



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**NITRORREDUCTASAS DE *Salmonella typhimurium* EN LA
TRANSFORMACIÓN DE NITRO COMPUESTOS Y
QUINONAS DE INTERÉS BIOLÓGICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

SANDRA GIOVANNA SALAMANCA PINZÓN

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

MÉXICO D. F.

Octubre, 2007



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de junio de 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SANDRA GIOVANNA SALAMANCA PINZON** con número de cuenta 501459705, con la tesis titulada: **"NITRORREDUCTASAS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM EN LA TRANSFORMACIÓN DE NITROCOMPUESTOS Y QUINONAS DE INTERÉS BIOLÓGICO"**, realizada bajo la dirección de la **DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**.

Presidente: Dr. Edgar Escamilla Marván
Vocal: Dr. Bernado Antonio Frontana Uribe
Vocal: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Vocal: Dra. Regina Montero Montoya
Secretario: Dra. Adela Rodríguez Romero

De acuerdo con lo anterior, la alumna se apegó a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (29 septiembre de 2006).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de Octubre de 2007.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

APOYO RECIBIDO:

Beca para realización de estudios de Doctorado otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), Universidad Nacional Autónoma de México (2004-2008)

Beca otorgada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN223205, UNAM (2005-2007)

JURADO:

DR. Edgardo Escamilla Marván
DR. Bernardo Antonio Frontana Uribe
DRA. Sandra Luz Gómez Arroyo
DRA. Regina Montero Montoya
DRA. Adela Rodríguez Romero

A mi madre y a Alejandro, por supuesto.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutor, el Dr. Javier Espinosa por enseñarme el verdadero significado del camino hacia la vocación científica y dejar en mis manos tantas decisiones. Por proporcionarme la oportunidad de estar en su laboratorio y al igual que mis asesores la Dra. Adela Rodríguez Romero y el Dr. Bernardo Frontana Uribe, por sus recomendaciones y valiosos comentarios que quedarán reflejados en esta Tesis Doctoral como evidencia de su excelente labor crítica e intelectual.

Al Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, a la Dra. María Eugenia Gonsebatt y en especial a la Dra. Regina Montero por su apoyo siempre incondicional a nivel académico y personal. Al Dr. Rafael Camacho Carranza quien como nadie me supo regalar de sí las mejores enseñanzas durante este tiempo, por todos los invaluable aportes para esta tesis, por su valor, por su entrega desmedida a la ciencia, por ser mi mejor ejemplo de seguir adelante y demostrarme que existen personas en este mundo que pueden hacer de su vida su pasión.

A mi padre, a mis hermanos Andrea y David y a toda mi familia por su amoroso apoyo. A mis colegas y siempre amigos Alberto Guevara, Adrián Sandoval, Víctor Dávila, Antonio Vallecillo, Wendy Xolalpa, Ana Valencia, Angela Forero, Perla Leal y Sandra Hernández, por su risa, sus palabras, sus oídos y sus abrazos. Por acompañarme en tantas discusiones filosóficas acerca de la ciencia, la vida y el amor.

A mis compañeros de laboratorio y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, perdón por no mencionarlos a todos. A la Dra. Clara Espítia Pinzón y su extraordinario equipo de trabajo. A mis amigos y a mis alumnos por recibir de mi parte lo que les pude dejar durante este camino recorrido juntos y a todos aquellos que de una u otra forma hicieron de esta tesis no solo un trabajo escrito o pretexto de existencia sino una experiencia de vida, fortaleza y perseverancia, porque la suerte no existe y porque cuando el talento no alcanza solo la disciplina y el amor materializa los sueños hasta hacerlos realidad.

RECONOCIMIENTOS:

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado en el Laboratorio del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado en el marco del proyecto **PAPIIT IN223205**. “2005-2007”.

Asimismo se agradece el apoyo económico y técnico prestado por:

- Beca para realización de estudios de Doctorado otorgada por la DGEP-UNAM (2004-2008).
- Dr. Rafael Camacho Carranza, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental – IIB UNAM
- Laboratorio de la Dra. Clara Espitia Pinzón, Departamento de Inmunología – IIB UNAM
- Laboratorio del Dr. Bernardo Frontana Uribe, Instituto de Química UNAM
- Laboratorio de la Dra. Adela Rodríguez Romero, Instituto de Química UNAM

ARTICULOS PUBLICADOS, DISTINCIONES Y PRESENTACION DEL TRABAJO

El presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos y simposios:

- The Second International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering. Cinvestav. Ciudad de México, México. Septiembre 26-29, 2006.
Presentación de poster: Nitroreductases from *Salmonella typhimurium* in the metabolism of Environmental Nitrocompounds
- EMS 37th Annual Meeting. Genetic and Environmentally Induced Genotoxicity: Causes and Impact. Vancouver, British Columbia, Canadá. Septiembre 16-23, 2006.
Presentación de poster: Differential mutagenic response of nitrocompounds in accordance to nitroreductase activation
- VI Congreso Latinoamericano de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ambiental. XIV Congreso Argentino de Toxicología. ATA, ALAMCTA. Mendoza, Argentina. Noviembre 1-4, 2005
Presentación de poster: Nitrocompounds activation by nitroreductases from *Salmonella typhimurium* strains
- ISSX 13TH N.A. Meeting JSSX 20TH Meeting. International Society for the Study of Xenobiotics. Maui, Hawaii, USA. Octubre 23-27, 2005
Presentación de poster: Nitrocompound activation by nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains
- XXV Congreso Nacional de Bioquímica. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ixtapa-Zihuatanejo, México. Noviembre 28-Dic 3, 2004
Presentación de poster: Relación entre la actividad nitroreductasa de cepas de *Salmonella typhimurium* y el potencial redox de nitrocompuestos ambientales

Publicaciones:

- **S.G. Salamanca-Pinzón**, R. Camacho-Carranza, S.L. Hernández-Ojeda, J.J. Espinosa-Aguirre. 2006. Nitrocompound Activation by Cell-Free Extracts of Nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains. *Mutagenesis*. 2006 Nov;21(6):369-74. Epub 2006 Sep 23.
- Caballero-Salazar S., Pérez-López I., Vences-Mejía A., Camacho-Carranza R., **Salamanca-Pinzón S.G.** Espinosa-Aguirre J.J. 2005. Promutagen activation by *Helicobacter pylori* lysates. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (Supl. 1) 91-96

Distinciones:

- 2006, Molecular Biology Applications to Environmental Problems, **Environmental Biotechnology best poster presentation and winner of “Professor Carlos Casas Campillo” award.** “The Second International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering. Cinvestav. Ciudad de México, México. Septiembre 26-29, 2006.
- 2005, **Distinción como la mejor presentación en la sección de posters del área de Genotoxicidad y Mutagénesis.** VI Congreso Latinoamericano de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ambiental. XIV Congreso Argentino de Toxicología. ATA, ALAMCTA. Mendoza, Argentina. Noviembre 1-4, 2005

