¹⁶ y que además no siguen un modelo cinético Michaelis-Menten, es decir, que durante la catálisis no se da la formación del complejo ES sino que la conversión del sustrato es llevada a producto en un sólo paso de manera irreversible (Ecuación 2).



Ecuación 2. Reacción de sustrato a producto sin formación de complejo ES.

Bajo este mecanismo conocido como de esfera externa, ocurre la transformación del sustrato por escisión de enlaces del mismo y por transferencia de electrones del centro metálico hacia el sustrato o del sustrato hacia metal, sin modificar la primera esfera de coordinación del ion metálico. Este proceso redox ocurre de manera cíclica en la metaloenzimas permitiéndoles actuar sobre otras moléculas de sustrato de manera continua. Además, la transferencia electrónica puede estar mediada por moléculas de disolvente y puede ser favorecida por la formación de enlaces de hidrógeno que estas mismas moléculas puedan proporcionar⁷¹.

Un ejemplo claro de enzimas que no forman el complejo ES y que utilizan más de un sustrato son las hemoperoxidasas; su ciclo catalítico está basado en tres reacciones como se muestra a continuación (Esquema 1):



Esquema 1. Productos formados en el ciclo catalítico de las peroxidasas.

La cinética de las peroxidasas muestra tres etapas irreversibles que involucra dos sustratos y dos productos. El modelo matemático de estado estacionario (Ecuación 3) es el que mejor describe la cinética observada de las peroxidasas¹⁶.

$$\frac{\vartheta}{2[E]_{tot}} = \frac{1}{\frac{1}{k_1[H_2O_2]} + \frac{k_2 + k_3}{k_2k_3[AH_2]}}$$

Ecuación 3. Modelo matemático de estado estacionario que describe el comportamiento cinético de las peroxidasas.

Siendo: ϑ la velocidad de reacción; $[E]_{tot}$ la concentración de enzima total; $[H_2O_2]$ la concentración de peróxido de hidrógeno; $[AH_2]$ la concentración de sustrato reductor; k_1 la constante de velocidad de formación del CI; k_2 la constante de velocidad de formación del CII y k_3 la constante de velocidad del restablecimiento del estado basal a partir de CII.

Considerando que la constante de velocidad de decaimiento del CI es un orden de magnitud mayor que la constante de velocidad de decaimiento del CII, entonces $k_2 \gg k_3$ y la ecuación puede ser rearmada y simplificada a la ecuación 4¹⁶.

$$\frac{2[E]_{tot}}{\vartheta} = \frac{1}{k_3[AH_2]} + \frac{1}{k_1[H_2O_2]}$$

Ecuación 4. Simplificación del modelo matemático de estado estacionario.

Así, la cinética de estado estacionario de las peroxidasas queda en función de las constantes k_1 y k_3 , la velocidad de formación del CI a partir del estado basal y el H_2O_2 , y la velocidad de reducción del CII para volver al estado basal por acción del sustrato reductor (RH), respectivamente¹⁶.

Considerando que el ciclo catalítico de peroxidasas se da en tres pasos y que ya ha sido posible determinar las constantes de velocidad de formación de los diferentes compuestos obtenidos durante la catálisis controlada estequiométricamente (CI y restablecimiento del estado basal)²⁹; de esta misma manera, se determinaron las constantes catalíticas k_1 y k_3 , antes y después de someter a la enzima a condiciones de exceso de H_2O_2 ¹⁴.

Determinación de las constantes de velocidad k_1 y k_3 del ciclo catalítico de la Zo Peroxidasa

Inicialmente se determinaron las velocidades de reacción de la formación de tetra-guayacol (el monómero, guayacol, es el sustrato reductor de la reacción) a partir de concentraciones conocidas de enzima control HRP2 y de la ZoPrx, 8.05×10^{-10} M y 5.32×10^{-9} M respectivamente en un volumen final de 1 mL de amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y concentraciones de H_2O_2 0.3 a 0.7 mM y de 3-8 mM de Guayacol (Cada una de las concentraciones de H_2O_2 se ensayaron con cada una de las concentraciones de guayacol). Así, cada una de las concentraciones de H_2O_2 se hicieron reaccionar con las diferentes concentraciones de guayacol, por triplicado y se registró el cambio en la absorbancia (dado por la formación de tetra-guayacol) durante 1 min, dando lugar a 90 reacciones para cada enzima.

Una vez obtenidas las velocidades, se aplicó la primera parte del modelo matemático en el que se graficó $\frac{1}{[AH_2]}$ vs $\frac{2[E]_{tot}}{v}$ y se hizo una regresión lineal para determinar así la constante de velocidad del decaimiento del CII al estado basal (k_3), definida como el inverso de la pendiente. Posteriormente, el valor de la ordenada al origen de la regresión lineal del paso anterior está relacionada con el modelo matemático de la siguiente forma:

$$b = \frac{1}{k_1[H_2O_2]}$$

Así, tomando los valores obtenidos para la ordenada al origen b como los valores de y en una nueva regresión lineal, se graficó $\frac{1}{[H_2O_2]}$ vs b , permitiendo así determinar la constante de formación del CI (k_1) definida también como el inverso de la pendiente de esta regresión.

Cálculo de velocidades iniciales a partir de datos experimentales

Inicialmente, se realizaron los experimentos de cada uno de los estados basales (nativos o regenerados) de las enzimas HRPA2 y ZoPrx, fijando una de las concentraciones de H_2O_2 (0.3-0.7 mM) y variando las concentraciones establecidas de guayacol (G; 3-8 mM) para llevar a cabo las reacciones. Cada una de estas reacciones se hizo por triplicado, de esta manera se obtuvieron las velocidades iniciales (v en la ecuación 3) de cada condición; los primeros valores de las velocidades iniciales se obtuvieron graficando la absorbancia de la muestra en función del tiempo, obteniéndose gráficas como la de la Figura 18 para cada una de las condiciones experimentales, en este caso, ésta corresponde a una de las condiciones de reacción del estado basal de la ZoPrx.

El método de velocidades iniciales involucra la suposición que, al inicio de la reacción, cuando hay suficiente sustrato para la reacción, la velocidad es constante y el cambio de absorbancia respecto al tiempo presenta un comportamiento lineal partiendo de cero; sin embargo, es importante puntualizar, en nuestro caso se produjo un retardo en la medición de la reacción debido a que los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro convencional, y tomó algunos segundos preparar el experimento antes de iniciar la medición en el espectrofotómetro, lo que se traduce en un error sistemático inherente del experimento. Por esta razón, todas las reacciones inician con una absorbancia diferente de cero. Este retardo en la medición de la absorbancia es constante en todos los experimentos y para cada grupo de datos cómo se observa en la Figura 18.

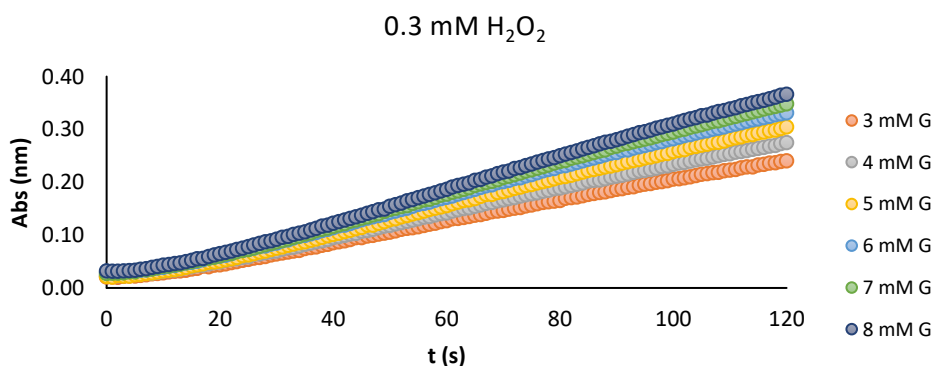


Figura 18. Representación gráfica de velocidades iniciales para una concentración de 5.32×10^{-9} M del estado basal nativo de la ZoPrx en presencia de 0.3 mM de H_2O_2 contra diferentes concentraciones de sustrato reductor Guayacol (3-8 mM).

Para calcular los parámetros del modelo teórico de estado estacionario (Ecuación 4), así como sus desviaciones estándar, se realizó una regresión lineal con método de ajuste por mínimos cuadrados ponderados.

Este modelo requiere la velocidad de reacción v en unidades $M \cdot s^{-1}$, mostrando el cambio de la concentración en el tiempo. Sin embargo, las velocidades calculadas en el paso anterior, a partir de los datos experimentales, muestran el cambio de absorbancia en el tiempo (v^*). Se utilizó la ecuación de Lambert-Beer para pasar los datos de unidades de absorbancia a unidades de concentración molar como se muestra en la Ecuación 5.

$$v = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\frac{\Delta Abs}{\epsilon \cdot l}}{\Delta t} = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \cdot l \cdot \Delta t} = \frac{v^*}{\epsilon \cdot l}$$

Ecuación 5. Ecuación empleada para la transformación de unidades a partir de absorbancia (ϵ = coeficiente de extinción molar y l = paso de luz a través del ancho de la celda).

Considerando que la absorbancia no tiene unidades, utilizamos el término relacionado a esta como U_{abs} ; para demostrar el paso de las unidades a $M \cdot s^{-1}$ se presenta el siguiente análisis de unidades de la Ecuación 5:

$$\left[\frac{M}{s} \right] = \frac{\left[\frac{U_{Abs}}{s} \right]}{\left[\frac{U_{Abs}}{M \cdot cm} \right] [cm]}$$

Cálculo de constantes cinéticas a partir de datos de velocidad inicial de reacción

Posteriormente, para el cálculo de las constantes k_1 y k_3 , y del error estándar de cada una de ellas se desarrolló un ajuste derivado también del método de mínimos cuadrados. Para esto se calcularon las constantes por separado, como describen la Ecuación 6 y la Ecuación 7, considerando todas las variables que involucra el modelo de estado estacionario de la Ecuación 3.

Inicialmente se calculó la k_3 utilizando una adaptación de la Ecuación 4, representándola como una ecuación lineal ($y = mx + b$) como se muestra en la Ecuación 6, en la que $y = \frac{2[E]_{tot}}{\vartheta}$, $m = \frac{1}{k_3}$ y

$x = \frac{1}{[AH_2]}$ y la ordenada es igual al segundo término de la Ecuación 4, representado por $b = \frac{1}{k_1[H_2O_2]}$.

$$\frac{2[E]_{tot}}{\vartheta} = \frac{1}{k_3} \frac{1}{[AH_2]} + b$$

Ecuación 6. Linealización del modelo de estado estacionario.

La representación de la ordenada (b) en la ecuación anterior, se puede presentar también como una ecuación lineal (Ecuación 7) en la que $y = b$, $m = \frac{1}{k_1}$ y $x = \frac{1}{[H_2O_2]}$; para esta ecuación existe un valor para la ordenada que se representa por b' que es un valor de ajuste y que no tiene implicación física. Empleando esta ecuación, fue posible determinar la k_1

$$b = \frac{1}{k_1} \frac{1}{[H_2O_2]} + b'$$

Ecuación 7. Linealización de la ordenada al origen (b) de la ecuación 6.

La representación gráfica de la Ecuación 6 y de la Ecuación 7 se muestra en la Figura 19 y la Figura 20 respectivamente, en la que los datos calculados se presentan como puntos y las líneas punteadas son de carácter didáctico para representar la tendencia lineal de los mismos.

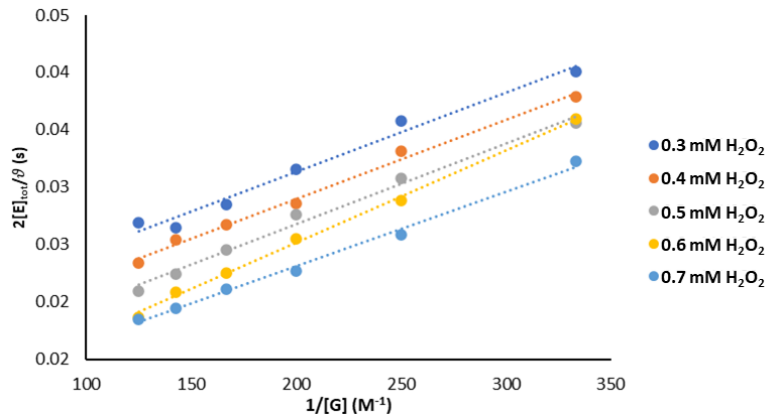


Figura 19. Representación gráfica de la Ecuación 6. Linealización del modelo de estado estacionario para la obtención de k_3 a partir de las velocidades calculadas para condición de H_2O_2 (0.3-0.7 mM).

Este mismo tratamiento de datos se hizo para cada uno de los estados basales de la HRP2 y del estado basal regenerado de la ZoPrx. Los valores para cada una de las constantes, así como sus desviaciones estándar se concentran en Tabla 3. Es importante mencionar que no se obtuvieron

valores para las constantes de un estado regenerado de la HRP2 ya que su incubación en exceso de H_2O_2 lleva a la inactivación de esta (Figura 11).

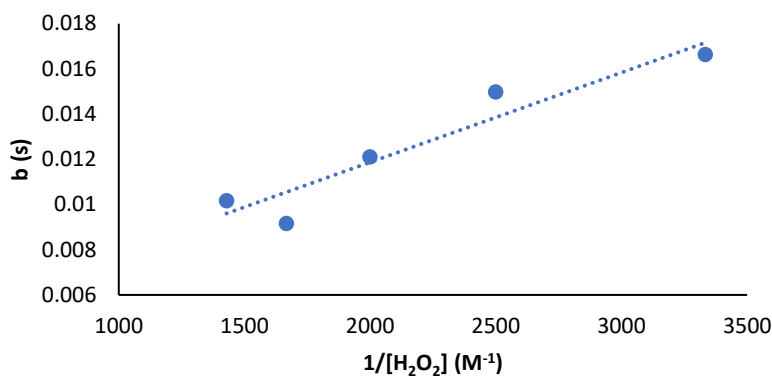


Figura 20. Representación gráfica de la Ecuación 7. Linealización de la ordenada de la Ecuación 6 para la obtención de k_1 a partir de los cálculos de k_3 .

Tanto para la ZoPrx, como para la HRP2, la constante de formación de CI (k_1) fue mayor que la constante de restablecimiento del estado basal a partir de CII (k_3). Cabe señalar que, en el caso de la ZoPrx, la diferencia entre estas dos constantes es un orden de magnitud y para la HRP2 existe una diferencia de dos órdenes de magnitud entre dichas constantes. Es decir, que la reducción del CII al estado basal para la HRP2 es mucho más rápido que para la ZoPrx, dejando de manifiesto que, para ambas enzimas, el paso limitante del ciclo catalítico es la regeneración del estado basal.

Luego de estas observaciones, es importante mencionar que aunque las constantes de velocidad k_1 y k_3 provenientes de estado basal nativo y del estado basal regenerado de la ZoPrx se encuentran en el mismo orden de magnitud, las diferencias podrían ser significativas (Tabla 3); sin embargo, es posible que estas diferencias se deban a la pérdida de la enzima durante el tratamiento experimental, como se muestra en la caracterización por UV-Vis en el apartado siguiente. Es probable que esta pérdida ocurra desde la incubación con H_2O_2 en exceso e incluso en los lavados posteriores a la incubación y previos al inicio de un nuevo ciclo catalítico. Tomando en cuenta estas consideraciones, podemos proponer que los estados basales tanto nativo como regenerado de la ZoPrx, así como los intermediarios involucrados en sus respectivos ciclos catalíticos, podrían ser indistintos entre sí.

Tabla 3. Datos cinéticos de la ZoPrx y HRPA2 usando Guayacol como sustrato a pH 6.1.

	Guayacol			
	k_1 ($M^{-1} s^{-1}$)	R^2	k_3 ($M^{-1} s^{-1}$)	R^2_{Prom}
Zo Prx _{nativo}	$2.50 \times 10^5 \pm 0.49 \times 10^5$	0.87	$1.39 \times 10^4 \pm 0.08 \times 10^4$	0.99
ZoPrx _{regenerado}	$0.98 \times 10^5 \pm 0.99 \times 10^4$	0.98	$0.85 \times 10^4 \pm 0.40 \times 10^3$	0.99
HRPA2	$1.16 \times 10^6 \pm 0.17 \times 10^6$	0.96	$6.4 \times 10^4 \pm 0.17 \times 10^4$	0.98

Luego de la determinación de los parámetros catalíticos obtenidos y la conclusión que estos representaron, se decidió caracterizar los intermediarios del ciclo catalítico por UV-Vis.

Caracterización de intermediarios catalíticos por espectroscopía UV-Visible

Los diferentes compuestos del ciclo catalítico de las peroxidasas fueron observables mediante el seguimiento del desplazamiento de la banda Soret como consecuencia de la adición de equivalentes de H_2O_2 o sustrato reductor dosificados estequiométricamente, es decir, partiendo del estado basal de la enzima una vez que se agregó un equivalente de H_2O_2 se forma el CI, con la adición subsecuente de un equivalente de sustrato reductor se obtuvo el CII y un equivalente más de sustrato reductor llevó al restablecimiento del estado basal. Adicionalmente, se ha podido observar la formación del espectro del CIII partiendo de estado nativo de la enzima después de su exposición a un exceso de H_2O_2 , así como su posterior decaimiento^{72,73}.