*“Sostienen su opinión porque es propia, no porque sea la verdadera,
no buscan la verdad sino el triunfo”*

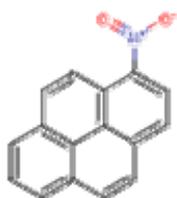
San Agustín

INDICE

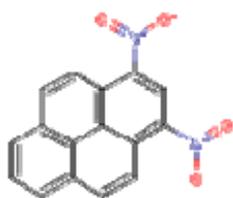
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Características generales de las nitro/flavín reductasas.....	5
2.1.1. Nitrorreductasas SnrA y Cnr de <i>Salmonella typhimurium</i>	9
2.1.2. Características estructurales y bioquímicas de las nitro/flavín reductasas.....	12
2.1.3. Actividad nitro/flavín reductasa y su implicación fisiológica.....	18
CAPITULO 3. OBJETIVOS HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO.....	22
CAPITULO 4. MATERIALES Y METODOS.....	24
4.1. Selección de los nitrocompuestos y quinonas.....	24
4.2. Pruebas de mutagenicidad.....	24
4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	24
4.2.2. Preparación de los extractos citosólicos y determinación de su actividad.....	25
4.2.3. Nitrocompuestos y determinación de la actividad mutagénica.....	26
4.3. Pruebas bioquímicas.....	26
4.3.1. Pruebas preliminares.....	26
4.3.1.1. Ensayo de actividad nitrorreductasa.....	27
4.3.1.1.1. Reducción de nitrofurantoína.....	27
4.3.1.1.2. Oxidación de NADPH.....	27
4.3.2. Obtención de las nitrorreductasas SnrA y Cnr purificadas.....	28
4.3.2.1. Amplificación y clonación de SnrA y Cnr.....	28
4.3.2.2. Expresión y purificación de SnrA y Cnr.....	31
4.3.3. Pruebas bioquímicas con las nitrorreductasas SnrA y Cnr purificadas.....	32
4.3.3.1. Compuestos.....	32
4.3.3.2. Determinación preliminar de los parámetros cinéticos de los nitrocompuestos y	32

<i>quinonas</i>	
4.3.3.3. <i>Actividad nitro y quinona reductasas de SnrA y Cnr</i>	33
4.4. Pruebas electroquímicas.....	33
4.4.1. <i>Obtención del potencial de media onda, parámetros de medición y condiciones de prueba</i>	33
CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
5.1. Pruebas de mutagenicidad.....	35
5.2. Pruebas bioquímicas.....	41
5.2.1. Pruebas preliminares.....	41
5.2.2. Ensayo de actividad nitrorreductasa con los extractos citosólicos.....	43
5.2.3. Purificación de las nitrorreductasas SnrA y Cnr.....	45
5.2.3.1. <i>Amplificación por PCR y clonación de los genes snrA y cnr</i>	45
5.2.3.2. <i>Expresión y purificación de SnrA y Cnr</i>	48
5.2.4. Determinación de los parámetros cinéticos con SnrA y Cnr purificadas	51
5.3. Pruebas electroquímicas.....	55
5.4. Integración, análisis de resultados y discusión final.....	56
CAPITULO 6. CONCLUSIONES GENERALES.....	65
REFERENCIAS.....	66

RELACION DE COMPUESTOS Y ABREVIATURAS



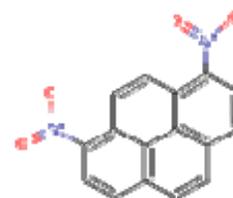
1-Nitropireno
(1NP)



1,3-Dinitropireno
(1,3DNP)



1,6-Dinitropireno
(1,6DNP)



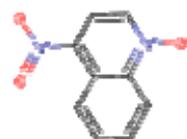
1,8-Dinitropireno
(1,8DNP)



2-Nitrofluoreno
(2NF)



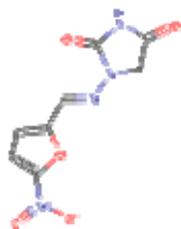
2,7-Dinitrofluoreno
(2,7DNF)



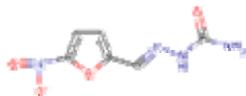
4-Nitroquinolina 1-oxido
(4NQNO)



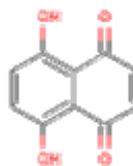
Metronidazol
(MTZ)



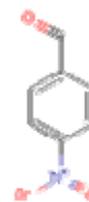
Nitrofurantoína
(NFN)



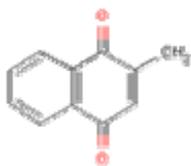
Nitrofurazona
(NFZ)



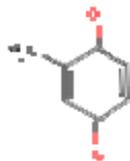
5,8-Dihidroxi-1,4-Naftoquinona
(5,8-DH-1,4-NQ)



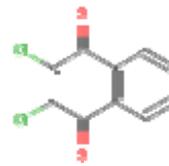
4-Nitrobenzaldehido
(4-NBZ)



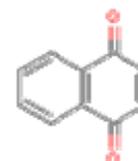
2-Metil-1,4-Naftoquinona
(2-M-1,4NQ)



2-Metil-1,4-Benzoquinona
(2-M-1,4BQ)



2,3-Dicloro-1,4-Naftoquinona
(2,3-DC-1,4-NQ)



1,4-Naftoquinona
(1,4-NQ)

A⁺ = Cepa deficiente en Cnr, extracto citosólico de esta cepa (SnrA⁺)
AB⁻ = Cepa deficiente en Cnr y SnrA, extracto citosólico de esta cepa (SnrA⁻, Cnr⁻)
AB⁺ = Cepa silvestre, extracto citosólico de esta cepa (SnrA⁺, Cnr⁺)
B⁺ = Cepa deficiente en SnrA, extracto citosólico de esta cepa (Cnr⁺)
ANDEVA = Análisis de varianza
CnrF/CnrR = Oligonucleótidos de inicio y final para la amplificación del gen *cnr*
DME = Dropping Mercury Electrode
DMSO = Dimetilsulfóxido
DNTP's = Nucleótidos trifosfatados empleados en la mezcla de PCR
DTT = Dithiothreitol
FMN = Favínmononucleótido
*His*₆ = Secuencia de seis histidinas agregada a las nitrorreductasas para su purificación
HMDE = Hanging Mercury Drop Electrode
Hq = Hidroquinona
IMAC = Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG = Isopropyl thiogalactoside
Kb = Kilo pares de bases
kDa = Kilo dalton
MPM = Marcador de peso molecular
mV = Milivoltios
μl = microlitro
nmol = nanomol
NB = Nutrient broth (medio de cultivo nutritivo)
Pb = Pares de bases
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
pET15-B = Vector de expresión (Novagen®)
Pfx = AND polimerasa
rpm = Revoluciones por minuto
SnrAF/SnrAR = Oligonucleótidos de inicio y final para la amplificación del gen *snrA*
Sq = semiquinona
U = unidades de enzima μmol/min
x g = gravedades

RESUMEN

Sandra Giovanna Salamanca Pinzón. Nitrorreductasas de *Salmonella typhimurium* en la transformación de nitro compuestos y quinonas de interés biológico

Director de tesis: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Las nitrorreductasas bacterianas catalizan la reducción insensible al oxígeno de diversos compuestos nitroaromáticos y quinonas. En *Salmonella typhimurium*, se han descrito dos nitrorreductasas denominadas SnrA y Cnr las cuales comparten un grupo común de sustratos. Evidencias previas permiten plantear la hipótesis de que la actividad de las dos nitrorreductasas hacia sus sustratos es diferente (Carroll y col. 2002, Nokhbeh y col. 2002 y Watanabe y col. 1989), siendo el potencial de óxido reducción uno de los factores que determina probablemente las diferencias catalíticas entre las dos enzimas. A partir de la prueba de Ames realizada con seis nitrocompuestos y los extractos citosólicos de cuatro cepas de *S. typhimurium* (silvestre, deficiente en SnrA, deficiente en Cnr y doble mutante) se encontró una respuesta diferente a nivel de la mutagenicidad. Todos los nitrocompuestos fueron más mutagénicos después de la activación metabólica con cualquiera de los extractos que contenía las nitrorreductasas; sin embargo, la respuesta mutagénica fue mayor en el extracto citosólico que contenía a Cnr. Con el fin de diferenciar la actividad de SnrA y Cnr, se probaron varios nitrocompuestos y quinonas y se determinaron los parámetros cinéticos para estos compuestos, utilizando las enzimas purificadas. Los valores de potencial redox de los diferentes compuestos evaluados fueron obtenidos electroquímicamente mediante polarografía normal de pulsos y voltamperometría cíclica y se relacionaron con los valores de potencia mutagénica (numero de revertantes por nanomol de compuesto) y los valores de eficiencia catalítica V_{max}/K_m de cada nitrorreductasa. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la actividad de la nitrorreductasa Cnr depende del potencial redox de los sustratos, tanto a nivel biológico medido en la prueba de mutagenicidad, como a nivel bioquímico. A pesar de que la actividad nitrorreductasa de SnrA es mucho mayor que la de Cnr en los ensayos bioquímicos, su actividad nitrorreductasa, no está relacionada con las propiedades redox de sus sustratos. La discusión de estos resultados se enfoca hacia las diferencias entre las dos enzimas a nivel estructural, al igual que su posible implicación dentro del proceso de mantenimiento del estado redox intracelular.

Palabras clave: *Salmonella typhimurium*, nitrorreductasas, potencial redox, nitrocompuestos, quinonas

SUMMARY

Sandra Giovanna Salamanca Pinzón. Transformation of nitro compounds and quinones with biological relevance by nitroreductases from *Salmonella typhimurium*

Advisor: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Bacterial nitroreductases catalyze the oxygen-insensitive reduction of several nitrocompounds and quinones. Two nitroreductases, SnrA and Cnr has been described in *Salmonella typhimurium* and reduce the same substrate group. Considering experimental evidence about the differences between SnrA and Cnr activity (Carroll *et al.*, 2002, Nokhbeh *et al.*, 2002 y Watanabe *et al.*, 1989), in this work is proposed that the redox potential of substrates is the principal characteristic that differentiates their nitroreductase activity. Results from the Ames mutagenicity test done with six nitrocompounds and the cytosolic fraction of four *S. typhimurium* strains, (wild type, SnrA deficient, Cnr deficient and double mutant) shown that mutagenic response is different after metabolic activation, especially when the Cnr cytosolic fraction was used. Therefore, different nitrocompounds and quinones were tested with SnrA and Cnr purified. The kinetic parameters were also determined. The redox potential values were obtained using electrochemical methodologies like Normal pulse polarography and cyclic voltamperometry and they were analyzed with mutagenicity and biochemistry data. Our results demonstrate that the redox potential values of nitrocompounds correlates with Cnr activity obtained as V_{max}/K_m ratio or as its capacity to activate mutagenic nitrocompounds. This result is different with SnrA; however, the activity with this enzyme is better than Cnr in biochemical tests, demonstrating their importance in nitroreduction process. The results obtained here are discussed on the structural differences between the two nitroreductases and their implication in keeping intracellular redox state.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, nitroreductases, redox potential , nitrocompounds, quinones

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

La nitrorreducción es el paso inicial en el catabolismo de varios nitro compuestos estructuralmente diferentes (1). Esta catálisis se lleva a cabo principalmente por enzimas denominadas nitrorreductasas. En *Salmonella typhimurium* se han descrito hasta la fecha dos nitrorreductasas denominadas SnrA y Cnr (2,3). Estas enzimas, catalizan la reducción de diversos compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos a expensas de la oxidación de los cofactores NADH y/o NADPH (4,5). La catálisis reductiva de las nitrorreductasas se realiza mediante la transferencia de dos electrones en uno o dos pasos consecutivos siguiendo un mecanismo catalítico de tipo bi-sustrato bi-producto ping pong de manera dependiente del FMN como grupo prostético (1). La catálisis de las nitrorreductasas, genera intermediarios de tipo nitroso, hidroxilamino y amino, cuyas características mutagénicas y carcinogénicas pueden ser evaluadas mediante pruebas de mutagenicidad como el ensayo de Ames. En este ensayo, el metabolismo de las nitrorreductasas ha sido ampliamente reconocido (6) y existen evidencias experimentales que permiten formular la hipótesis de que a pesar de que las dos enzimas comparten un grupo común de sustratos, la actividad de las dos nitrorreductasas hacia los compuestos activables es diferente (2,3,7) y por lo tanto la respuesta medida en términos de mutagenicidad podría no ser la misma.

En estudios previos se ha descrito que la actividad catalítica de la nitrorreductasa homóloga de Cnr en *Enterobacter cloacae*, está determinada principalmente por el potencial redox de los sustratos reducibles (8,9). Esta relación también se ha encontrado utilizando el ensayo de Ames y de acuerdo con Klopman y colaboradores (10), la actividad nitrorreductasa de las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA1538 las cuales expresan únicamente la nitrorreductasa Cnr, está

relacionada con el potencial redox de los compuestos evaluados. En el caso de SnrA, se desconoce la existencia de una relación entre el potencial redox y la actividad catalítica de esta enzima.