La formación de los diferentes compuestos de la ZoPrx pudo ser observada mediante sus características espectrales: la adición de un equivalente de H_2O_2 al estado basal provocó el desplazamiento de la banda Soret a 400 nm, así como su disminución. La adición subsecuente de un equivalente de sustrato reductor provocó el desplazamiento de la banda a 409 nm y su incremento de intensidad característicos de CII. La adición de un segundo equivalente de sustrato reductor llevó al completo restablecimiento del espectro del estado basal de la enzima (Figura 21A). La ampliación del espectro en la región de 450-550 nm permite observar en la especie nativa una banda centrada en 500 nm que desaparece durante la formación del CI, se observa un hombro en aproximadamente 520 nm para el CII y se restablece al volver al estado basal (500 nm) (Figura 21B).

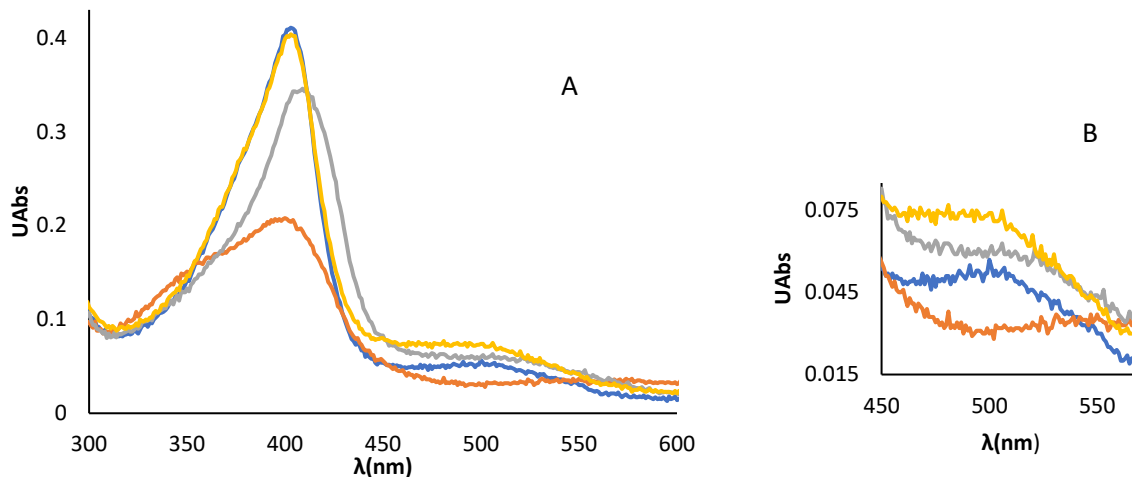


Figura 21. A) Ciclo catalítico de la ZoPrx: ZoPrx nativa (azul), CI (naranja), CII (gris) y estado basal regenerado (amarillo). B) acercamiento al intervalo 450-550 nm.

La formación y decaimiento del CIII de la ZoPrx se obtuvo mediante la incubación de la enzima en 1, 5 y 10 mM de H_2O_2 . En todos los casos, el registro inmediato del espectro después de la adición de H_2O_2 se caracterizó por una banda de menor absorbancia a 404 nm, es muy probable que se trate de CI, considerando que con un equivalente de H_2O_2 se forma CI y con más equivalentes de H_2O_2 CI forma al CIII. Inmediatamente después, la banda en 404 nm evoluciona a la banda característica del CIII a 417 nm, misma que decae lentamente en el transcurso de las siguientes cinco horas después de iniciada la incubación (Figura 22), cabe señalar que la proteína incubada en 1 mM de H_2O_2 regenera la intensidad de la banda en 403 nm característica del estado basal, mientras que las fracciones incubadas en 5 y 10 mM recuperan el 76 y 66 % respectivamente, lo que sugiere destrucción parcial del grupo hemo por oxidación.

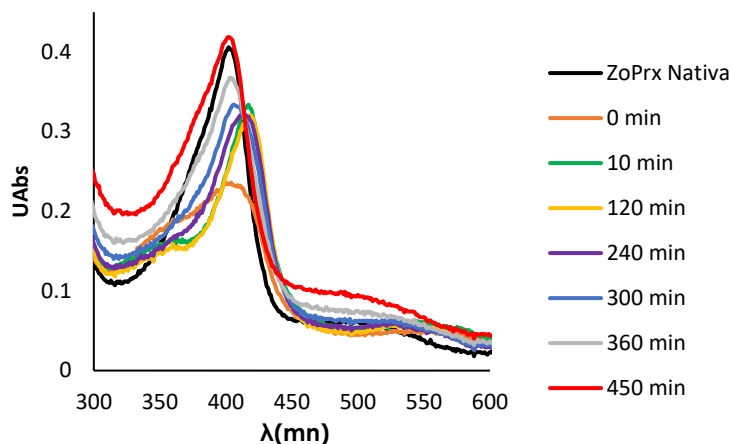


Figura 22. Seguimiento del decaimiento del CIII formado por la ZoPrx incubada en 1 mM de H₂O₂.

Luego del decaimiento y con el propósito de caracterizar los compuestos formados en el ciclo a partir de estado basal de la ZoPrx regenerado, la proteína fue lavada con amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y posteriormente se preparó la reacción para el seguimiento del ciclo de esta especie controlando los equivalentes de H₂O₂ y guayacol según sea el caso. De esta manera, luego de la adición de 1 equivalente de H₂O₂ se obtuvo la formación de CI con la disminución de la banda con un máximo en 404 nm, además de esta banda, se observa la aparición de un pequeño hombro en 371 nm. Luego de la adición del primer equivalente de guayacol, el espectro muestra un ligero desplazamiento hacia longitud de onda mayor aunque el máximo de la banda centrado en 406 nm y la adición del segundo equivalente de guayacol reestablece completamente la banda también centrada en 404 nm (Figura 23).

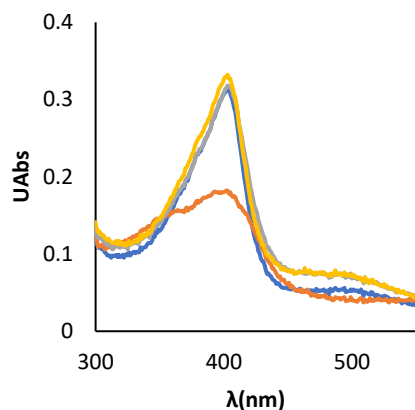


Figura 23. Ciclo catalítico de estado basal regenerado de la ZoPrx. Estado basal (azul), CI (naranja), CII (gris) y segundo estado basal regenerado (amarillo).

En la comparación del estado nativo de la ZoPrx y el estado basal regenerado luego de la incubación en presencia de exceso de H_2O_2 , se pueden observar una banda bastante conservada, es decir, la forma de la banda y prácticamente en mismo centro en 403 nm para la ZoPrx nativa y 404 nm para el estado basal regenerado (Figura 24, línea azul y línea naranja respectivamente). Adicionalmente se llevó a cabo una segunda ronda de exposición a H_2O_2 en exceso y la posterior identificación de sus intermediarios catalíticos. En este caso, se observa la recuperación de una banda Soret centrada a 404nm, muy parecida a las otras dos especies, pero con un perfil más ancho (Figura 24, línea verde).

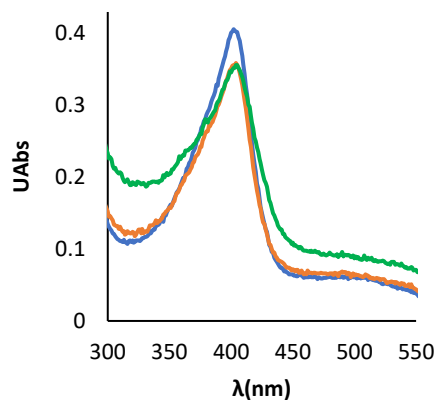


Figura 24. Comparación de estado basal nativo y estados basales regenerados de la ZoPrx. ZoPrx estado basal nativo (azul), estado basal regenerado (naranja) y segundo estado basal regenerado (verde).

En la comparación entre los compuestos formados por la ZoPrx antes y después de haber sido incubada en exceso de H_2O_2 podemos observar una ligera diferencia, pues el CI partiendo del estado basal nativo presenta una banda centrada en 400 nm con un ligero hombro en aproximadamente 360 nm, para CI partiendo del estado basal regenerado, el máximo de la banda se encuentra en 404 nm pero el hombro en 360 nm un poco más evidente (Figura 25).

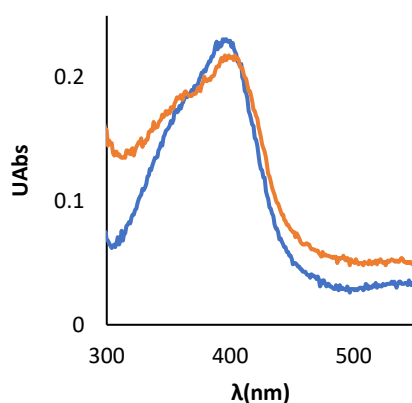


Figura 25. Comparación de los compuestos CI partiendo del estado basal nativo (azul) y CI partiendo el estado basal regenerado (naranja) de la ZoPrx.

Para el CII, la banda Soret se ha desplazado a 409 nm como una banda ancha, mientras que la banda del CII que proviene del estado basal regenerado presenta una banda centrada en 406 nm que también se observa más simétrica y delgada en comparación al CII proveniente del estado basal nativo (Figura 26).

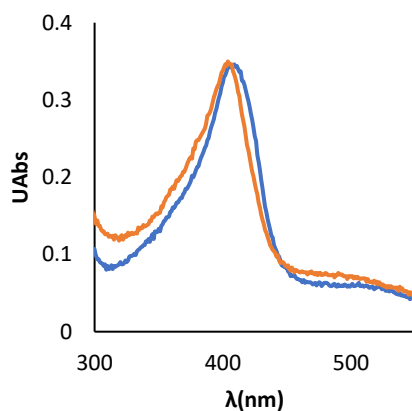


Figura 26. Comparación de los compuestos CII partiendo del estado basal nativo (azul) y CII proveniente del estado basal regenerado (naranja) de la ZoPrx.

Como es posible apreciar, a medida que las muestras se someten a un exceso de H_2O_2 el entorno proteico, tanto estructural como electrónico, puede verse comprometido por la presencia de especies altamente reactivas derivadas de la reacción con H_2O_2 . Esto sugiere ligeros cambios observables en los espectros de UV-Vis obtenidos para las mismas especies y en las mismas condiciones experimentales. Considerando que la diferencia principal son los estados basales de los que parten los ensayos, ya sea del estado basal nativo o del estado basal regenerado de la ZoPrx. Cabe señalar que a pesar de estos ligeros cambios observados en los espectros de UV-Vis el sitio activo de la enzima no se ve comprometido, esto considerando que la relación estequiométrica para la catálisis se conserva, al igual que se mantiene en buena medida su actividad enzimática, como se determinó anteriormente con los ensayos de cinética enzimática (Tabla 3).

Adicionalmente, una alícuota de proteína fue incubada en presencia de H_2O_2 1 mM, lavada y sometida a un segundo experimento de incubación en presencia de H_2O_2 1 mM (Figura 27). En estas condiciones se pudo observar que el CIII formado en la segunda incubación decae mucho más rápido que el CIII formado en la primera incubación, en un tiempo aproximado de 2-3 h el compuesto empieza a decaer, llegando al restablecimiento total del estado basal en aproximadamente 4-5 h. Esto, una vez más, evidencia que la incubación o incubaciones subsecuentes de la enzima en presencia de exceso de H_2O_2 afectan el entorno de esta lo que explica que, en general, las peroxidasas se vean afectadas estructural y/o electrónicamente lo que lleva a la inactivación de las mismas. En el caso de la ZoPrx este efecto es evidente como se explica aquí.

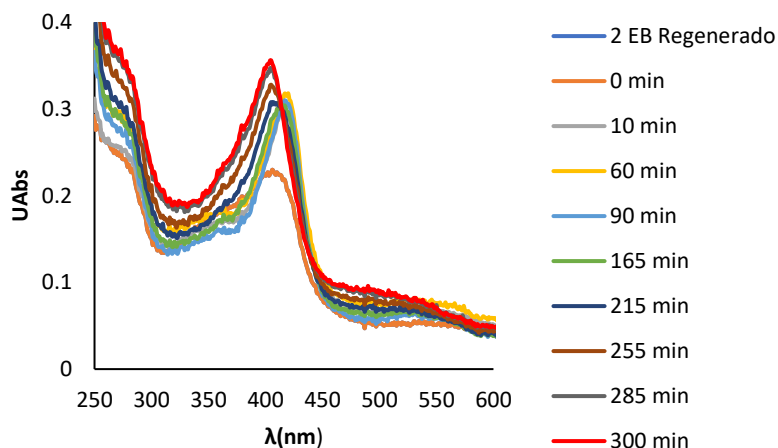


Figura 27. Seguimiento del decaimiento del CIII formado a partir de un segundo estado basal regenerado de la ZoPrx.

Las bandas del CIII proveniente del estado basal nativo y el CIII formado en la segunda incubación de la ZoPrx en exceso de H_2O_2 , comparten el desplazamiento y la forma, una banda principal centrada el 417 y 418 nm respectivamente, y dos bandas anchas en aproximadamente 360 nm y 545 nm (Figura 28). Cabe hacer la comparación con el CIII formado por la HRP2 que presenta una banda más en aproximadamente 580 nm, permitiendo observar que los tres compuestos formados, ya sea por la variación en el estado basal del que se parte el experimento o por la diferencia entre enzimas, no difieren significativamente en sus espectros de UV-Vis, es decir, parecería tratarse del mismo compuesto, independientemente de la enzima de que provienen.

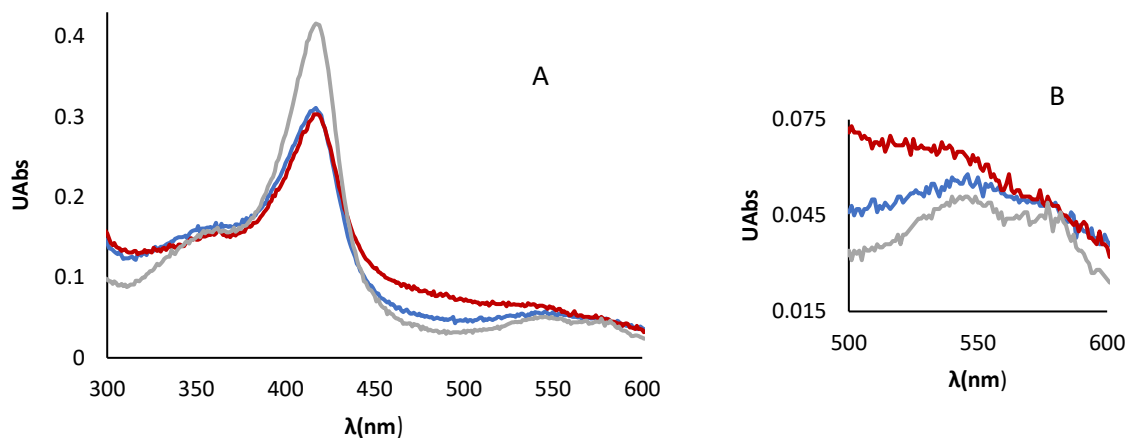


Figura 28. A) Comparación de los compuestos III. CIII partiendo del estado basal nativo de la ZoPrx (azul), CIII proveniente del estado basal regenerado de la ZoPrx (rojo) y CIII de la HRP2 (gris). B) acercamiento al intervalo 500-600 nm.

Cabe señalar que no es posible realizar un análisis comparativo de los intermediarios formados por la HRP2 de la misma manera que se realizó para la ZoPrx debido a que, como se ha mencionado anteriormente, la HRP2 cuando es incubada en presencia de H_2O_2 en exceso se inactiva totalmente, por lo que una vez obtenido el CIII no es posible regenerar su estado basal.

Hasta este punto, las evidencias de la espectroscopía UV-Vis en conjunto con las evidencias cinéticas y los resultados preliminares obtenidos por EPR documentados en los antecedentes de este trabajo (Figura 15 y Figura 16), nos permiten llegar a varias conclusiones. La primera es que tanto los estados basales (nativo o regenerado), así como los intermediarios podrían ser indistintos y/o equivalentes, al menos por estos métodos a pesar de las diferencias detectadas en cuanto a su estabilidad frente a la exposición o reexposición a H_2O_2 en exceso. Con la intención de agregar profundidad a la identificación de la especie conocida como CIII decidimos incorporar evidencias obtenidas mediante espectroscopía Raman.

Caracterización de la ZoPrx por espectroscopía Raman

Con el objetivo de caracterizar a mayor profundidad la especie producida por la exposición de las hemoperoxidasas ZoPrx y HRP2 a H_2O_2 en exceso, se realizaron varios experimentos en espectroscopía Raman. Una primera serie a 532 nm usando un microscopio confocal AF acoplado a espectroscopía Raman, algunas pruebas a 405 nm en un equipo Raman Dispersivo Trivista y otras

a 532 nm con el Raman dispersivo AlmegaXR, y una segunda serie a 405 nm en un equipo Raman Dispersivo Trivista bajo condiciones optimizadas. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente en solución acuosa (amortiguador BFS 10 mM pH 6.1) y los espectros aquí mostrados son un promedio de por lo menos tres experimentos realizados para cada condición.