Considerando lo anterior y tomando en cuenta la afirmación realizada por Nivinskas y col. (9) respecto a que el proceso de nitrorreducción en el caso de Cnr está determinado principalmente por las propiedades de los nitrocompuestos para aceptar los electrones y no por su estructura particular (9), en el presente trabajo se plantea la posibilidad de explicar las diferencias catalíticas entre las nitrorreductasas SnrA y Cnr de *S. typhimurium*, relacionando los parámetros bioquímicos y de actividad mutagénica con el potencial redox ($E_{1/2}$) de diversos sustratos dentro de un intervalo de 10 a -670 a mV. Para este propósito se emplearon extractos citosólicos de cepas de *S. typhimurium* que difieren en la expresión de las dos nitrorreductasas así como las enzimas SnrA y Cnr purificadas.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Características generales de las nitro/flavín reductasas

A nivel biológico, el proceso de reducción de diversos compuestos nitro aromáticos y nitro heterocíclicos puede ser catalizado por enzimas denominadas nitrorreductasas. Este tipo de enzimas están presentes en organismos eucariontes y procariontes y se agrupan en dos categorías: nitrorreductasas insensibles al oxígeno o tipo I y nitrorreductasas sensibles al oxígeno o tipo II (11). Las nitrorreductasas tipo I, catalizan la reducción de los nitrocompuestos transfiriendo dos electrones a partir de las coenzimas NADH y/o NADPH. Mediante esta catálisis, se generan como productos finales compuestos hidroxilamino y amino (12). Las nitrorreductasas de tipo II a diferencia de las anteriores, catalizan la reducción de los nitrocompuestos mediante la transferencia de un solo electrón. La sensibilidad a la que se hace mención, se refiere a que en presencia de oxígeno, el radical nitro anión producido por la transferencia unielectrónica de la nitrorreductasa se re-oxida. Esta re-oxidación genera el nitro compuesto original y a la vez, mediante un “ciclo fútil”, se produce el radical superóxido que causa estrés oxidante (11) (Fig. 1).

Al grupo de las nitrorreductasas tipo I, pertenecen enzimas como la DT-diaforasa, la xantina deshidrogenasa y las nitrorreductasas bacterianas (1,13). Estas últimas junto con las flavín reductasas de las bacterias luminosas, conforman una familia de flavoproteínas estructuralmente homólogas, definida como nitro/flavín reductasas (14,15).

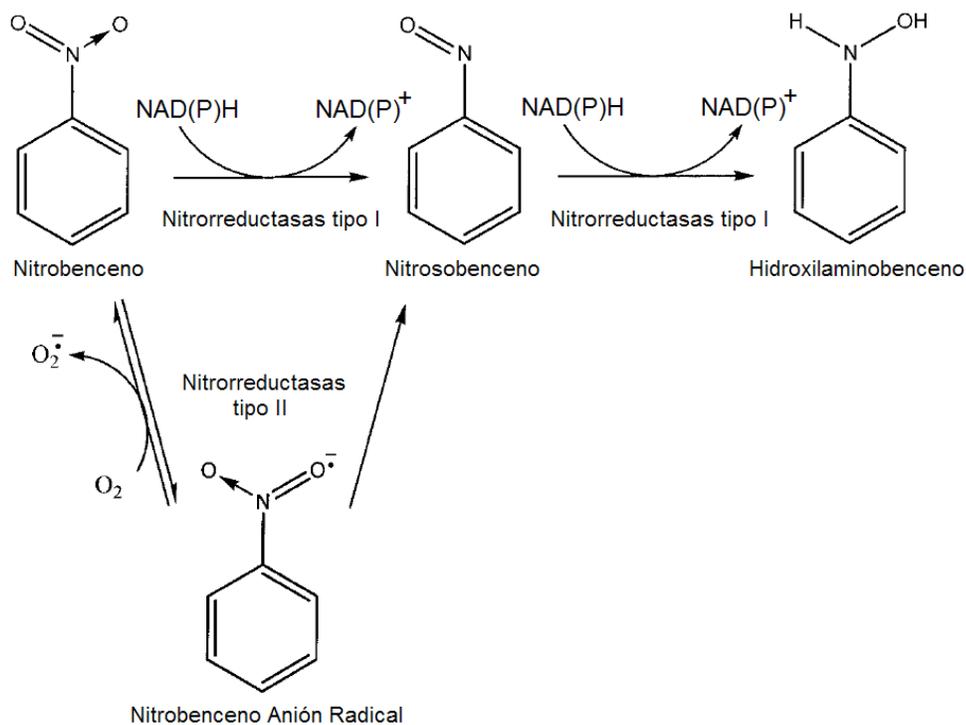


Figura 1. Vías del catabolismo reductor de compuestos nitroaromáticos en bacterias. Las nitrorreductasas tipo I catalizan la reducción dependiente de los nucleótidos de piridina NADPH y/o NADH mediante la transferencia de dos electrones. Las nitrorreductasas tipo II catalizan la reducción mediante la transferencia de un solo electrón. Los radicales producidos por las nitrorreductasas de tipo II reaccionan con el oxígeno produciendo anión superóxido que causa estrés oxidante. Adaptado de Koder y col.(16)

Las nitro/flavín reductasas se expresan en diferentes bacterias gram-positivas y gram-negativas, siendo las nitro/flavín reductasas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio fisheri* y *Vibrio harveyi*, las enzimas más estudiadas a nivel bioquímico, cristalográfico, genético y evolutivo (Tabla 1). Estas enzimas catalizan la reducción de diversos sustratos como son nitrocompuestos, quinonas y flavínas mediante un mecanismo enzimático dependiente de la oxidación de coenzimas flavínadas (17,18,19,20).

Tabla 1. Principales Nitro/flavín reductasas bacterianas

Bacteria	Proteína	Nomenclatura alternativa	% Identidad ⁺	PDB ID ⁺⁺	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	NfsA	MdaA	15% ¹	1F5V ²⁷	37,67,73
<i>Escherichia coli</i>	NfsB	NfnB, NTR	100% ¹	1ICV ³⁷ ,1Ds7 ⁴⁶	29,67,73
<i>Vibrio harveyi</i>	Frp		58% ²	1BKJ ³⁰	33,73
<i>Vibrio fischeri</i>	Frase I		32% ¹	1VFR ⁶³	37,67
<i>Thermus thermophilus</i>	Nox		23% ¹	1NOX ²⁰	74
<i>Enterobacter cloacae</i>	NR		88% ³	1NEC*	6,67
<i>Salmonella typhimurium</i>	SnrA	MdaA	87% ²		44,69
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cnr	NfnB	88.5% ¹		44,74,69
<i>Bacillus subtilis</i>	NfrA1	YwcG	41% ²		70
<i>Bacillus subtilis</i>	NfrA2	ycnD	35% ⁴		70
<i>Staphylococcus aureus</i>	NfrA		37% ² 42% ⁵		61
<i>Helicobacter pylori</i>	RrdxA		30% ³		16
<i>Helicobacter pylori</i>	FrxA		54% ⁶		16
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	NprA		27% ¹		48
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	NprB		14% ⁷		48

*:Datos no publicados.

⁺Valor porcentual de identidad en la secuencia de aminoácidos comparado con: ¹ NfsB, ² NfsA, ³ Cnr, ⁴ Frp, ⁵ FRA1, ⁶ RdxA, ⁷ NprA.