Los resultados de la primera serie, realizada en el microscopio confocal AF acoplado a espectroscopía Raman con un láser a 532 nm con las especies nativas de las enzimas HRP A2 y ZoPrx, muestran la identidad del entorno de su grupo hemo al presentar un espectro con la misma forma y un corrimiento de las señales bastante consistente en la alta frecuencia (Figura 29), mismos que son consistentes con los ejemplos reportados en la literatura⁷⁴ (Figura 30).

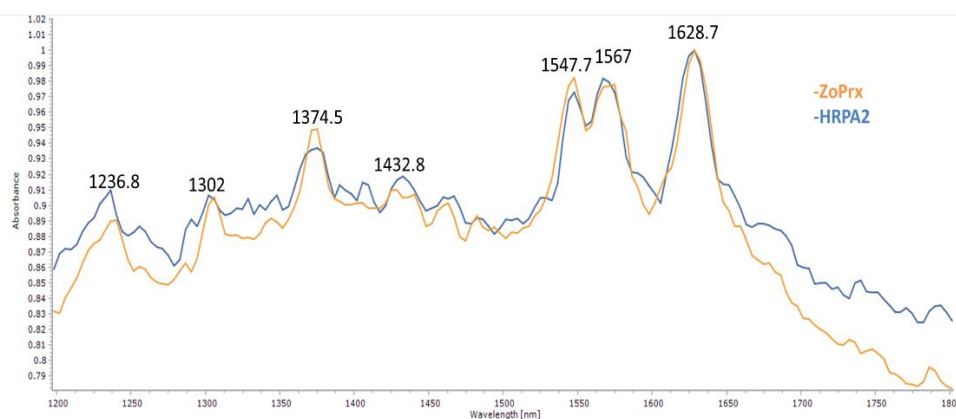


Figura 29. Espectro Raman del estado nativo de la HRP A2 (azul) y el estado nativo de la ZoPrx (naranja), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.

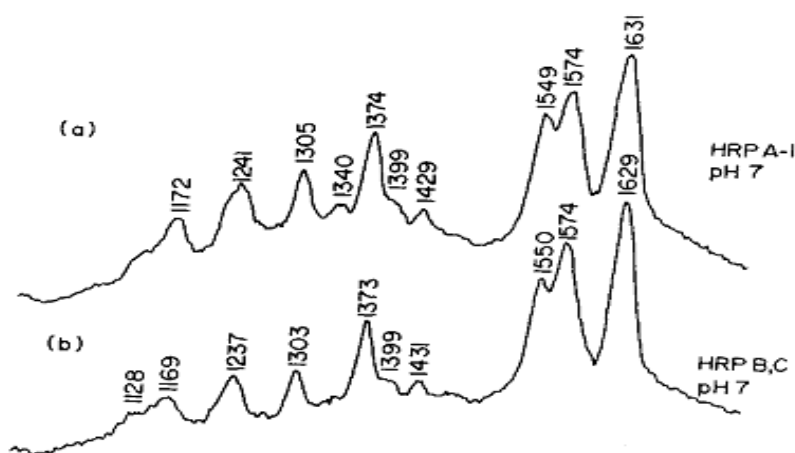


Figura 30. Espectro Raman de a) HRP A1, b) HRP B y HRP C 1 mM, obtenido a 530.9 nm, en amortiguador BFS 200 mM pH 7, temperatura ambiente⁷⁴.

Los espectros obtenidos para los CIII de la HRP2 y la ZoPrx presentan ligeras diferencias en la forma e intensidad, si bien el corrimiento de las señales es bastante parecido, la intensidad de las mismas es diferente. Por ejemplo, la banda en 1601 nm, que es evidente en el CIII de la ZoPrx, en comparación el CIII de la HRP2 es observada como un ligero hombro (Figura 31); esto podría deberse incluso a diferencia de concentraciones, así como diferencias estructurales en el entorno proteico.

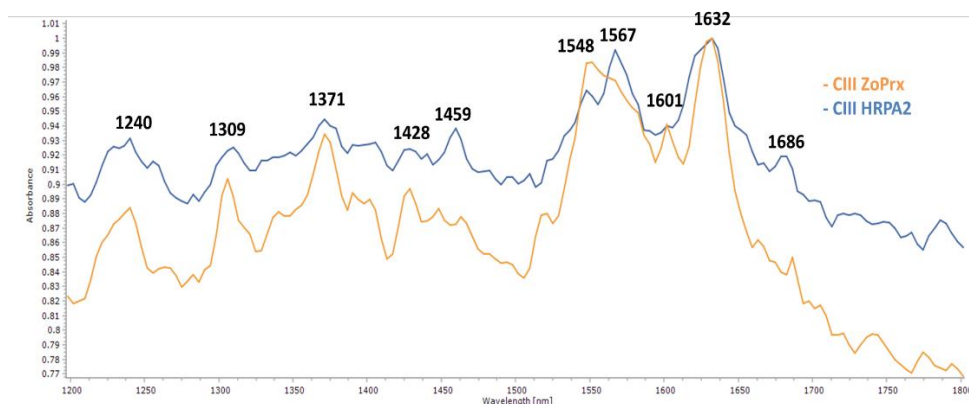


Figura 31. Espectro Raman del CIII de HRP2 (azul) y CIII ZoPrx (naranja) obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.

La comparación de estos espectros con el reportado por Zimmer en 1982⁵¹ para el CIII de una HRP (Figura 32), muestra poca coincidencia en la forma de las señales o en el corrimiento de las mismas, por lo que cabe señalar que las condiciones experimentales fueron distintas, las de experimento aquí mostrados fueron amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente y un láser de 532 nm y el realizado por Zimmer fue preparado en amortiguador BFS 10 mM pH 7.8 con 30 % metanol en la disolución de la muestra a 0 °C y con un láser de 514.5 nm.

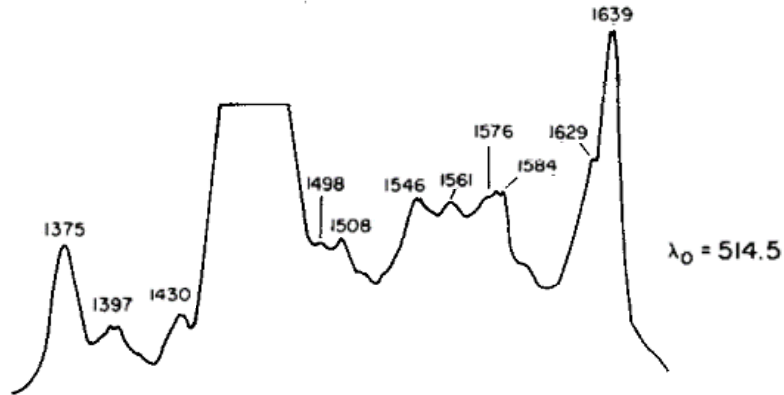


Figura 32. Espectro Raman del CIII de HRP 0.2 mM, obtenido a 514.5 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 7.8 y -10°C^{51} .

Aunque se ha observado que la temperatura no siempre tiene repercusiones importantes en la forma o corrimiento de las señales de los espectros en hemoproteínas, la longitud de onda del láser sí es determinante para reproducir el espectro, por lo que consideramos que podría ser uno de los principales factores que hace diferentes a nuestros espectros de los reportados en la literatura. El otro aspecto por considerar es la presencia de metanol en la solución en el experimento de Zimmer, probablemente para disminuir el punto de congelación de la muestra. En este caso, no podemos determinar si el cambio en pH (6.1 en este caso y 7.8 para el de Zimmer) es significativo para modificar la forma o corrimiento de las señales en el espectro.

Además del efecto del pH, que es uno de los factores importantes a considerar cuando se trata de la reproducibilidad de un espectro de Raman, el entorno del anillo de porfirina es diferente en cada una de estas proteínas y son justo esas diferencias las que se reflejan en estos experimentos, pues, aun cuando el cambio es relativamente pequeño alrededor del sitio activo, el corrimiento y/o forma de las señales hacen perceptibles estas diferencias. Es importante destacar, que la longitud de onda del láser utilizado es un factor importante para poder caracterizar y comparar entre espectros. En esta parte del trabajo, se procuró comparar los resultados obtenidos contra las condiciones experimentales más cercanas a las nuestras.

La región de baja frecuencia (300-600 nm) es importante pues es en esta región en donde se han caracterizado los ligantes del sexto sitio de coordinación en las hemoproteínas, (O_2 , N_3 y OH)^{47,75,76}. Sin embargo, en las condiciones a las que se obtuvieron estos espectros, la región de baja frecuencia muestra poca información, principalmente por la interferencia de la señal del cuarzo (a

532 nm) cercana a la región en donde aparece la vibración característica del sexto ligante. Por ejemplo, para el grupo OH (aproximadamente 500 nm)⁴⁷, y esta región es la que se requiere para caracterizar la especie propuesta Fe-OH para el CIII de las peroxidasas.

Paralelamente a estos experimentos, se realizaron pruebas en sólido, es decir, se dejaron secar sobre una superficie de KBr gotas de las diferentes muestras, logrando detectar señales de baja frecuencia en la región de interés; sin embargo, la señales en alta frecuencia se ven afectadas en forma y desplazamiento respecto a sus homólogos en solución, lo que sugiere que lo mismo ocurre con las señales a baja frecuencia limitando la información que éstas puedan proporcionar. Aun así, las expectativas al respecto eran altas, por lo que se trabajó en el diseño de nuevas condiciones experimentales que permitieran analizar mejor la baja frecuencia.

En las pruebas iniciales utilizando un láser cercano a la banda Soret (la banda de absorción en UV-Vis característica de las hemoproteínas), se empleó un láser a 405 nm en un equipo Raman Dispersivo Trivista. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, en una celda de cuarzo y, al mismo pH y en el mismo amortiguador que los experimentos antes mencionados; sin embargo, por las condiciones de operación del equipo, a esta longitud de onda fue difícil obtener información suficientemente definida a baja frecuencia para asignar alguno de los corrimientos en esta región. En otra prueba se utilizó un láser de 532 nm en este mismo equipo, teniendo como resultado que la región de alta frecuencia es prácticamente igual a la observada en el Raman acoplado al microscopio confocal AF y la región de baja frecuencia se observa poco definida. Como tercera opción, se realizaron pruebas en el Raman dispersivo AlmegaXR (Thermo-Nicolet); sin embargo, los resultados no fueron muy diferentes a los obtenidos con el láser de 532 nm en el Raman dispersivo acoplado al microscopio confocal AF en ambas regiones.

Dado que la región de baja frecuencia seguía resultando de particular interés, se empleó nuevamente el equipo Raman Trivista con el láser a 405 nm optimizando las condiciones de operación del equipo, así como algunos ajustes experimentales como el cambio de la celda a una de menos espesor y con un pozo para la mezcla de reacción. La obtención y análisis de estos resultados permitió una mejor caracterización tanto de las especies nativas como de los CIII de la ZoPrx y de la HRP2, ya que se pudo obtener en las mismas condiciones experimentales los espectros tanto de alta como de baja frecuencia.

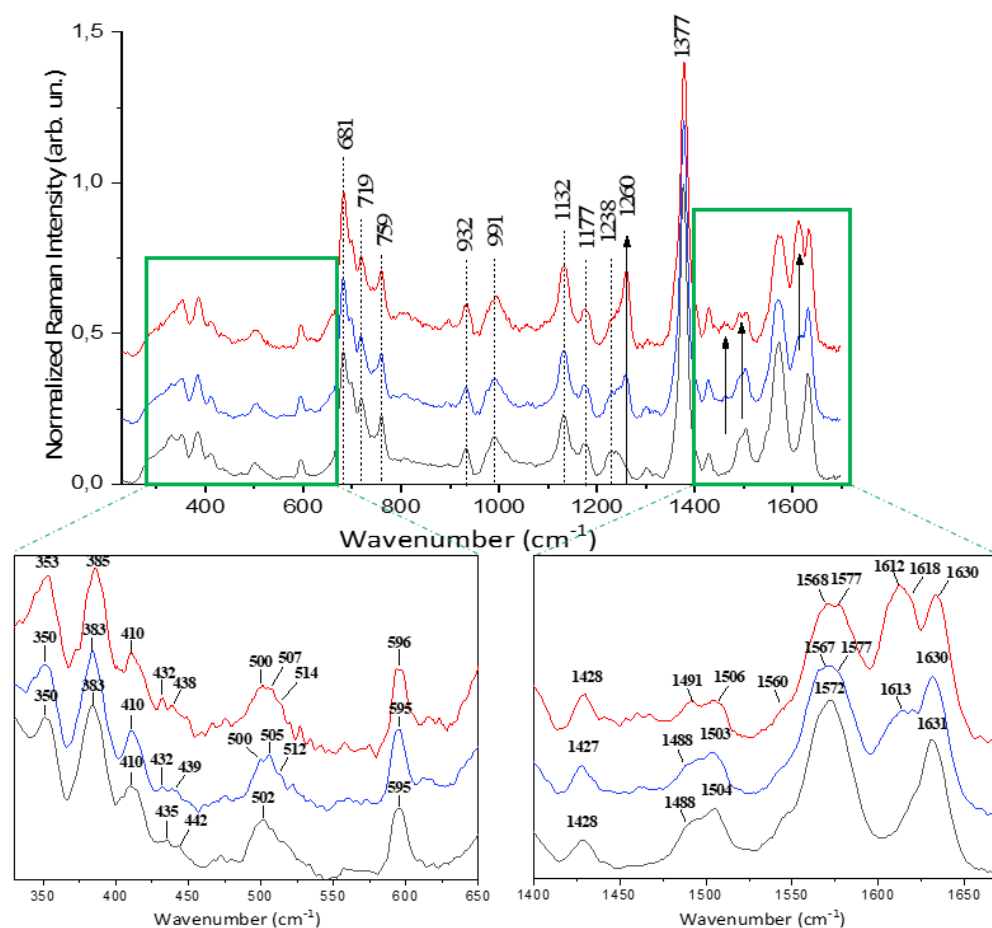


Figura 33. Espectro de Resonancia Raman de la ZoPrx a 405 nm. Estado basal (línea negra); exposición a exceso de H_2O_2 (línea azul) y exposición a exceso de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (línea roja). Acercamientos a la baja y alta frecuencia.

Los espectros del Resonancia Raman del estado nativo de la ZoPrx fueron consistentes con los previamente reportados en la literatura^{47-47,74,77}. En la región de alta frecuencia se presenta una banda típica del estiramiento del grupo vinilo ($\text{C}=\text{C}$) a 1631 cm^{-1} ; la banda alrededor de 1572 cm^{-1} es característica del hierro de alto espín del grupo hemo coordinado axialmente; las bandas en 1504 y 1488 cm^{-1} están relacionadas con el espín cuántico mixto del hierro pentacoordinado; la banda en 1428 cm^{-1} corresponde a los modos de deformación comunes del CH_2 y la banda en 1377 cm^{-1} corresponde a la elongación simétrica de los pirroles en la porfirina la mitad del anillo^{45,74,78,79,80,81}. Las bandas de la región media a 1239 , 1172 y 1129 cm^{-1} corresponden a modos vibracionales de las deformaciones del C-H y al estiramiento asimétrico de los pirroles por el centro del anillo. Las bandas de 932 a 595 cm^{-1} son indicativas de modos simétricos y asimétricos

de las deformaciones de los anillos de pirrol, mientras que las bandas de la región de baja frecuencia a 442, 435, 410 y 383 cm^{-1} están relacionadas con modos de deformación, como rotaciones y traslaciones del anillo de pirrol (Figura 33, línea negra). La asignación detallada de las bandas se encuentra en la Tabla 4.

Luego de la reacción de la ZoPrx con exceso de H_2O_2 , el espectro mostró un cambio significativo en el desplazamiento de las bandas, evidenciando, el incremento de la banda en 1613 cm^{-1} que está relacionado con el estiramiento asimétrico en los enlaces C-C de los grupos aromáticos en la estructura del hemo; el ensanchamiento de la banda cercana a 1572 cm^{-1} y la aparición de dos nuevas banda en 1577 y 1567 cm^{-1} relacionadas con la coordinación axial del hierro hémico de alto espín; el incremento de la banda a 1488 cm^{-1} relacionada con el espín cuántico mixto del hierro hémico pentacoordinado; el incremento de la banda en 1260 cm^{-1} que está relacionado a modos de deformación combinados de los enlaces C-H en los anillos pirrólicos^{81,82}; el ensanchamiento de la banda en 502 cm^{-1} y la aparición de nuevas banda en 500, 505 y 512 cm^{-1} relacionados con la formación del enlace Fe-O^{47,48}; y el desplazamiento de las bandas en 442 y 435 a 439 y 432 cm^{-1} respectivamente se relacionan con la deformación de los anillos pirrol (Figura 33, línea azul).

La reacción de la ZoPrx con exceso de H_2O_2 marcado isotópicamente con ^{18}O incrementó las bandas identificadas con el tratamiento anterior, es decir, la enzima tratada con H_2O_2 sin marcar, de esta manera, se notó un incremento en la intensidad de la banda en 1612 cm^{-1} ; se percibe la aparición de un hombro en 1618 cm^{-1} ; el ensanchamiento de la banda en 1567 cm^{-1} con dos máximos en 1568 y 1577 cm^{-1} ; el desplazamiento de la señal en 1503 a 1506 cm^{-1} con una reducción significativa de la intensidad de la banda; el desplazamiento de la banda en 1488 a 1491 cm^{-1} con incremento en la intensidad; también existe un aumento en la intensidad de la banda en 1260 cm^{-1} ; ensanchamiento de la banda en 500 cm^{-1} mostrando dos hombros en 507 y 514 cm^{-1} ; y el incremento en la intensidad y el desplazamiento de la banda en 350 a 353 cm^{-1} (Figura 33, línea roja).

Adicionalmente, se realizó la sustracción de los espectros para identificar los principales incrementos o reducciones de las bandas o incluso señales que pudieran estar traslapadas con el ensanchamiento de algunas otras bandas. Así, de la sustracción del espectro del estado basal de la ZoPrx al espectro de la reacción ZoPrx: H_2O_2 evidencia el incremento en las bandas en 1610, 1262 y 677 cm^{-1} y la disminución en la banda alrededor de 1571 cm^{-1} (Figura 34, izquierda); mientras que

la sustracción del espectro del estado basal de la ZoPrx del espectro de la reacción ZoPrx:H₂¹⁸O₂ presenta un incremento significativo en la intensidad de las bandas 1638, 1610, 1262, 1137 y 684 cm⁻¹ (Figura 34, derecha). Estos resultados hacen evidente que el marcaje isotópico tiene un efecto importante en la banda de 677 cm⁻¹ que se desplaza a 684 cm⁻¹ en presencia de ¹⁸O.

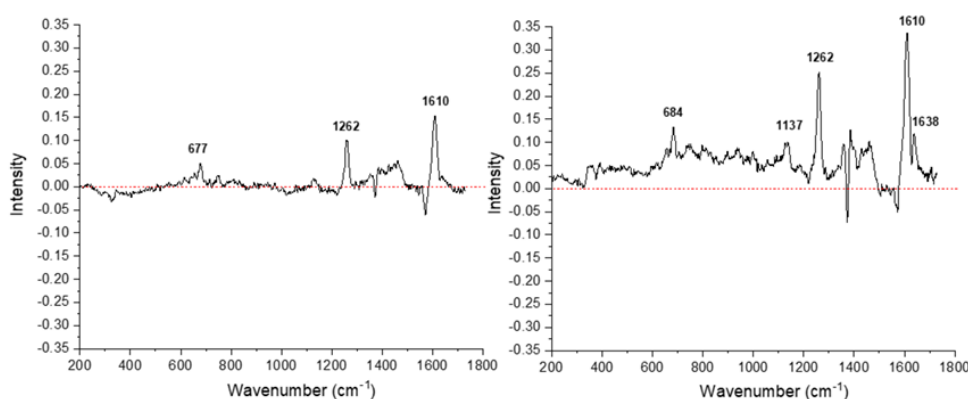


Figura 34. Sustracción de espectros de Resonancia Raman. Izquierda estado basal de la ZoPrx al espectro de la reacción ZoPrx: H₂O₂; derecha, estado basal de la ZoPrx al espectro de la reacción de ZoPrx:H₂¹⁸O₂.

Por otra parte, también se caracterizó el estado basal nativo y el CIII de la HRP2. El espectro de Raman del estado basal de la HRP2 mostró similitudes al espectro de la ZoPrx en su estado basal y las posiciones y desplazamientos de las bandas pudieron ser asignadas a los mismos modos vibracionales que se discuten en el apartado anterior y se concentran en la Tabla 4. Entre las principales observaciones en la comparación entre la HRP2 tratada con H₂O₂ y la HRP2-H₂¹⁸O₂ se identificó la disminución de la intensidad de la banda 1630 cm⁻¹ mostrando también un hombro hacia 1618 cm⁻¹, la intensidad de este hombro aumentó con el marcaje de ¹⁸O; el ensanchamiento de la banda en 1573 cm⁻¹ con la subsecuente aparición de dos bandas a 1570 y 1576 cm⁻¹ después del marcaje con ¹⁸O; el ensanchamiento y disminución de la intensidad, así como el desplazamiento de la banda en 1499 cm⁻¹ hacia 1497 cm⁻¹ en presencia de ¹⁸O; el aumento de intensidad de la banda en 1259 cm⁻¹ tras la adición H₂O₂ que aumentó luego de la reacción con H₂¹⁸O₂; ensanchamiento y desplazamiento de la banda en 500 cm⁻¹ hacia 498 cm⁻¹ mostrando también un hombro en 504 cm⁻¹ ante la presencia de H₂O₂, el marcaje isotópico con ¹⁸O ensanchó y desplazó estas bandas a 497 y 508 cm⁻¹, respectivamente; y el desplazamiento de las bandas de

441 cm^{-1} a 444 cm^{-1} , 383 cm^{-1} a 385 cm^{-1} y 352 cm^{-1} a 355 cm^{-1} (Figura 35) también ante la presencia de ^{18}O .

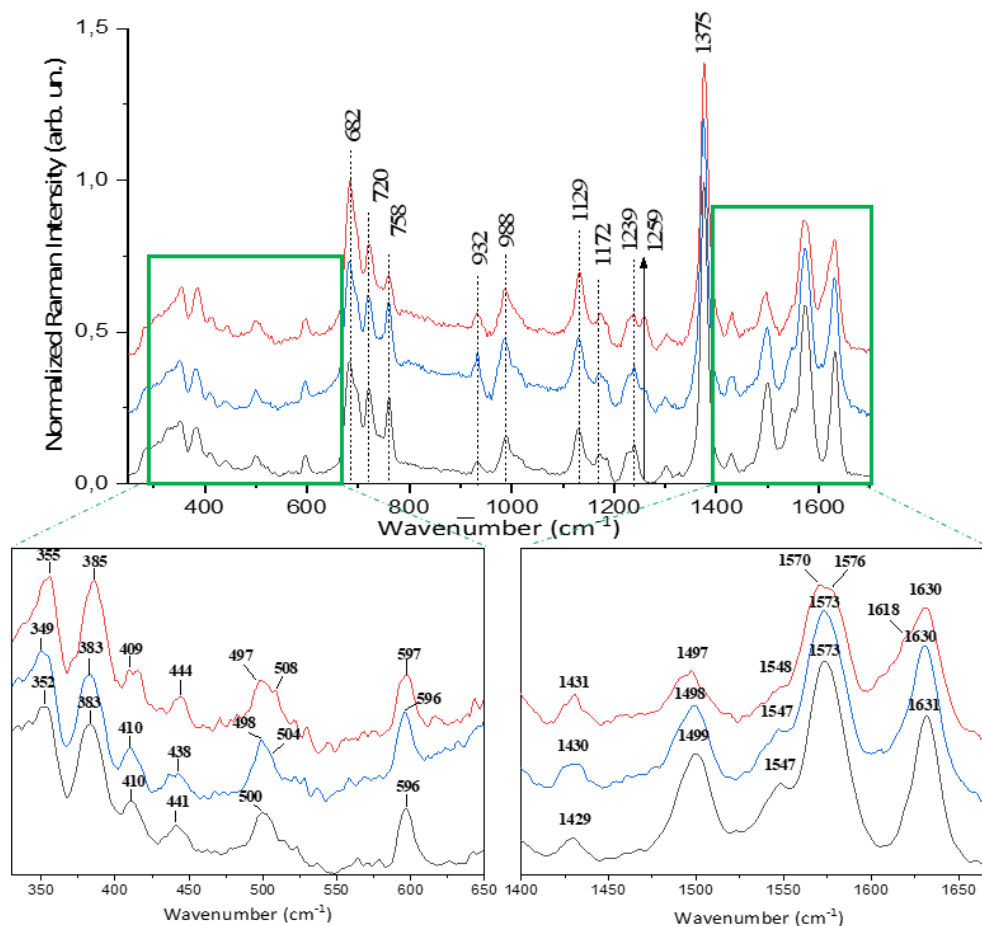


Figura 35. Espectro de Resonancia Raman de la HRP2; Estado basal (línea negra); exposición a exceso de H_2O_2 (línea azul) y exposición a exceso de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (línea roja). Acercamientos a la baja y alta frecuencia.

La sustracción de los espectros de la HRP2 permitió la identificación de los principales incrementos y disminuciones de las bandas que responden al tratamiento con H_2O_2 , siendo las más relevantes las bandas con desplazamientos alrededor de 1615, 1262, 1132 y 752 cm^{-1} (Figura 36, izquierda). La sustracción del espectro de la reacción $\text{HRP2}:\text{H}_2\text{O}_2$ del espectro de la reacción con H_2O_2 marcado con ^{18}O evidencia el incremento de las bandas alrededor de 1611, 1259, 1135 y 684 cm^{-1} y el decremento de las bandas alrededor de 1635, 1575, 1542 y 1499 cm^{-1} (Figura 36, derecha).

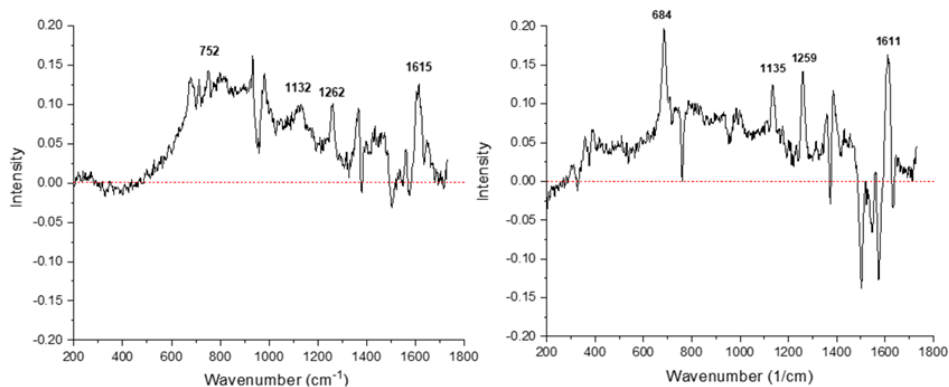


Figura 36. Sustracción de espectros de resonancia Raman. Izquierda, estado basal de la HRP A2 al espectro de la reacción HRP A2: H₂O₂; derecha estado basal de la HRP A2 al espectro de la reacción de HRP A2:H₂¹⁸O₂.

De esta manera y bajo estas condiciones experimentales, se observó que los espectros de ZoPrx y HRP A2 nativas son consistente con la caracterización estructural que se ha reportado previamente para otras hemoperoxidasas por esta espectroscopía, por lo que los desplazamientos de las bandas observadas fueron asignadas a los mismos modos vibracionales como se resume en la Tabla 4.

Uno de los cambios estructurales más interesantes fue el observado en la reacción de la ZoPrx con H₂O₂ ya que evidenció el aumento de bandas Raman características del centro hémico. Este aumento en las bandas sugiere un desplazamiento planar del hemo que provocó una mayor localización electrónica en los dominios aromáticos del anillo, lo que podría causar un aumento de la polarización y en la banda Soret y que explicaría la aparición de nuevas bandas en 1610-1618 cm⁻¹³⁶. El tratamiento con H₂¹⁸O₂ causó un aumento más pronunciado de las bandas, apoyando la disposición planar de la porfirina después de la coordinación Fe-O. La intensidad de la mayoría de los cambios observados en las bandas aumentó cuando estaba presente el ¹⁸O en las especies, siendo estos mucho más evidentes en los espectros de ZoPrx sugiriendo diferencias estructurales potencialmente relacionadas con su comportamiento de estabilidad oxidativa.

Tabla 4. Asignaciones de las bandas en resonancia Raman^{45,74,78-81}.

ZoPrx			HRP			Asignación	
Nativa	H ₂ O ₂	H ₂ ¹⁸ O ₂	Nativa	H ₂ O ₂	H ₂ ¹⁸ O ₂		
1631	1630	1630	1631	1630	1630	ν_{10} (B _{1g})	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{asym}$
		1618			1618		$\nu(C=C)$
	1613	1612				ν_{37} (E _u)	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{asym}$
1572	1577	1577	1573	1573	1577	ν_{19} (A _{2g})	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{asym}$
	1567	1568			1570	ν_2 (A _{2g})	$\nu(C_{\beta}C_{\beta})$
		1560			1563	ν_{38} (E _u)	$\nu(C_{\beta}C_{\beta})$
			1547	1547	1548	ν_{11} (B _{1g})	$\nu(C_{\beta}C_{\beta})$
1505	1503	1505	1498	1500	1500	ν_3 (A _{1g})	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{sym}$
1493	1490	1491				ν_3 (A _{1g})	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{sym}$
1428	1427	1429	1429	1430	1431		$\delta s(=CH_2)$
1377	1377	1378	1375	1375	1376	ν_4 (A _{1g})	$\nu(\text{Pyr half-ring})_{sym}$
	1260	1260		1259	1259	$\nu_5 + \nu_9$ (A _{1g})	$\nu(C_{\beta}X)_{sym}$ & $\delta(C_{\beta}Y)_{sym}$
1238	1238	1238	1239	1239	1239	ν_{13} (B _{1g})	$\delta(C_mH)$
1177	1177	1177	1172	1172	1172	ν_{30} (B _{2g})	$\nu(\text{Pyr half-ring})_{asym}$
1132	1132	1132	1129	1129	1129	ν_{22} (A _{2g})	$\nu(\text{Pyr half-ring})_{asym}$
991	991	992	988	988	988	ν_{31} (B _{2g})	$\nu(C_{\beta}H)_{asym}$
932	932	932	932	932	932	ν_{46} (E _u)	$\delta(\text{Pyr def})_{asym}$
759	759	759	758	758	758	ν_{16} (B _{1g})	$\delta(\text{Pyr def})_{sym}$
719	719	719	720	720	720	ν_{24} (A _{2g})	$\delta(\text{Pyr def})_{asym}$
681	681	681	682	682	682	ν_7 (A _{1g})	$\delta(\text{Pyr def})_{sym}$
595	595	596	596	596	597	ν_{48} (E _u)	$\delta(\text{Pyr def})_{sym}$
	512	514				ν_{49} (E _u)	$\delta(\text{Pyr rot})$
442	439	438	441	438	444	ν_{33} (B _{2g})	$\delta(\text{Pyr rot})$
435	432	432		433		ν_{25} (A _{2g})	$\delta(\text{Pyr rot})$
		417			415	ν_{50} (E _u)	$\delta(\text{Pyr rot})$
410	410	410	410	410	409		$\delta(C_{\beta}C_{\alpha}C_{\beta})$
383	383	385	383	383	385	$2\nu_{35}$ (A _{1g})	$\delta(\text{Pyr transl})$
350	350	353	352	349	355	ν_8 (A _{1g})	n(M-N)

Como conclusión, el tratamiento de las hemoperoxidasas con H₂O₂ provocó cambios estructurales importantes, en particular en el centro hémico de la proteína, incluso más allá de la formación del enlace de coordinación de Fe-O tal como demuestra la detección de los diferentes modos de deformación de los grupos pirrol y el estiramiento asimétrico de los enlaces C-C en los grupos aromáticos. La mayoría de estos cambios se hicieron más evidentes al emplear el marcaje con ¹⁸O, siendo de particular notoriedad los de la ZoPrx, sugiriendo diferencias estructurales potencialmente relacionadas con su particular estabilidad oxidativa en comparación a la HRP2.

Espectroscopía paramagnética electrónica de la HRP2

Como se mencionó en el apartado de antecedentes de este proyecto, en un trabajo previo se caracterizó el CIII de la ZoPrx por EPR, que fue la clave que permitió plantear parte de las hipótesis del trabajo actual, pues el principal hallazgo del proyecto previo fue la identificación de un CIII de la ZoPrx con un espectro característico de especies hidroxiladas como la hemoglobina y mioglobina, pero por primera vez en hemoperoxidasas³². Por esta razón se retomó la técnica para la caracterización del CIII de la enzima control HRP2.

Los espectros de EPR en banda X se registraron en el laboratorio de la Universidad de Siena en el departamento de Química con un espectrómetro Bruker E500 X-Band Elexis. Las mediciones de baja temperatura se realizaron con un criostato ESR900 Oxford Instruments que trabaja en el intervalo de temperaturas 3-300 K.

Las soluciones para los espectros EPR se prepararon *in situ*, se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se insertaron en el criostato inmediatamente. Los espectros fueron obtenidos del estado nativo o basal de la enzima HRP2 y para las reacciones de la proteína contra relaciones molares de H₂O₂ 1:8 y 1:10,000 a 10 K y a pH 6.1.