⁺⁺Nomenclatura empleada en el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank, PDB)

Con frecuencia, las nitrorreductasas NfsA y NfsB de *E. coli*, se emplean como proteínas de referencia a nivel enzimático y genético respecto a sus homólogas, catalogadas dentro de la familia de las nitro/flavín reductasas (Tabla 1). Las nitrorreductasas NfsA y NfsB están distantemente relacionadas entre si en su secuencia de aminoácidos y presentan una homología que va de un 7% (2) a un 15% (21). No obstante, NfsA y NfsB comparten un grupo común de sustratos reducibles y sus diferencias radican especialmente en la utilización de NADH y/o NADPH como donadores de electrones durante la catálisis (19).

A nivel de la clasificación de las nitro/flavín reductasas, existen dos subfamilias, entendidas como la subfamilia A (homólogas de NfsA/Frp) y la subfamilia B (homólogas de NfsB/FRaseI). Dentro de las nitro/flavín reductasas bacterianas más estudiadas y que comparten características con la NfsA de *E. coli* y la Frp de *Vibrio harveyi*, se encuentran la SnrA de *S. typhimurium*, NfrA1 de *Bacillus subtilis* y NfrA de *Staphylococcus aureus*, entre otras. Específicamente, NfsA es considerada como el componente mayoritario en *E. coli* ya que representa el 80% de la actividad total observada en la cepa silvestre AB1157 (22). NfsA es una proteína con una masa molecular monomérica de 26.8 KDa y tiene firmemente asociado un *flavínmononucleótido* (FMN) por monómero (19). Esta enzima exhibe una baja actividad flavín reductasa, utiliza NADPH como donador de electrones y tiene una amplia especificidad hacia diversos sustratos reducibles (15,19). En el genoma de *E. coli* el gen de NfsA recibe el nombre de *mdaA* y es uno de los dos genes asociados con la resistencia bacteriana a agentes antitumorales (23).

La subfamilia B incluye a las enzimas homólogas de NfsB, (24,25,26) y la flavín reductasa (FRase) I de *Vibrio fischeri* (27,19), así como las nitrorreductasas NT de *E. cloacae* y Cnr de *S. typhimurium*. Específicamente NfsB es considerada como el componente minoritario en *E. coli* ya que representa el 20-30% de la actividad total observada con la cepa silvestre AB1157 (22). Esta nitrorreductasa es una proteína de 217 aminoácidos (21) con una masa de 23.9 KDa. Exhibe una baja afinidad sobre FMN y puede utilizar FAD como sustituto del FMN como grupo prostético (28). NfsB tiene una amplia especificidad de sustratos aceptores de electrones y puede oxidar NADH y NADPH (28).

2.1.1. Nitrorreductasas SnrA y Cnr de *Salmonella typhimurium*

En *S. typhimurium*, la nitrorreductasa homóloga de la NfsA de *E. coli* recibe el nombre de SnrA por sus siglas en inglés (*Salmonella nitro reductase A*). Esta nitrorreductasa pertenece a la subfamilia A y corresponde al componente mayoritario a nivel de la actividad nitrorreductasa total en *S. typhimurium* (2). Utiliza preferentemente NADPH como fuente de equivalentes reductores y exhibe un nivel bajo de reducción sobre el FMN como sustrato, el cual cuando es añadido exógenamente, inhibe competitivamente a SnrA (2).

El gen que da origen a esta enzima de 240 aminoácidos y con una masa molecular de 26.9 kDa está compuesto por 723 pares de bases (pb) y se encuentra delimitado por los mismos genes que flanquean al gen de la nitrorreductasa NfsA (*mdaA*) en *E. coli*, el cual se ubica en el minuto 19.2 (28) del genoma de esta bacteria (Fig. 2). Corriente arriba se encuentra el gen *rimK* (29), que codifica para una proteína responsable de la modificación transcripcional de la proteína ribosómica S6 (30). Corriente abajo se encuentra *ybjC*, un pequeño marco de lectura abierto (ORF) sin función conocida (29) (Fig. 2) De acuerdo con Paterson y col. (4) *ybjC* y *nsfA* forman un operón regulado bajo un promotor dependiente del regulador transcripcional SoxS (4), implicado en la respuesta ante el estrés oxidante (31). Adicionalmente, corriente arriba de *rimK* se encuentra *grxA* (glutaredoxin 1, Grx1) que codifica para una proteína de 84 aminoácidos, la cual actúa como donador alternativo de electrones para una ribonucleótido reductasa (32).

La otra nitrorreductasa que está presente en *S. typhimurium* recibe el nombre de Cnr (*Classical nitroreductase*). Esta nitrorreductasa forma parte de la familia B y es considerada como el componente minoritario respecto a la actividad nitrorreductasa total en esta bacteria. Esta enzima

puede oxidar NADPH y NADH, siendo el valor de K_m para el NADH cuatro veces menor respecto al valor de K_m con NADPH utilizando nitrofurazona como segundo sustrato (33).

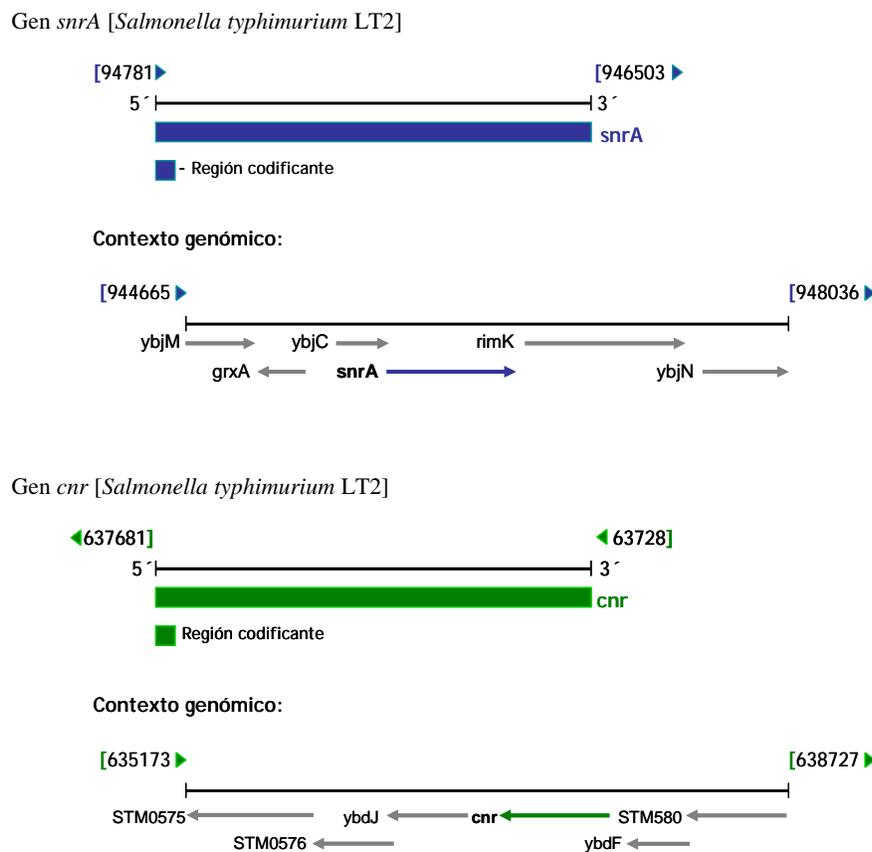


Figura 2. Mapa de distribución de los genes *snrA* y *cnr* en *S. typhimurium*. Adaptado de: National Center for Biotechnology Information (Tomado del genoma completo de *S. typhimurium* LT2)

La nitrorreductasa Cnr se compone de 217 aminoácidos y tiene una masa molecular aproximada de 23.9 kDa (34). *cnr* está compuesto por 654 pb y se encuentra delimitado por los mismos genes que flanquean al gen de la nitrorreductasa NfsB (*nfnB*) de *E. coli*, el cual se encuentra en el minuto 13 del genoma de esta bacteria (28). Los genes a *cnr* y *nfnB*, están delimitados por *ybdF* y *ybdJ*, dos marcos de lectura abiertos sin función conocida (Fig. 2) De acuerdo con Barbosa y col. (35) la regulación *nfnB* se realiza bajo un elemento en *cis* involucrado en la regulación MarA, un

regulador transcripcional, implicado en la resistencia a múltiples compuestos antibióticos y agentes generadores de estrés oxidante.

El papel de la nitrorreductasa Cnr de *S. typhimurium* ha sido reconocido a nivel de los ensayos de mutagenicidad, como la prueba de Ames, ya que participa en la activación metabólica de los nitroaromáticos a metabolitos con características tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (3,7,37,63).

Específicamente, la prueba de Ames o ensayo de reversión bacteriana, se utiliza frecuentemente para detectar la mutagenicidad y el tipo de mutación que produce un compuesto o un grupo de compuestos. Las cepas de *S. typhimurium* empleadas en este ensayo, tienen modificaciones genéticas en el operón de histidina (*his*), mutación de *rfa*, *uvrB*, presencia del factor R entre otros, que proveen a la bacteria de una mayor sensibilidad ante el proceso de mutagénesis (38). La mutagénesis química ocurre de forma compleja y está fuertemente influenciado por diferentes eventos como son la reparación de DNA, la actividad de la DNA polimerasa en los sitios de DNA lesionados y la activación metabólica (7). En este último, se encuentran involucradas las enzimas bacterianas, tales como las nitrorreductasas (38).

En particular la nitrorreductasa Cnr ha sido la más estudiada al respecto y un ejemplo de su importancia en el ensayo, corresponde al aumento en la sensibilidad de hasta 70 veces debido a la mutagenicidad de los nitrocompuestos luego de la catálisis en las cepas que sobreexpresan esta enzima (33).

2.1.2. Características estructurales y bioquímicas de las nitro/flavín reductasas

Las nitro/flavín reductasas tienen como característica general la dependencia de FMN como grupo prostético para llevar a cabo la transferencia de los dos electrones durante la catálisis reductiva de los diversos sustratos (Fig. 3).

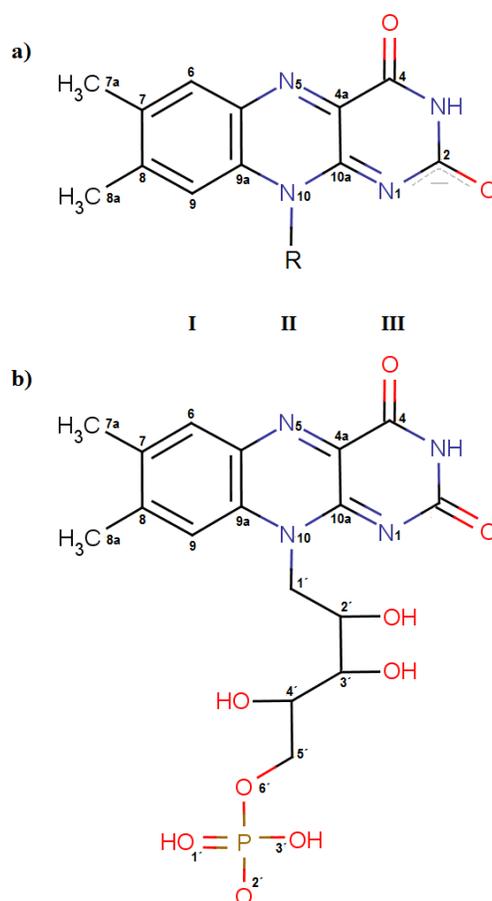


Figura 3. Estructura química y numeración del grupo prostético (FMN) encontrado en las Nitro/flavín reductasas. *a*). Forma totalmente reducida (aniónica) de la flavína; *b*). Flavína oxidada. En ambas imágenes la flavína está orientada mostrando su cara *re*. La otra orientación es referida como la cara *si*. Sobre la cara *re* del FMN se encuentran tres grupos de aminoácidos que interactúan con la molécula: (I) parte del xileno, (II) parte media del anillo isoaloxazina y (III) cercana al borde del anillo pirimidina. Estos tres grupos de aminoácidos están señalados en la figura 5. Adaptado de Haynes y col. (19) y de Hritz y col. (14)

Hay un FMN por monómero el cual se encuentra localizado en la concavidad formada por la interfase de las dos subunidades que constituyen la proteína activa. El FMN está unido fuertemente de manera no covalente, interactuando con residuos de las dos subunidades (40). La cara *re* del FMN está expuesta hacia el solvente e interactúa con el sustrato, la cara *si* se encuentra inmersa en la proteína (Fig. 4).

De acuerdo con las estructuras tridimensionales de algunas de las enzimas que pertenecen a esta familia enzimática (15,21,26,40,41,42,), se puede definir a las nitro/flavín reductasas como flavoproteínas homodiméricas con una estructura plegada de tipo $\alpha + \beta$ (Figs. 4 y 5). Estas enzimas se caracterizan por tener al menos dos dominios, uno central y otro exterior con características rígidas y flexibles de acuerdo a su localización, representando entre el 75-80% y el 20- 25% de la proteína, respectivamente (15,21,26,40,42).