Inicialmente se obtuvo el espectro del estado nativo de la HRP2 a 4 K y mostró señales típicas del Fe(III) de alto espín con valores de $g=6.1$ y 1.99 , la señal con el valor de g a 5.1 puede deberse a la presencia del espín cuántico mixto de un estado férrico de alto espín (QM: $S=3/2$ y $S=5/2$) (Figura 37, línea negra, superior)^{44,62,72,83,84}. Posteriormente, se adquirió el espectro del CI formado a partir de la reacción HRP2:H₂O₂ en relación molar 1:8 y a 4 K, en este caso, se obtuvieron valores de g para el radical π catión a 3.83 y 1.99 (Figura 37, línea roja). Estas evidencias muestran un comportamiento similar tanto para la ZoPrx³² como para la HRP2 y son equivalentes a los reportados en la literatura^{63,83,85,86,87}.

Para realizar una mejor caracterización de los CIII formados por las hemoperoxidasas, se obtuvo el espectro de EPR del CIII de la HRP2 con el objetivo de hacer una comparación con el previamente reportado CIII de la ZoPrx. En el espectro de EPR del CIII de la ZoPrx, obtenido en una relación molar de 1:10,000 HRP2:H₂O₂ a 4 K, se observaron señales identificadas en especies de Fe(III) de bajo espín a $g=2.57$, 2.18 y 1.85 ³², y características de especies hidroxiladas^{88,89,90}; además, se observa una señal en $g=4.3$ adjudicada a la probable presencia de Fe(III) en solución (Figura 15).

Interesantemente, un compuesto similar (Fe(III)-OH) ha sido producido artificialmente por criorreducción y caracterizado con un espectro de EPR con valores de g muy semejantes⁹¹. En el caso del CIII de la HRP2 se identificaron señales prácticamente iguales que en la ZoPrx, los valores de g en este caso fueron 2.56, 2.16 y 1.86, además de la señal en g=4.3 ya relacionada con Fe(III) libre en solución (Figura 37, línea negra, inferior) lo que demuestra consistencia con los resultados obtenidos para el CIII de la ZoPrx y que nos permite proponer como general para las hemoperoxidasas de plantas, la formación de especies Fe(III)-OH cuando las enzimas en su estado basal son sometidas a tratamientos con exceso de H₂O₂.

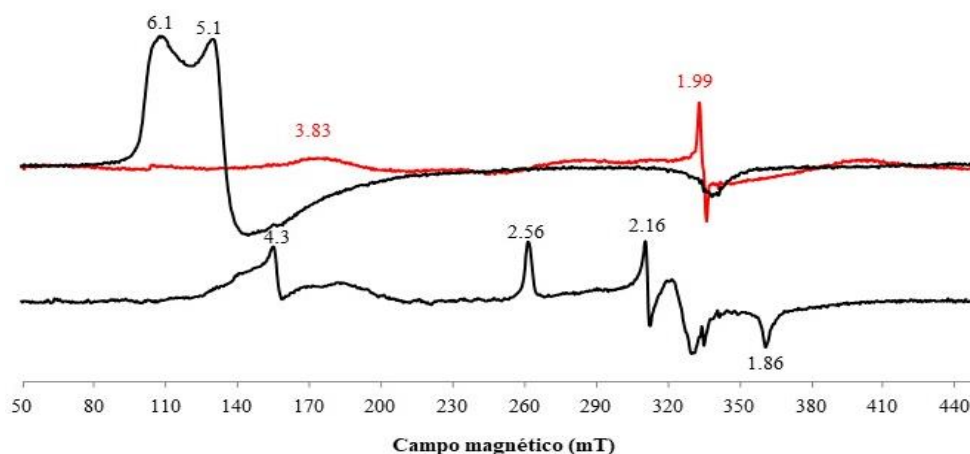


Figura 37. Espectros de EPR de la HRP2. Estado basal obtenido a 5 K (línea negra superior); CIII adquirido a 4 K después de la exposición a H₂O₂ en relación molar 1:8 enzima:H₂O₂ (línea roja superior) y CIII obtenido a 4 K después de la exposición a H₂O₂ en relación molar 1:10,000 enzima:H₂O₂ (línea negra inferior). El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 1 mT; potencia 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

Formación de especies hidroxiladas

Con la finalidad de tener referentes robustos para los diferentes espectros obtenidos en este estudio para el CIII, procedimos a producir una variedad de especies hidroxiladas en diferentes hemoproteínas entre las que se encuentra la Hemoglobina (Hb) humana. Para generar los espectros de Hb-OH fue necesario primero purificar un lote de la proteína del cual se obtuvieron 115.2 mg/mL de hemoglobina, con una concentración de 1.8 mM. El espectro de absorción de la Hemoglobina purificada presenta la banda característica del grupo hemo en 406 nm, además de bandas entre 500-600 nm identificadas como bandas debidas a transferencia de carga⁹² (Figura 38).

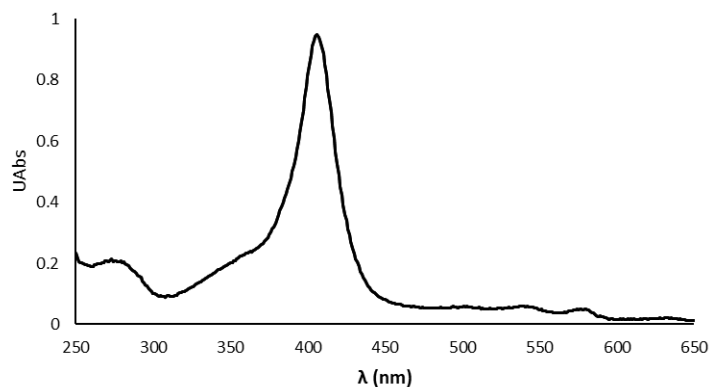


Figura 38. Espectro de Absorción electrónico de la Hemoglobina.

Las especies hidroxiladas tanto de la ZoPrx, HRP2 y Hb se generaron en medio alcalino, lavando alícuotas de las hemoproteínas con BFS 10 mM pH 12. Así, pudimos generar y comparar las especies ZoPrx-OH, HRP2-OH, y Hb-OH, previamente se monitoreó su estabilidad hasta 24 h. Las tres muestras presentan una banda principal, a 417, 414 y 416 nm respectivamente y una banda en aproximadamente 545 nm, adicionalmente solo ZoPrx-OH y Hb-OH presentan un hombro en aproximadamente 360 nm y una banda 575 nm (Figura 39). Cabe señalar, que la especie hidroxilada de la Hb ha sido reportada ya con un máximo en 413 nm, y con un desplazamiento de esta banda dependiente de pH y temperatura de la muestra⁷⁵.

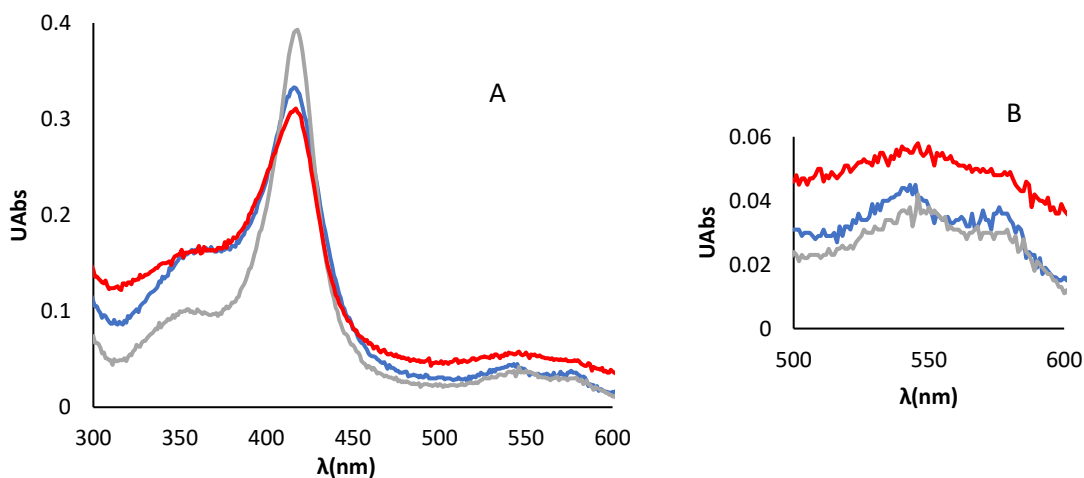


Figura 39. A) Comparación de las especies hidroxiladas y el CIII de la ZoPrx: Hb-OH (azul), ZoPrx-OH (gris) y CIII de la ZoPrx (rojo). B) acercamiento al intervalo 500-600 nm.

En la comparación de los espectros del CIII ZoPrx, ZoPrx-OH y Hb-OH, el espectro es bastante similar, la banda Soret desplazada a 416-417 nm, un hombro en 360 nm, una banda en 545 nm y una más en 575 nm que no es muy evidente en CIII ZoPrx (Figura 40). De la misma manera, en la

comparación entre las especies CIII de la HRPA2, HRPA2-OH y la Hb-OH se observa similitudes en el desplazamiento de las bandas Soret que son 418, 414 y 416 nm respectivamente, un hombro en 360 nm y las dos bandas en 545 y 475 nm. Aun cuando el espectro del CIII ZoPrx es más consistente con el de la especie Hb-OH, el espectro del CIII de HRPA2 tiene también similitudes con el espectro de la especie Hb-OH, lo que abre la necesidad de emplear otras técnicas que permitan el estudio y la complementación de la caracterización de estas especies.

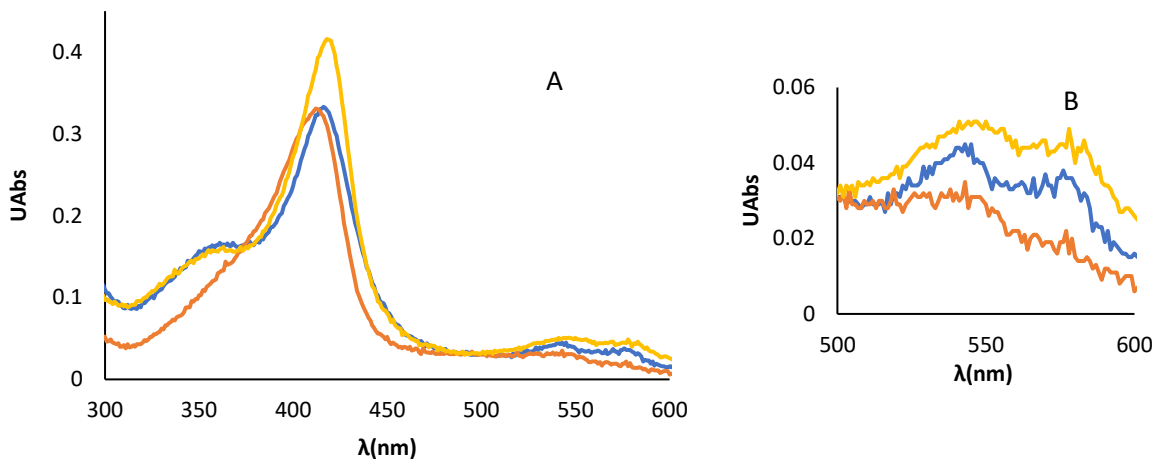


Figura 40. A) Comparación de las especies hidroxiladas y el CIII de la HRPA2: Hb-OH (azul), HRPA2-OH (naranja) y CIII de la HRPA2 (amarillo). B) acercamiento al intervalo 500-600 nm.

Partiendo de estas similitudes entre especies hidroxiladas y los CIII de la ZoPrx y de la HRPA2, así como de la evidencia obtenida por EPR para el CIII de la ZoPrx (Figura 15), que se sugiere también como una especie hidroxilada, se buscó hacer la caracterización y comparación de estas especies por Resonancia Raman. Es importante señalar que este análisis comparativo se realizó en la primera sesión de experimentos en Raman y que no son las condiciones óptimas experimentales o del equipo, ya que se obtuvieron con un láser de 532 nm.

Del espectro obtenido para la hemoglobina (Figura 41) es posible observar un espectro con corrimiento en las señales bastante parecido al reportado en la literatura (Figura 42)⁹³, aunque es importante hacer notar que la forma del espectro no coincide, posiblemente debido a las diferencias en las escalas y en las condiciones experimentales, en este caso, las condiciones fueron amortiguador de fosfatos pH 6.1, temperatura ambiente y un láser de 532 nm, en el caso de la HbO₂ reportada, fue realizado a pH 7, con un láser de 568.2 nm. Como ya hemos mencionado anteriormente, el pH entre 6 y 7 ha demostrado no ser factor importante para cambios

significativos en la forma y corrimiento de las señales, por el contrario, la longitud de onda del láser empleado sí, y ha quedado evidenciado una vez más en este ejemplo, ya que el espectro reportado se ha obtenido con una longitud de onda mayor al que utilizado para este trabajo (532 vs 568.2 nm), aun así, la forma de las señales se ha conservado y el corrimiento de las mismas es bastante cercano.

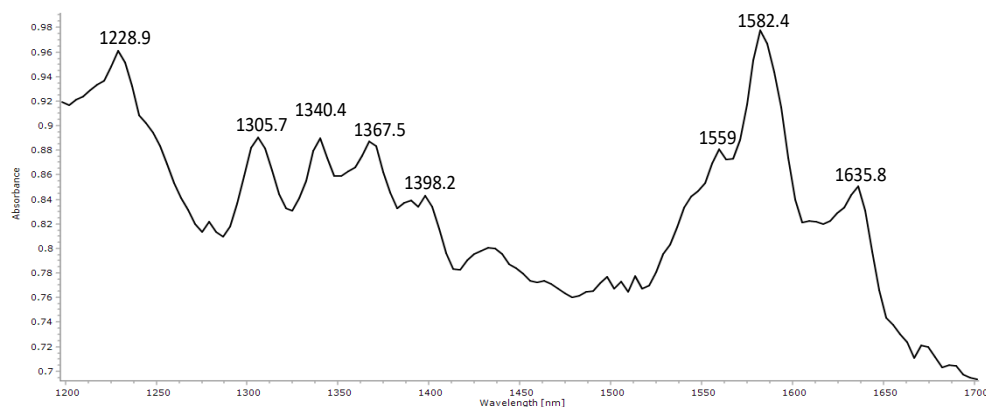


Figura 41. Espectro Raman la Hb humana 1.8 mM, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.

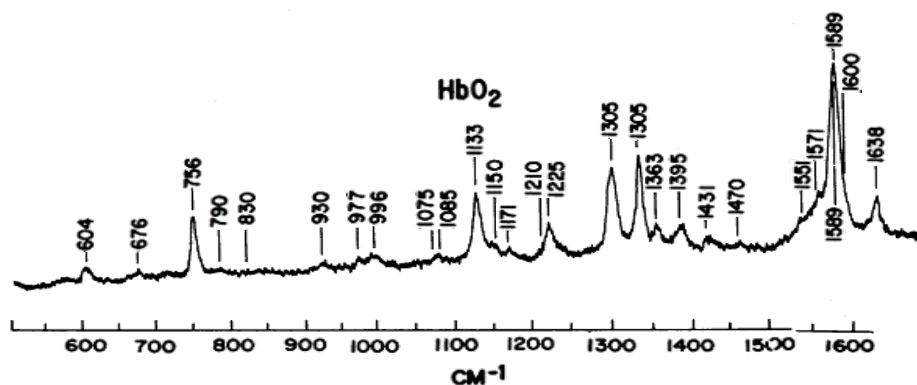


Figura 42. Espectro Raman la Hb humana 0.1 mM, obtenido a 568.2 nm, pH 7⁹⁴.

Un método que pareció interesante fue la obtención de la especie hidroxilada por autooxidación de la hemoglobina (Figura 43), de la que es posible observar un espectro que, comparado con los reportados en la literatura para otras hemoproteínas hidroxiladas (Figura 44), no presenta similitud en la forma ni en el corrimiento de las señales. Esto puede ser adjudicado una vez más a las condiciones experimentales, en el caso de este trabajo: amortiguador de fosfatos pH 6.1,

temperatura ambiente, láser 532 nm y para los ejemplos reportados los espectros fueron obtenidos a pH alcalinos y longitudes de onda distintas^{93,94} (Figura 44).

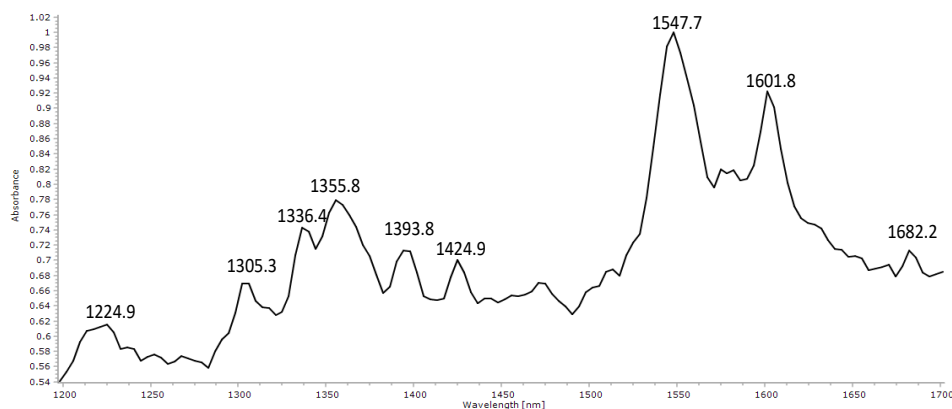


Figura 43. Espectro Raman de Hb-OH autooxidación, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y temperatura ambiente.

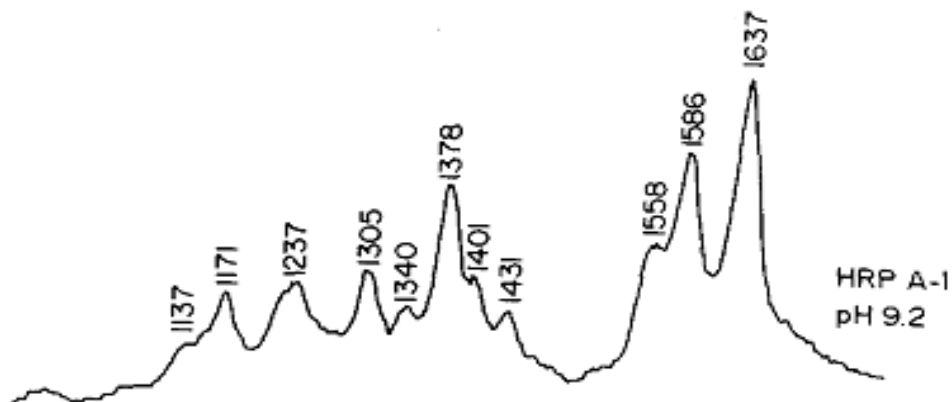


Figura 44. Espectro Raman de la HRP A-1-OH 1 mM, obtenido a 530.9 nm, en amortiguador BSF 200 mM pH 9.2, temperatura ambiente⁹³.

Con este último experimento, podemos observar que a pH > 9 los espectros presentan señales a corrimientos diferentes de los que se pueden observar en la Figura 43 e incluso las formas son distintas, aunado a las diferencias generadas por la longitud de onda del láser de excitación. Sin embargo, entre la Hb nativa y la Hb-OH autooxidación, existe una clara diferencia en la forma del espectro. Los cambios más importantes en la comparación de este par de espectros, se da en la región de 1330 a 1700, pues se puede observar el corrimiento de las señales a menor frecuencia (Figura 45), lo que permite identificarlas como especies diferentes, antes y después de la reacción de autooxidación.

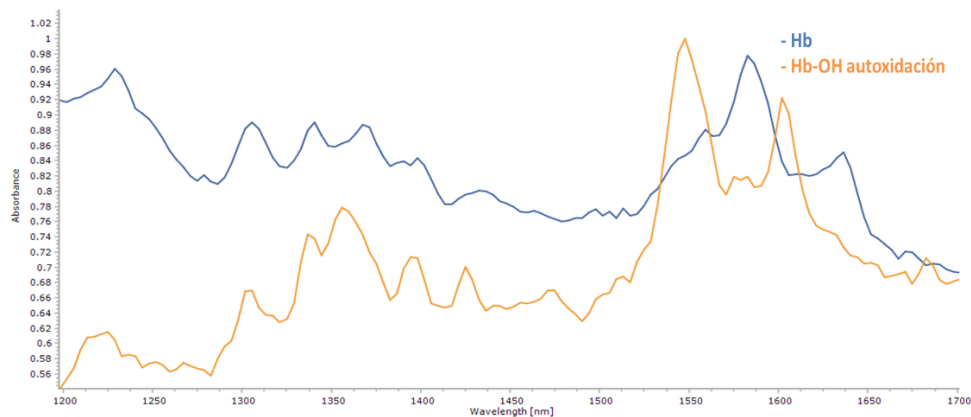


Figura 45. Espectro Raman de Hb (azul) vs Hb-OH autooxidación (naranja), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.

Adicional a la especie formada por autooxidación se generó la especie hidroxilada por cambio de pH (de pH 6.1 a pH 12) para comparar entre éstas y el CIII de la ZoPrx y la HRPA2. En la comparación entre los espectros obtenidos de la Hb-OH autooxidación y la Hb-OH pH 12 se observa una clara diferencia en los espectros, principalmente en la región entre 1500 y 1650 nm aunque a menor frecuencia (1250-1500 nm) es espectro es mucho más consistente en el corrimiento de las señales, es decir, se observa que los espectros son más parecidos en forma y en la posición de las bandas (Figura 46).

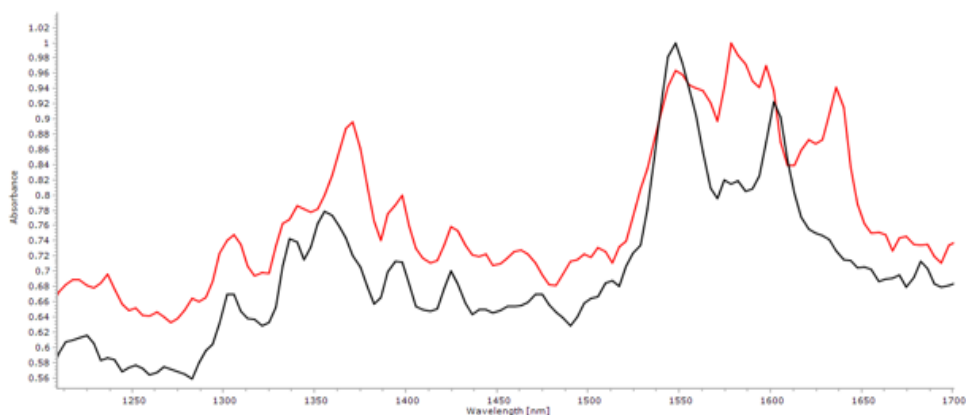


Figura 46. Espectro Raman de Hb-OH autooxidación (negro) vs Hb-OH pH 12 (rojo), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 y pH 12, respectivamente, temperatura ambiente.

En la comparación entre el espectro del CIII de la ZoPrx y el de la Hb-OH obtenida por autooxidación (Figura 47) no se observa el corrimiento exacto de todas las señales, se conserva en buena medida la forma de los espectros y algunas de las señales, aunque con intensidades diferentes, siendo más evidentes en la región de alta frecuencia.

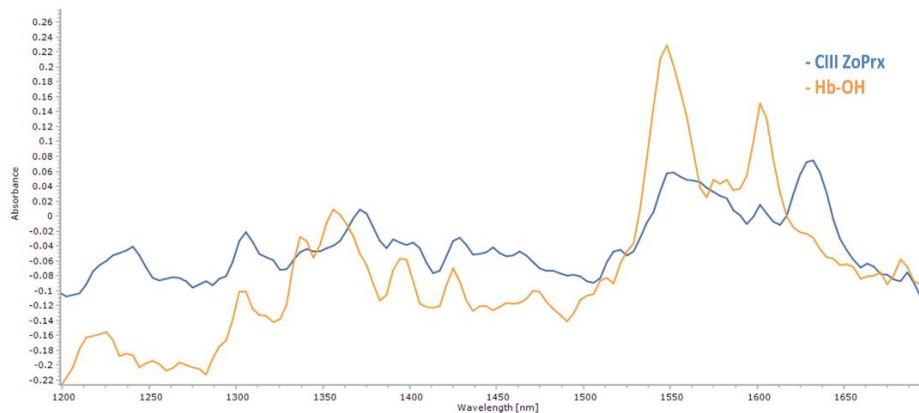


Figura 47. Espectro Raman del CIII de la ZoPrx (azul) y Hb-OH (naranja), obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1, temperatura ambiente.

En el caso del CIII de la ZoPrx, la ZoPrx-OH y la Hb-OH pH 12 y el espectro muestra gran similitud, si bien las intensidades no son exactamente iguales, se pueden apreciar similitudes en el corrimiento de la mayoría de las señales; en particular, los espectros correspondientes a la ZoPrx-OH (azul) y CIII de la ZoPrx (verde), son muy parecidos en la forma de la señal y coinciden en la mayoría del corrimiento de las mismas (Figura 48).

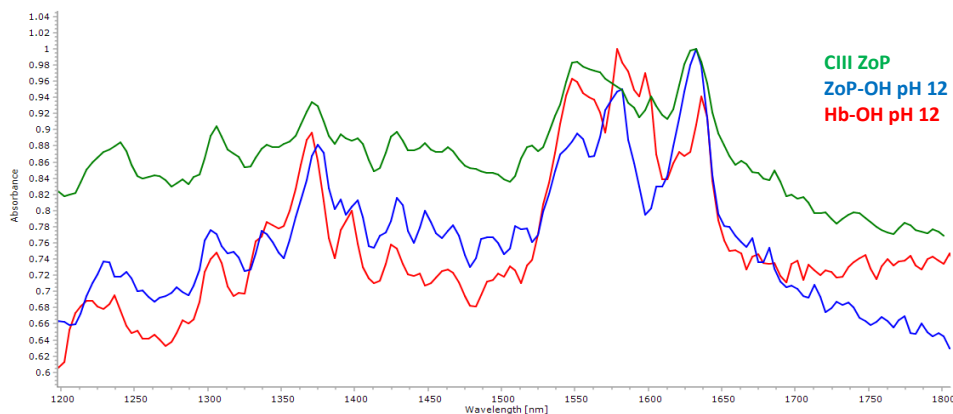


Figura 48. Espectro Raman del CIII de la ZoPrx pH 6.1 (verde) y Hb-OH pH 12 (rojo) y ZoPrx-OH pH 12, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM, temperatura ambiente.

Luego de la obtención de los espectros arriba discutidos, se generó la especie hidroxilada (HRPA2-OH) de la HRPA2 (Figura 49, línea azul) en un pH alcalino (pH 12) para comparar con el CIII de la ZoPrx, así como también con la Hb-OH por autooxidación. La HRPA2-OH presenta un espectro muy parecido a los ya reportados en la literatura para la HRPA1 a pH alcalino (Figura 44)⁹³.

De la comparación en la Figura 49 se puede observar que el CIII de la ZoPrx presenta un espectro parecido a los espectros de la HRPA2-OH y de la Hb-OH, aunque el corrimiento de las señales no es exacto, se logran conservar algunas de ellas con diferentes intensidades.

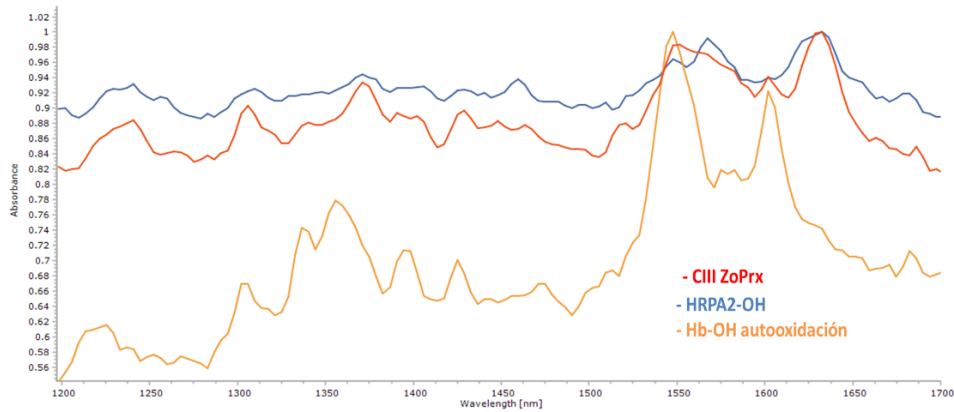


Figura 49. Espectro Raman del CIII de la HRPA2-OH Ph 12 (azul) y Hb-OH (naranja) Ph 6.1 Y CIII ZoPrx (rojo) pH 6.1, obtenido a 532 nm, en amortiguador BFS 10 mM, temperatura ambiente.

En general, se pudo concluir que los espectros en la alta frecuencia en Resonancia Raman (1000-1800 nm) a 532 nm tanto de la ZoPrx, la HRPA2 y la Hb han demostrado ser bastante consistentes con los reportados en la literatura para hemoperoxidasas y para la hemoglobina. Y que incluso en estas condiciones experimentales se aprecia similitud entre las especies hidroxiladas (ZoPrx-OH, HRPA2-OH y Hb-OH) y los CIII de las hemoperoxidasas.

Formación y decaimiento de la especie ferrosa de HRPA2 (Fe(II))

Para el estudio de la formación del CIII a partir de vías alternas⁴ a la incubación de las peroxidases en H₂O₂ se exploró la formación a partir del estado ferroso de la HRPA2. Inicialmente se monitoreó la formación del estado Fe(II) en la enzima por reducción del Fe(III) en presencia de un exceso de Na₂S₂O₄ (ditionita de sodio). La formación de la especie Fe(II) fue evidenciada por el desplazamiento de la banda Soret de 404 nm a 436 nm, además de la aparición de dos bandas de absorbancias significativas en 255 y 315 nm, de un hombro a 386 nm, de una banda de mucho menor intensidad con máximo en 555 nm y de un hombro en 589 nm. La estabilidad de la especie fue monitoreada por UV-Vis en el tiempo, observando que la especie es estable por al menos 10 min, luego de ese tiempo empieza a decaer relativamente lento hasta reestablecer prácticamente la totalidad la banda de la banda Soret característica del Fe(III) luego de 60 min (404 nm); el resto de las bandas desaparece, excepto la banda en 255 nm y se reestablece la banda ancha cerca de

500 nm también característica del estado basal (Figura 50). En este experimento solo se adquirieron datos hasta el minuto 60, probablemente, el monitoreo por más tiempo habría llevado al restablecimiento total del espectro de la especie nativa.

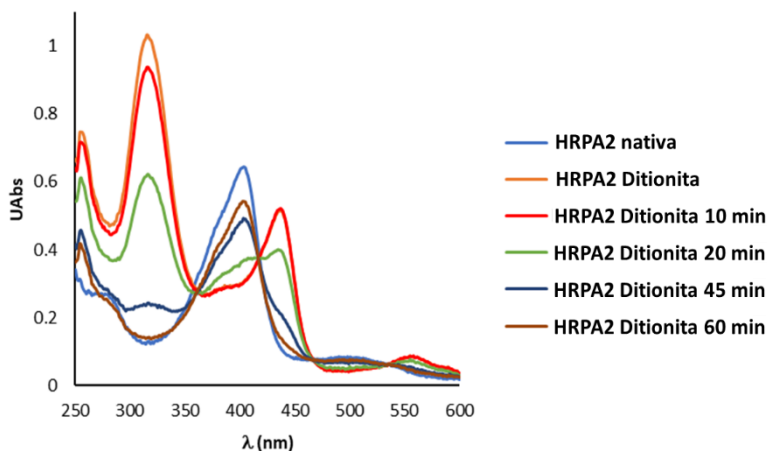


Figura 50. Formación y decaimiento de la especie ferrosa de la HRP A2 obtenida de la reacción de la enzima con ditionita de sodio en exceso.

Formación del compuesto III de la HRP A2 a partir de Fe(II) y O₂

Una vez identificada la formación de la especie Fe(II) se ensayaron dos vías probables para la formación de CIII clásico descrito hasta el momento en la literatura⁴. La primera consistió en burbujear una alícuota de HRP A2 contenida en amortiguador BFS 10 mM pH 6.1 con N₂ por un par de minutos para desplazar el oxígeno disuelto en la solución acuosa. A continuación se hizo reaccionar con un exceso de ditionita de sodio para llevar a cabo la formación de la especie Fe(II) del hemo de la proteína, se volvió a burbujear con N₂ para prevenir la oxidación involuntaria de la especie ferrosa e inmediatamente después se burbujearon con O₂ (en exceso) con el objetivo de llevar a la oxidación de la especie y formar el CIII clásico descrito por la literatura. Cada uno de estos pasos o reacciones fueron monitoreados por UV-Vis. Inicialmente se adquirió el espectro del estado nativo de la enzima, a continuación, se adquirió el espectro después de la reacción con ditionita de sodio que se ha identificado como se describe en el apartado anterior e inmediatamente después de ser burbujear con O₂. Sin embargo, luego de la reacción con O₂ el espectro obtenido es superponible al espectro de la especie nativa, con la única diferencia de que se conserva una de las bandas que aparece con la formación de la especie Fe(II), la banda con

máximo en 255 nm, la cual se conserva desde la reducción de la especie. El experimento fue monitoreado por 60 min más sin observarse ningún cambio más en el espectro (Figura 51). Considerando lo anterior, se concluye que no es posible obtener por este método o con estas condiciones experimentales la formación del CIII cómo se esperaba inicialmente.

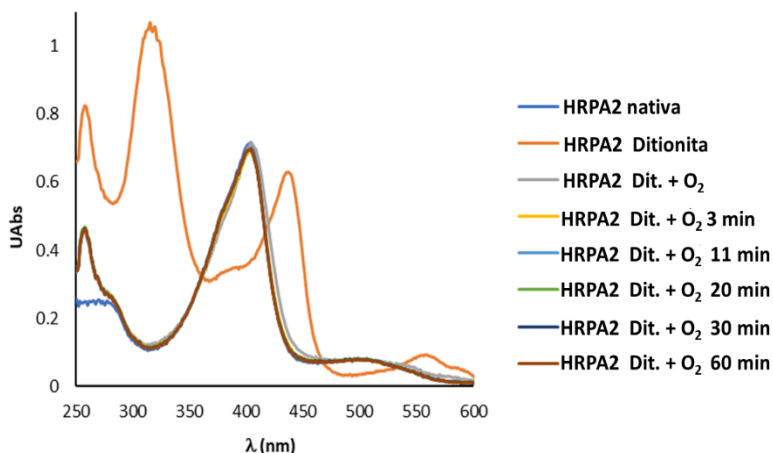


Figura 51. Reacción de la especie ferrosa de la HRP A2 con exceso de O₂. Especie ferrosa de HRP A2 (naranja); especie ferrosa más exceso de O₂ (gris).