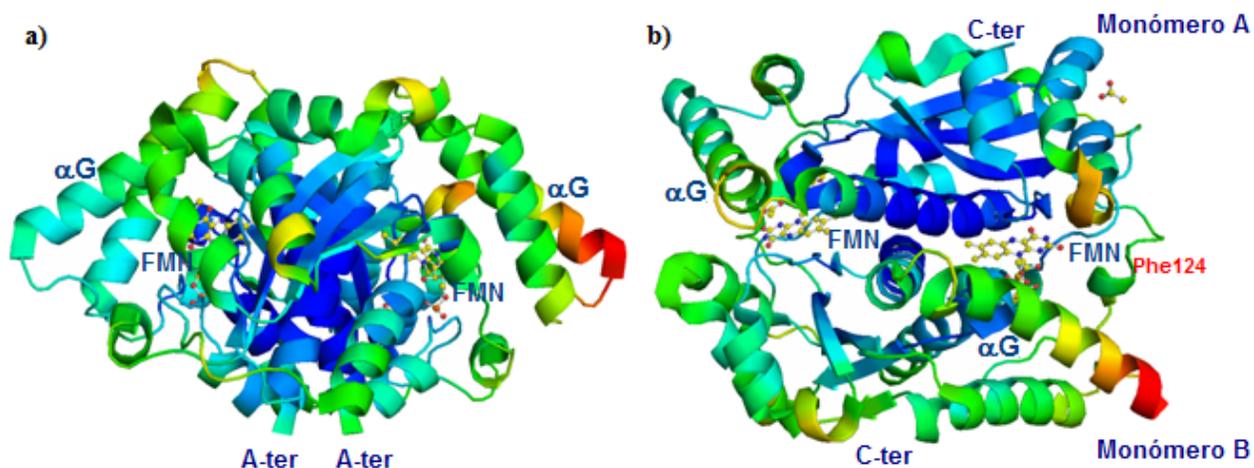


Figura 4. (a) Diagrama de los dos monómeros de la estructura de la nitrorreductasa NT de *E. cloacae* unida con el cofactor FMN. Dibujada con las coordenadas de 1YLU utilizando Pymol© y coloreada de menor a mayor flexibilidad en la gama de colores de azul a rojo de acuerdo al factor-b (*/*ca). (b) Estructura rotada 90°. Se marcan las regiones amino y carboxilo terminal junto con el residuo Phe 124. Figura adaptada de Parkinson y col. (40)

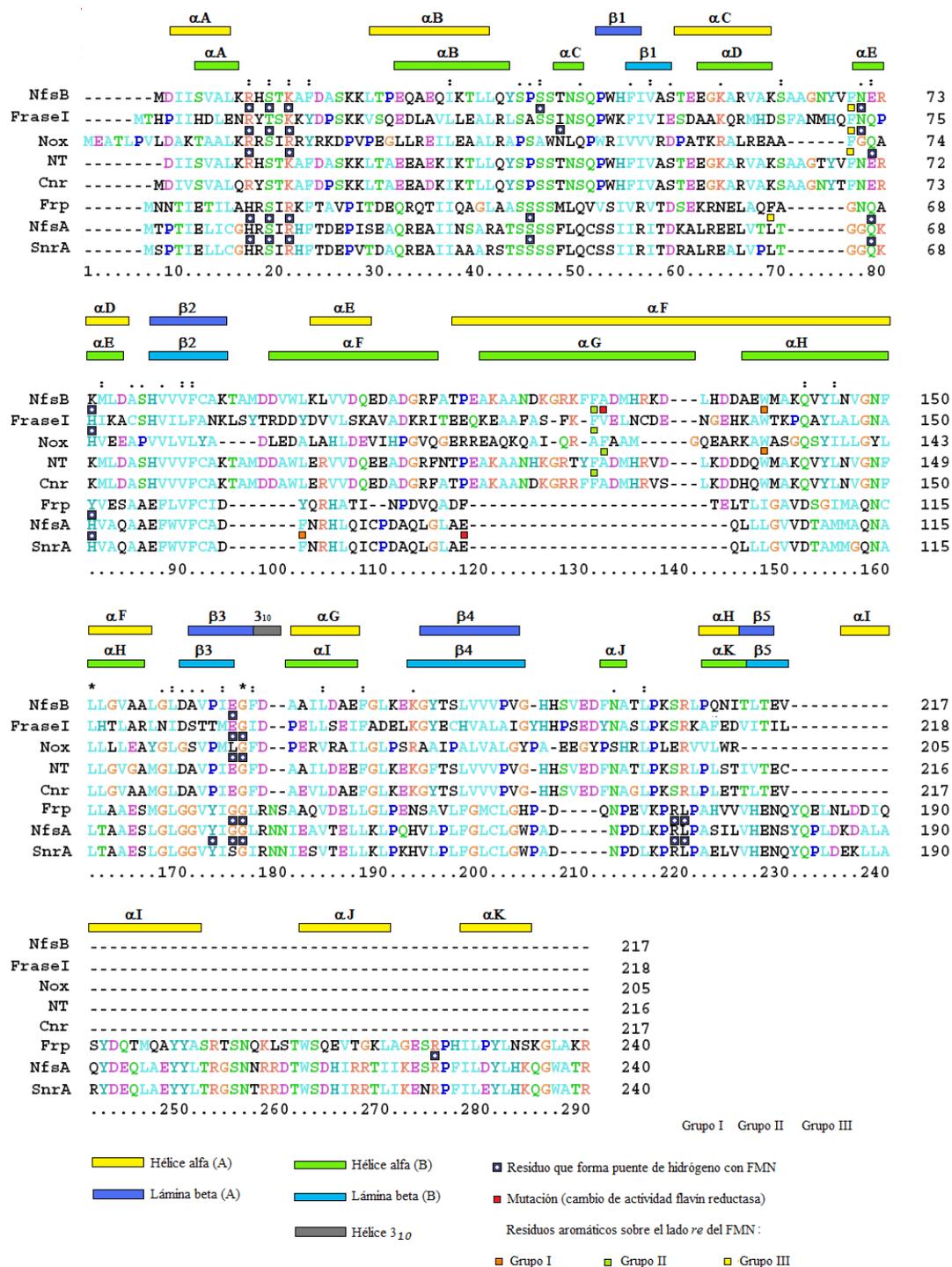


Figura 5. Alineamiento de secuencia de NfsB, FraseI, Nox, NT, Cnr, Frp, NfsA y SnrA. Los elementos de estructura secundaria de la Subfamilia NfsA/Frp (A) se muestran en rectángulos amarillos (hélices-α) y rectángulos azules (hojas-β). Para la Subfamilia NfsB/FraseI (B), se muestran en rectángulos verdes (hélices-α) y azules (hojas-β). Las regiones de interacción proteína-FMN se marcan bajo la secuencia con cuadros azules con un punto blanco interior. Se marcan con cuadros rojos los residuos cuya mutación produce un cambio significativo de actividad reductasa. Los tres grupos de residuos aromáticos sobre el lado *re* de las proteínas (fig. 3) se marcan con cuadros en tonos naranja, verde y amarillo.

En la mayoría de los casos, el mecanismo catalítico con el que las nitro/flavín reductasas bacterianas llevan a cabo la reducción de nitrocompuestos, quinonas y riboflavinas corresponde a un mecanismo bi-sustrato bi-producto del tipo ping-pong (Fig. 6), que funciona mediante la transferencia de dos electrones (43) desde el cofactor hacia la enzima y de ésta hacia el sustrato. En el caso de la nitrorreductasa NfrA1 de *B. subtilis*, el mecanismo anterior cambia a un mecanismo de tipo secuencial al acoplarse con la reacción de bioluminiscencia.