La segunda vía ensayada para la formación de CIII clásico, fue generar bajo las mismas condiciones experimentales la especie de Fe(II), una vez formada la especie se desplazó el O₂ disuelto en la solución por medio de burbujeo de N₂ y a continuación se adicionó exceso de H₂O₂, inicialmente se agregaron 10,000 equivalentes de H₂O₂. Sin embargo, no se observaron las bandas esperadas y características del CIII, en su lugar solo se observó una ligera disminución de la banda correspondiente a la banda Soret tras la adición de 10,000 equivalentes más de H₂O₂ (20,000 equivalentes de H₂O₂ en total). En este caso se observó un cambio similar al anterior, es decir, la disminución de la banda Soret y también disminución en la banda de 555 nm. Las subsecuentes adiciones de 10,000 equivalentes de H₂O₂ cada una de ellas (30,000 y 40,000 equivalentes totales respectivamente) llevaron a la pérdida de la forma del espectro (Figura 52), evidenciando la posible desnaturalización de la proteína y como consecuencia no fue posible identificar la formación esperada del CIII.

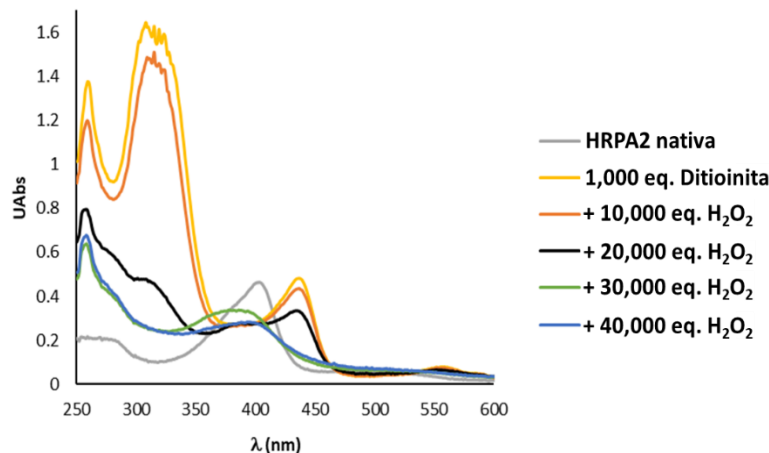


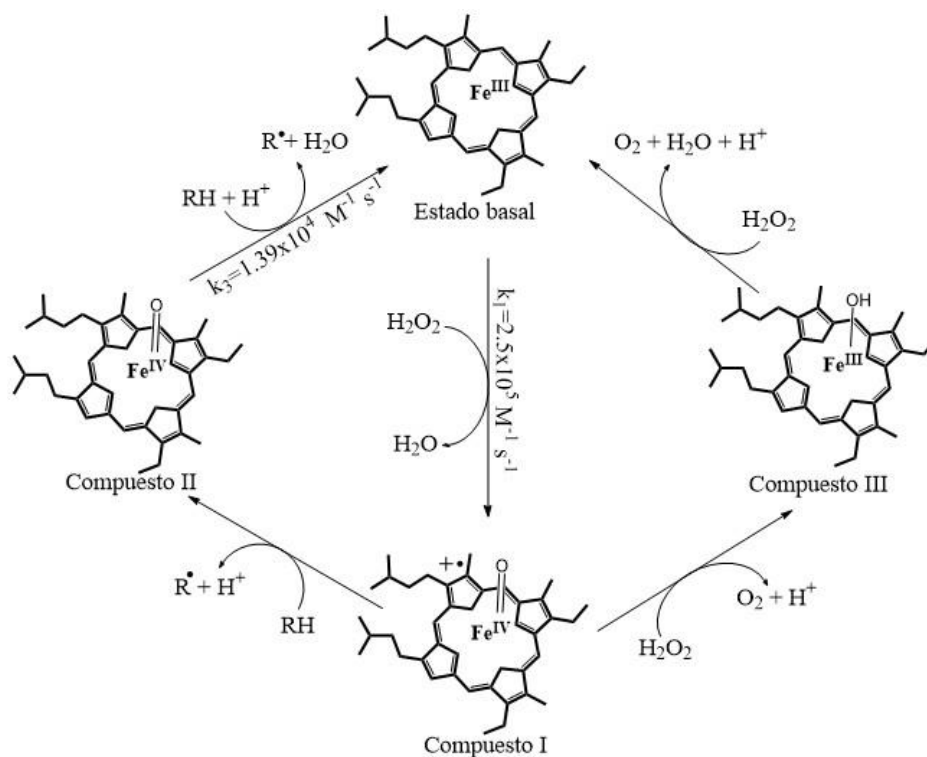
Figura 52. Reacción de la especie ferrosa de la HRP A2 con exceso de H₂O₂. HRP A2 nativa (gris); especie ferrosa de HRP A2 (amarillo); especie ferrosa más exceso de H₂O₂ de 1,000 equivalentes (amarillo); especie ferrosa más exceso de H₂O₂ de 10,000 equivalentes (naranja); especie ferrosa más exceso de H₂O₂ de 20,000 equivalentes (negro); especie ferrosa más exceso de H₂O₂ de 30,000 equivalentes (verde) y especie ferrosa más exceso de H₂O₂ de 40,000 equivalentes (azul).

Hasta este punto, las evidencias de la espectroscopía UV-Vis en conjunto con las evidencias cinéticas nos permiten llegar a varias conclusiones. La primera es que tanto los estados basales (nativo o regenerado), así como los intermediarios podrían ser indistintos y/o equivalentes, al menos por estos dos métodos empleados para su caracterización. La segunda es que en el CIII obtenido por la incubación en exceso de H₂O₂ tanto de la ZoPrx como de la HRP A2 guardan una alta relación espectroscópica en UV-Vis con las especies hidroxiladas de las mismas enzimas y con la especie hidroxilada de la hemoglobina como control; y tercera, los dos experimentos diseñados para la formación del CIII descrito hasta ahora en la literatura como un radical peroxi-ferril del Fe(III) no fueron fructíferos. Estas últimas dos fortalecen la hipótesis de que el CIII formado por las peroxidasas es en realidad una especie Fe(III)-OH como se propone de los resultados obtenidos previamente y descritos en el apartado de antecedentes de este documento.

Mecanismo de formación y decaimiento propuesto para el CIII en hemoperoxidasas

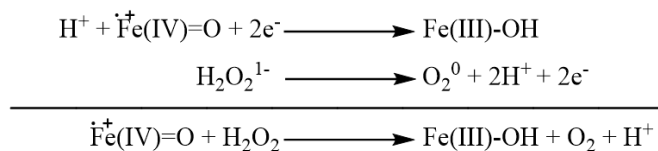
Las evidencias obtenidas en este trabajo nos permitieron reconsiderar la estructura de CIII así como su mecanismo de formación. La formación de los intermediarios descritos clásicamente en el ciclo catalítico de las peroxidasas (CI y CII) fue confirmada por cinética enzimática, UV-Vis y EPR.

Sin embargo, la estructura propuesta clásicamente para el CIII no pudo ser confirmada por nuestros métodos, pues las evidencias mostraron resultados consistentes con especies hidroxiladas de otras hemoproteínas. Esto nos permitió plantear un mecanismo diferente al que históricamente había sido propuesto para las hemoperoxidasas de plantas (Esquema 2).



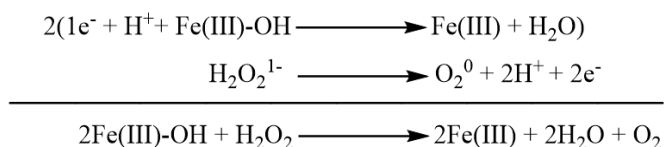
Esquema 2. Representación del mecanismo de las hemoperoxidasas. En presencia de exceso de H_2O_2 se presenta al CIII como una especie hidroxilada. La vía de decaimiento del CIII lleva a la restauración del estado basal.

De esta manera, la propuesta mecanística de formación del CIII a partir del CI y como una especie hidroxilada involucra una reducción de dos electrones. El primer electrón rescata el radical en la porfirina característico del CI, mientras el segundo electrón cambia el estado de oxidación del hierro de Fe(IV) a Fe(III), seguido del rearrreglo espontaneo del ligante oxo a un grupo hidroxilo. Esta reacción de oxidación del H_2O_2 produce los dos electrones, necesarios para la reacción, evolución de O_2 y dos protones. Para determinar la consistencia de esta propuesta se hizo el balance redox de las reacciones individuales (esquema 3), permitiendo corroborar que la especie propuesta es consistente estequiométricamente con el mecanismo aquí mostrado.



Esquema 3. Formación de la especie Fe(III)-OH por el método de balance redox.

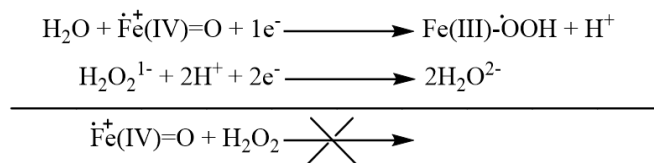
Posteriormente y tras la subsecuente oxidación de H₂O₂ ocurre el decaimiento del CIII y puede proceder por la pérdida del anión hidroxilo, que puede ser fácilmente neutralizado por el medio ácido llevando a la restauración del estado basal de la enzima, dejándolo disponible para volver a iniciar el ciclo catalítico como se muestra en el esquema 2. El decaimiento de esta especie también fue corroborado por el balance redox de las reacciones individuales y demuestra que estequiométricamente también es consistente (Esquema 4).



Esquema 4. Decaimiento de la especie Fe(III)-OH al estado basal por el método de balance redox.

Es importante señalar que el restablecimiento del estado basal de la ZoPrx luego de la exposición a exceso de H₂O₂ es prácticamente total, mientras que para otras hemoperoxidasas como la HRP2 el restablecimiento del estado basal se presenta en menor rendimiento, lo que sugiere la diferencia principal que da a la ZoPrx la alta estabilidad ante la presencia de exceso de H₂O₂ ocurre tras la formación del CIII, que conduce a parte de la proteína hacia la inactivación.

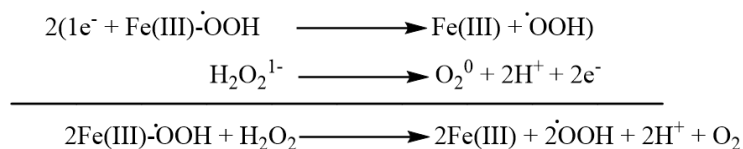
Adicionalmente, se analizó por el método de balance redox las reacciones individuales para el mecanismo típico propuesto para la formación y decaimiento del CIII a partir de la especie Fe(III)-OOH. Para la formación del CIII clásicamente propuesto a partir de Cl, se encontró en el balance que no es consistente, pues requiere que tanto el hierro del Cl como el H₂O₂ se reduzcan demostrando la ausencia de la especie que debería oxidarse para dar sentido al método redox (Esquema 5).



Esquema 5. Formación de la especie Fe(III)- $\overset{\cdot}{\text{O}}\text{OH}$ por el método de balance Redox.

El balance redox individual del decaimiento de la especie lo demuestra posible si consideramos la oxidación del H_2O_2 y la reducción del CIII para el restablecimiento del estado basal (Esquema 6); sin embargo, como se demostró en el párrafo anterior, este paso está limitado por la inconsistencia en la formación del CIII clásico que requiere la reducción en ambas semirreacciones.

Decaimiento de la especie Fe(III)- $\overset{\cdot}{\text{O}}\text{OH}$ por el método de balance redox



Esquema 6. Decaimiento de la especie Fe(III)- $\overset{\cdot}{\text{O}}\text{OH}$ al estado basal por el método de balance Redox

CONCLUSIONES

En conclusión, fue posible comprobar la formación de los intermediarios descritos clásicamente para las hemoperoxidasas (CI y CII), así como el restablecimiento del estado basal de la ZoPrx luego de cumplir su ciclo catalítico.

Se demostró el restablecimiento del estado basal de la ZoPrx luego de su incubación en exceso de H_2O_2 , incluso incubando el estado basal regenerado de la primera exposición a exceso de H_2O_2 por segunda ocasión.

Adicionalmente, se obtuvieron los parámetros cinéticos de k_1 y k_3 (formación de CI y restablecimiento del estado basal partiendo de CII, respectivamente) partiendo del estado basal nativo y de un estado basal regenerado que permitieron proponer la equivalencia de los intermediarios luego de la exposición de la ZoPrx a excesos de H_2O_2 .

Se comprobó la similitud entre el CIII de hemoperoxidasas (ZoPrx y HRPA2) y especies hidroxiladas de otras hemoproteínas, tanto por UV-Vis como por EPR.

Se caracterizó por resonancia Raman el CIII tanto de la ZoPrx como de la HRPA2 con una asignación de casi todas las bandas presentes en los espectros. Esta caracterización demostró que el CIII es una especie hidroxilada y no una especie peroxil ferril como se propuso inicialmente.

En conjunto, todas las evidencias obtenidas en este trabajo permitieron identificar la formación de especies hidroxiladas cuando las hemoperoxidasas son incubadas en exceso de H_2O_2 , dando una nueva identidad estructural al CIII, misma que fue justificada y demostrada por el balance redox de las semirreacciones a partir de CI.

REFERENCIAS

-
- ¹ Kendrick, M. J., May, T. M., Plishka, M. J. & Robinson, K. D. (1992). *Metals in Biological Systems*. Cap. 9. Ellison Horwood.
- ² Kaim, W. & Schwederski, B. & Klein, A. (1991). *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. An Introduction and Guide*. Cap. 6. Board.
- ³ Hughes, M. N. (1981). *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*. Cap. 1. John Wiley & Sons.
- ⁴ Valderrama, B.; Ayala, M.; Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. & Biol.* **9**, 555-565.
- ⁵ Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 462-468.
- ⁶ Peroxibase.toulouse.inra.fr. (2016). The proxiBase-introduction. Recuperado de <http://www.citethisforme.com/help> [noviembre 2016].
- ⁷ Spadiut, O. & Herwig, C. (2013). Production and purification of the multifunctional enzyme horseradish peroxidase. *Pharm. Bioprocess.* **1** (3), 283-295.
- ⁸ Dunford, H. B. (1991). In peroxidases in Chemistry and Biology, (Everse, J., Everse, K. E., & Grisham, M. B., Eds) **Vol 2**, 1-24 CRC Press: Boca Raton, FL.
- ⁹ Veitch, N. C. (2004). Horseradish Peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* **65**, 249-259.
- ¹⁰ Zakharova, G. S., Uporov, I. V. & Tishkov, V. I. (2011). Horseradish Peroxidase: Modulation and Properties by Chemical Modification of Protein and Heme. *Biochemistry.* **76** (13), 37-64.
- ¹¹ Howes, D. B., Feis, A., Raimondi, L., Indiana, C. & Smulevich, G. (2001). The Critical Role of the Peroximal Calcium Ion in the Structural Properties of Horseradish Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 40704-40711.
- ¹² Hiner, A. N. P., Sidrach, L., Chazarra, S., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F. & Rodríguez-López, J. N. (2003). Compound I Formation in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Peroxidase Is Modulated by the Equilibrium between Pentacoordinated and 6-Aquo Hexacoordinated Forms. *Biochemistry* **42**, 8799-8808.
- ¹³ Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology* **53**, 253-263.
- ¹⁴ Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews* **3**, 3-18.
- ¹⁵ Torres, E. & Ayala, M. (2010). *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Cap. 4 y 11. Springer.
- ¹⁶ Dunford, H. B. (1999). *Hemo peroxidases*. Cap. 1 y 2. Wiley-VCH. Alberta, Canada.
- ¹⁷ Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T. & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology* **4**, 1032-1038.
- ¹⁸ Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H. & Gold, M.H. (1993) Crystallographic Refinement of Lignin Peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* **268**, 4429-4440.
- ¹⁹ Verdín, J., Pogni, R., Beza, A., Baratto, M. C., Basosi, R. & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Mechanism of versatile peroxidase inactivation by Ca²⁺ depletion. *Biophysical Chemistry.* **121**, 163-170.
- ²⁰ Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plants, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 388-393.
- ²¹ Ostergaard, L., Abelskov, A. K., Mattsson, O. & Welinder, K. G. (1996). Structure and organ specificity of an anionic peroxidase from *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture. *FEBS Letters* **398**, 243-247.
- ²² Wormald, M. R. & Dwek, R. A. (1999). Glycoproteins: Glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7** (7), 155-160.
- ²³ Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**, 255-265.
- ²⁴ Tams, J. W., & Wlinder, K. G. (1995). Mild Chemical Deglycosylation of Horseradish Peroxidase Yields a Full Active, Homogeneous Enzyme. *Analytical Biochemistry.* **228**, 48-55.
- ²⁵ Lige, B., Ma, S., & van Huystee, R. B. (2001). The Effects of the Site-Directed Removal of N-Glycosylation from Cationic Peanut Peroxidase on Its Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **386**, 17-24.

- ²⁶ Zamorano, L. S., Pina, D. G., Arellano, J. B., Bursakov, S., Zhadan, A. P., Calvete, J. J., Sanz, L., Nielsen, P. R., Villar, E., Gavel, O., Roing, M. G., Watanabe, L., Polikarpov, I., & Shnyrov, V. L. (2008). Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability. *Biochimie*. **90**, 1737-1749.
- ²⁷ Jiménez Arroyo N. (2012). Estructura Cristalográfica de la Zo-Peroxidasa de *Raphanus sativus* L. Daikon. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM-IBT.
- ²⁸ Watanabe, L., De Moura, P. R., Bleicher, L., Nascimento, A. S., Zamorano, L. S., Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Bursakov, S., Roig, M. G., Shnyrov, V. L., & Polikarpov, I. (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*. **169**, 226-242.
- ²⁹ Chen, Q., Heller, A. & Kenausis, G. L. (2000). In Biosensors and their applications, (Yang, V. C. and Ngo, T. T., Eds.), 99–112. Springer US, Boston, MA.
- ³⁰ Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J., & Litt, G. J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *Journal of immunological methods*. **125**, 279–285)
- ³¹ Bansal, N., & Kanwar, S. S. (2013). Peroxidase(s) in environment protection. *The Scientific World Journal*. **2013**, 1-9.
- ³² Valle Altamirano R. G. (2014). Caracterización Espectroscópica de Metaloproteínas. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas UNAM.
- ³³ Hersleth, H. P., Ryde, U., Rydberg, P., Gorbitz, C. H., & Andersson, K. K. (2006). Structure of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *J. Inorg. Biochem*. **100**, 460-476.
- ³⁴ Poulos, T. L., & Kraut, J. (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem*. **255**, 8199-8205.
- ³⁵ Everse, J. (1998). The Structure of Heme Proteins Compounds I and II: Some Misconceptions. *Free Radical Biology & Medicine* **24**, 1338-1346.
- ³⁶ Henriksen, A., Smith, A. T. & Gajhede, M. (1999). The Structures of the Horseradish Peroxidase C-Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates. *J. Biol. Chem*. **274**, 35005-35011.
- ³⁷ Hiner, A., Hernández-Ruíz, J.,Rodríguez-López, J. N., Arnao, M. B., Varón, R. & García-Cánovas, F. (2001). The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem*. **6**, 504-516.
- ³⁸ Keilin, D. & Mann, T. (1937). On the Haematin Compound of Peroxidase. *Biological Science* **122**, 119-133.
- ³⁹ Blumberg, W. E., Peisach, J., Wittemberg, B. A. et al. (1968). The electronic structure of protoheme proteins. I. An electron paramagnetic resonance and optical study of horseradish peroxidase and its derivatives. *J. Biol. Chem*. **243**, 1854-1862.
- ⁴⁰ Wittemberg, B. A., Wittemberg, J. B., Peisach, J. et al. (1970). On the state of the iron and the nature of the ligand on in oxyhemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **67**, 1846-1862.
- ⁴¹ Peisach, J., Blumberg, W. E., Wittenberg, B. A. & Wittenberg, J. B. (1968). Electronic structure of protoheme proteins. III. Configuration of the heme and its ligands. *J. Biol. Chem*. **243**, 1871–1880.
- ⁴² Palaniappan, V. & Turner, J. (1989). Resonance Raman Spectroscopy of Horseradish Peroxidase Derivatives and Intermediates with Excitation in the Near Ultraviolet*. *The Journal of Biological Chemistry*. **264**. 16046-16053.
- ⁴³ Graeme, H. & Lawrence B. (2009). *High Resolution EPR Applications to Metalloenzymes and Metals in Medicine*. Cap. 8. Springer.
- ⁴⁴ Howes, D. B., Schiødt, C. B., Welinder, K. G., Marzocchi, M. P., Ma, J., Zhang, J., Shelnut, J. A. & Smulevich, G. (1999). The Quantum Mixed-Spin Heme State of Barley Peroxidase: A Paradigm for Class III Peroxidases, *Biophysical Journal* **77**, 478–492.
- ⁴⁵ Chio, S., Spiro, T. G., Langry, K. C., Smith, K. M., Budd, D. L. & La Mar G. L. (1982). Structural Correlations and Vinyl Influences in Resonance Raman Spectra of Protoheme Complexes and Proteins. *J. Am. Chem. Soc*. **104**, 4345-4351.
- ⁴⁶ Turner, J., Sitter, A. J. & Reczek, C. M. (1985). Resonance Raman spectroscopic characterizations of horseradish. Observation of the Fe^{IV}=O stretching vibration of Compound II. *Biochimica et Biophysica Acta*. **828**, 73-80.

-
- ⁴⁷ Sitter, A. J., Shifflett, J. R. & Terner, J. (1988). Resonance Raman Spectroscopic Evidence for Heme Iron-Hydroxide Ligation of Peroxidase Alkaline Forms. *The Journal of Biological Chemistry*. **263**, 13032-13038.
- ⁴⁸ Feis, A., Marzocchi, M. P., Paoli, M. & Smulevich, G. (1994). Spin State and Axial Ligand Bonding in the Hydroxide Complexes of Metmyoglobin, Methemoglobin, and Horseradish Peroxidase at Room and Low Temperatures*. *Biochimistry*. **33**, 4577-4583.
- ⁴⁹ Smulevich, G. (1998). Understanding Heme Cavity Structure of Peroxidases: Comparison of Electronic Absorption and Resonance Raman Spectra with Crystallographic Results. *Biospectroscopy*. **4**, S3-S17.
- ⁵⁰ Sitter, A. J., Reczek, C. M & Terner, J. (1985). Heme-linked Ionization of Horseradish Peroxidase Compound II Monitored by the Resonance Raman Fe(IV)=O Stretching Vibration*. *The Journal of Biological Chemistry*. **260**, 7515-7522.
- ⁵¹ Zimmer, J. & Van Wart, HE. (1982). Resonance Raman spectrum of horseradish peroxidase compound III: comparison with oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 977-981.
- ⁵² Cuadrado, N. H., Zhadan, G. G., Roing, M. G., & Shnyrov, V. L. (2011). Suicide inactivation of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*. **49**, 1078-1082.
- ⁵³ Valderrama, B., García-Arellano, H., Giansanti, S., Baratto, M. C., Pogni, R., Vazquez-Duhalt, R. (2006). Oxidative stabilization of iso-1-cytochrome c by redox-inspired protein engineering. *The FASEB Journal*. **20**, E472-E481.
- ⁵⁴ Hiner, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Arnao, M.B., Lloyd R. E., Garcia-Canovas, F., & Acosta, M. (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide to form compound III. *Biochem. J.* **348**, 321-328.
- ⁵⁵ Hiner, A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F., Smith, A. T., Arnao, M. B., & Acosta, M. (1995). A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* **234**, 506-512.
- ⁵⁶ Aitken, M. D., & Heck, P. E. (1998). Turnover Capacity of *Coprinus cinereus* Peroxidase for Phenol and Monosubstituted Phenols. *Biotechnol. Prog.* **14**, 487-492.
- ⁵⁷ Mahmoudi, A., Nazari, K., Khosraneh, M., Mohajerani, B., Kelay, V., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2008). Can amino acids protect horseradish peroxidase against its suicide-peroxide substrate? *Enzyme and Microbial Technology*. **43**, 329-335.
- ⁵⁸ Nazari, K., Mahmoudi, A., Khodafarin, R., Moosavi-Movahedi, A. A., & Mohebi, A. (2005). Stabilizing and Suicide-Peroxide Protecting Effect of Ni²⁺ on Horseradish Peroxidase. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2**, 232-237.
- ⁵⁹ Gil Rodriguez P. (2006). Zo Peroxidasas: Mecanismo de Reacción de una Peroxidasa Intrínsecamente estable al peróxido de hidrógeno. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM-IBT.
- ⁶⁰ Gil-Rodríguez, P., Ferreira-Batista, C. Vázquez-Duhalt, R. & Valderrama, B. (2008). A Novel Heme Peroxidase from *Raphanus sativus* Intrinsically Resistant to Hydrogen Peroxide. *Eng. Life. Sci.* **3**, 286-296.
- ⁶¹ Welinder, K. (1992). Plant peroxidases: structure–function relationships. In: Plant Peroxidases, (Penel, C., Gaspar, T., and Greppin, H., Eds.) University of Geneva, Geneva, 1-24.
- ⁶² Fielding, A. J., Brodhun, F., Koch, C., Pievo, R., Denysenkov, V., Feussner, I. & Bennati, M. (2011). Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance Characterization of PpoA, a CYP450 Fusion Protein that Catalyzes Fatty Acid Dioxygenation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9052–9062.
- ⁶³ Patterson, W. R., Poulos, T. L. J. & Goodins, B. D. (1995). Identification of a Porphyrin π Cation Radical in Ascorbate Peroxidase Compound I. *Biochemistry* **34**, 4342-4345.
- ⁶⁴ Jensen, K. P. & Ryde, U. (2004). How O₂ Binds to Heme: Reasons for Rapid Binding and Spin Inversion. *J. Biol. Chem.* **279**, 14561-14569.
- ⁶⁵ Jones, D. K., Dalton, D. A., Rosell, F. I. & Raven, E. L. (1998). Class I Heme Peroxidases: Characterization of Soybean Ascorbate Peroxidase *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **360**, 173–178.
- ⁶⁶ Álvarez García, C. (2012). Transformación de proteínas de sangre. Propiedades funcionales de materias primas y productos. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo.

-
- ⁶⁷ Ríos Camacho, J. C. (2012). Elaboración de Soportes de Colágeno Tipo I Asociados a Hemoglobina Aislada de Sangre Periférica Humana. Tesis Doctoral. Posgrado Interfacultades de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.
- ⁶⁸ Leonard, J. J., Yonetani, T. & Callis, J. B. (1974). A Fluorescence Study of Hybrid Hemoglobins Containing Free Base and Zinc Protoporphyrin IX. *Biochemistry*. **13**, 1460-1464.
- ⁶⁹ Mansouri, A. & Winterhalter, K. H. (1973). Nonequivalence of Chains in Hemoglobin Oxidation. *Biochemistry*. **12**, 4946-4949.
- ⁷⁰ Lehninger. (2009). Principios de Bioquímica, (Nelson, D. L. & Cox, M. M., Eds.) **6**, 183-234. Omega.
- ⁷¹ Beratan, D. N.; Onuchic, J.N.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. (1992). Electron-tunneling pathways in proteins. *Science*, **258**, 1740-1741.
- ⁷² Feis, A., Howes, B. D., Indiani, C. & Smulevich, G. (1998). Resonance Raman and Electronic Absorption Spectra of Horseradish Peroxidase Isozyme A2: Evidence for a Quantum-Mixed Spin Species. *Journal of Raman Spectroscopy*. **29**, 933-938.
- ⁷³ Bjerneld, E. J., Földes-Papp, Z., Käll, M. & Rigler, R. (2002). Single-Molecule Surface-Enhanced Raman and Fluorescence Correlation Spectroscopy of Horseradish Peroxidase. *J. Phys. Chem. B*. **106**, 1213-1218.
- ⁷⁴ Terner, J. & Reed, D. E. (1984). Resonance Raman Spectroscopic Characterization of the Heme Coordination and Spin State in the Alkaline Form of Horseradish Peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **789**, 80-86.
- ⁷⁵ Asher, S. A., Vickery, L. E., Schuster, T. M. & Sauer, Kenneth. (1974). Resonance Raman Spectra of Methemoglobin Derivatives. Selective Enhancement of Axial Ligand Vibrations and Lack of an Effect of Inositol Hexaphosphate. *Biochemistry*. **16**, 5849-5856.
- ⁷⁶ Ozaki, Y., Kitagawa, T. & Kyogoku, Y. (1976). Raman-Study of the Acid-Base Transition of Ferric Myoglobin; Direct Evidence for the Existence of Two Molecular Species at Alkaline pH. *Febs Letters*. **62**, 369-372.
- ⁷⁷ Smulevich, G., Mauro, J. M., Fishel, L. A., English, A. M., Kraut, J., & Spiro, T. G. (1988). Cytochrome c Peroxidase Mutant Active Site Structures Probed by Resonance Raman and Infrared Signatures of the CO Adducts. *Biochemistry*. **27**, 5486-5492.
- ⁷⁸ Kitagawa, T., Abe, M., & Ogoshi. (1978). Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and meso deuterated and 15N substituted derivatives. I. Observation and assignments of nonfundamental Raman lines. *J. Chem. Phys.* **69**, 4516-4525.
- ⁷⁹ Abe, M., Kitagawa, T., & Kyogoku, Y. (1978). Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and meso deuterated and 15N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J. Chem. Phys.* **69**, 4526-4534.
- ⁸⁰ Choi, S., Spiro, T. G., Langry, K. C., & Smith, K. M. (1982). Vinyl Influences on Protoheme Resonance Raman Spectra: Nickel(II) Protoporphyrin IX with Deuterated Vinyl Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4337-4344.
- ⁸¹ Li, X. Y., Czernuszewicz, R. S., Kincaid, J. R., Su, Y. O., & Spiro, T. G. (1990). Consistent Porphyrin Force Field. 1. Normal-Mode Analysis for Nickel Porphine and Nickel Tetraphenylporphine from Resonance Raman and Infrared Spectra and Isotope Shifts. *J. Phys. Chem.* **94**, 31-47.
- ⁸² Spiro, T. G. (1975). Resonance Raman Spectroscopic Studies of Heme Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **416**, 169-189.
- ⁸³ Indiani, C., Feis, A., Howes, B. D., Marzocchi, M. P. & Smulevich, G. (2000). Benzohydroxamic Acid-Peroxidase Complexes: Spectroscopic Characterization of a Novel Heme Spin Species. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7368-7376.
- ⁸⁴ Pogni, R., Baratto, M. C., Giansanti, S., Teutloff, C., Verdin, J., Valderrama, B., Lenzian, F., Lubitz, W., Vazquez-Duhalt, R., & Basosi, R. (2005). Tryptophan-Based Radical in the Catalytic Mechanism of Versatile Peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry*. **44**, 4267-4274.
- ⁸⁵ Roberts, J. E., Hoffman, B. M., Rutter R., & Hager, L. P. (1981). Electron-Nuclear Double Resonance of Horseradish Peroxidase Compound I. *J. Biol. Chem.* **256**, 2118-2121.
- ⁸⁶ Benecky, M. J., Frew, J. E., Scowen, N., Jones, P., & Hoffman, B. M. (1993). EPR and ENDOR Detection of Compound I from *Micrococcus lysodeikticus* Catalase. *Biochemistry*. **32**, 11929-11933.
- ⁸⁷ Ivancich, A., Mazza, G., & Desbois, A. (2001). Comparative Electron Paramagnetic Resonance Study of Radical Intermediates in Turnip Peroxidase Isozymes. *Biochemistry*. **40**, 6860-6866.

-
- ⁸⁸ Peisach, J., Blumberg, W. E., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B., & Kampa, L. (1969). Hemoglobin A: An Electron Paramagnetic Resonance study of the effects of interchain contacts on the Heme symmetry of High-Spin and Low-Spin derivatives of ferric alpha chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 934-939.
- ⁸⁹ Di Iorio, E. E., Winterhalter, K. H., Mansouri, A., Blumberg, W. E. & Peisach, J. (1984). Studies on the oxidation of hemoglobin Zurich (beta₆₃ E7 Arg. *Eur. J. Biochem.* **145**, 549-554.
- ⁹⁰ Davydov, R., Laryukhin, M., Ledbetter-Rogers, A., Sono, M., Dawson, J. H., & Hoffman, B. M. (2014). Electron Paramagnetic Resonance and Electron-Nuclear Double Resonance Studies of the Reactions of Cryogenerated Hydroperoxoferric-Hemoprotein Intermediates. *Biochemistry.* **53**, 4894-4903.
- ⁹¹ Davydov, R., Osborne, R. L., Kim, S. H., Dawson, J. H., & Hoffman, B. M. (2008). EPR and ENDOR Studies of Cryoreduced Compounds II of Peroxidases and Myoglobin. Proton-Coupled Electron Transfer and Protonation Status of Ferryl Hemes. *Biochemistry.* **47**, 5147-5155.
- ⁹² Benesch, R. E., Benesch, R. & Yung, S. (1973). Equations for the Spectrophotometric Analysis of Hemoglobin Mixtures. *Analytical Biochemistry.* **55**, 245-248.
- ⁹³ Spiro, Y. G. & Strekas T. C. (1972). Hemoglobin: Resonance Raman Spectra. *Biochimica et Biophysica Acta.* **263**, 830-833.
- ⁹⁴ Yamamoto, T. & Palmer, G. (1973). The Valence and Spin State of Iron in Oxyhemoglobin as Inferred from Resonance Raman Spectroscopy*. *The Journal of Biological Chemistry.* **248**, 5211-5213.