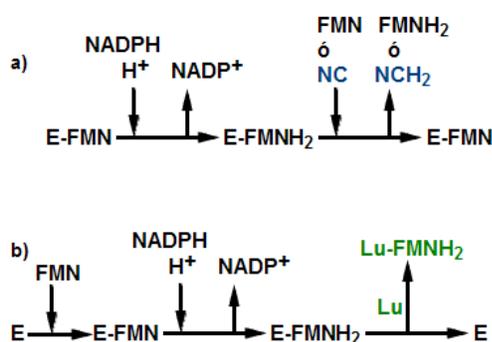


Figura 6. Mecanismos catalíticos seguidos por las Nitro/Flavín reductasas para la reducción de sus diferentes sustratos. a). Mecanismo bi-sustrato bi-producto de tipo ping pong. Durante la catálisis estas enzimas pueden o no utilizar NADH de manera adicional. b). Mecanismo secuencial de reducción acoplado con la reacción de bioluminiscencia propuesta para la nitrorreductasa NfrA1 de *B. subtilis*. Figura tomada de Zenno y col.(20)

La alta especificidad para realizar la transferencia de dos electrones durante la catálisis de las nitrorreductasas, está favorecida termodinámicamente por el potencial redox de la enzima ($E_m = -190\text{mV}$ a pH 7.0) el cual permite la transición del FMN de una flavína oxidada neutra (FMN_{ox}) a una flavína hidroquinona aniónica (FMNH_2 [FMN_{hq}]) evitando la formación del intermediario radical semiquinona (FMNH° [FMN_{sq}]) (1) (Fig. 7).

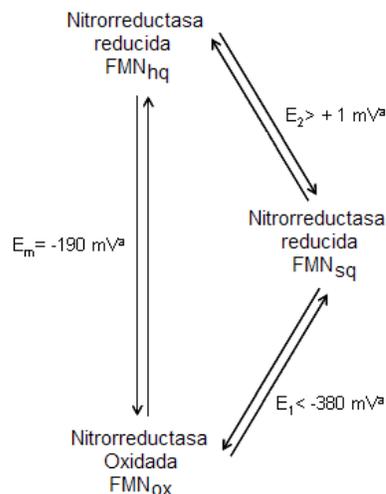


Figura 7. Descripción parcial del equilibrio relacionado con el potencial redox de los diferentes complejos formados durante el proceso de reducción: FMN_{ox} (FMN oxidado), FMN_{sq} (FMN semiquinona), FMN_{hq} (FMN hidroquinona- FMN reducido con los dos electrones). ^a-Valores obtenidos por Koder y col. (1)

Durante la catálisis, la modificación en el estado redox (1), está acompañado de cambios estructurales tanto de la enzima como del FMN (39,43). Específicamente, durante el proceso de reducción, el FMN presenta una distorsión sobre el sistema anillado denominada como inclinación mariposa que va de los 12° en el estado oxidado a los 25° en el estado reducido (39,43). En el estado reducido esta inclinación muy probablemente está relacionada con el rechazo de la enzima para estabilizar la reacción por un solo electrón (estado semiquinona) (39) y por lo tanto la reducción ocurre de manera dielectrónica.

Las interacciones entre el sitio activo de las nitro/flavín reductasas y el FMN (14,39), son importantes desde el punto de vista redox, en particular las interacciones con el lado *re* del FMN que se encuentra expuesto hacia el sustrato (14). Las enzimas que componen esta familia, presentan variaciones en estas interacciones (39) y es probable que las diferencias en dichas interacciones definan el potencial redox del sistema (44,45) y con él, la eficiencia del proceso de

transferencia electrónica. Al respecto, Race y col. (43), proponen que la diferencia en la distribución de cargas en el sitio activo juega un papel importante en la orientación del sustrato, su selectividad, la afinidad de unión y su reactividad.

2.1.3. Actividad nitro/flavín reductasa y su implicación fisiológica

Las nitro/flavín reductasas además de catalizar la reducción de diversos nitrocompuestos, pueden reducir algunas flavínas (18,19,20), quinonas (17), azocompuestos (17,46) y cromo (47) a expensas de la oxidación de las coenzimas NADH y/o NADPH. En el caso de los nitrocompuestos, la catálisis realizada por estas enzimas se considera como el paso inicial para su metabolismo (1) y de igual forma, constituye la principal vía para su activación metabólica (2,38,48). En el caso de las quinonas, su activación metabólica, genera productos mutagénicos detectables con la cepa de *S. typhimurium* TA104. A diferencia de los nitrocompuestos, la activación de las quinonas se logra a través de la transferencia de un solo electrón y enzimas como la DT diaforasa, que llevan a cabo la catálisis reductiva transfiriendo dos electrones, al igual que las nitrorreductasas bacterianas, producen un efecto protector ante la citotoxicidad de quinonas como la menadiona (49). Tanto los nitrocompuestos como las quinonas, se encuentran ampliamente en la naturaleza y están presentes en emisiones y materiales que han sufrido algún proceso de combustión, los cuales pueden llegar a la atmosfera a partir de la actividad antropogénica (48,49,50).

Los nitrocompuestos se usan ampliamente como intermediarios sintéticos, colorantes, pesticidas, explosivos (50), agentes antimicrobianos (7,51), disolventes y plásticos (52). Por otra parte, las quinonas se encuentran de forma natural en los alimentos y constituyen un grupo de compuestos

empleados como medicamentos antitumorales. Su papel fisiológico se centra en su participación como moléculas biológicamente activas que funcionan como aceptores lipídicos para el transporte de hidrógeno y electrones entre los complejos proteicos en la cadena respiratoria (53).

En la tabla 2 aparecen los datos de actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) de algunas de las nitro/flavín reductasas descritas y evaluadas con diferentes compuestos.

Tabla 2. Actividad de las Nitro/Flavín reductasas sobre diversos sustratos

Sustrato	Actividad Nitro/Flavin reductasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot)												
	NfsA ^{1,B}	NfsA ^{2,B}	NfsB ^{2,A}	NfsB ^{3,A}	NfsB ^{3,A''}	FRP ^{4,B}	Frasel ^{5,A}	SnrA ^{6,B}	Cnr ^{7,A}	Cnr ^{2,A}	NR ^{8,A}	NfrA1 ^{9,B}	NfrA ^{10,B}
Flavinas													
FMN	1,1 ^a	40, 50*	1	118	0.26	23	35	1.5	1.32	0.066	-	9	16
FAD	3	37	1	93	0.32	19	23	-	1.22	-	-	-	-
Riboflavina	7	44	2	134	0.27	18	38	-	2.27	-	5.3 ^c	-	-
Lumiflavina	10	54	41	142	-	16	25	-	-	-	-	-	-
Nitrocompuestos													
1,3,6,8-tetranitrocarbazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	116	-	-
2,4,6-trinitrotolueno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	143	-	-
2,4-Dinitrofenil-N-metilnitramina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	410	-	-
3,5-Dinitrobenzamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	370	-	-
Acido 2-Nitrobenzoico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12
Acido 3,5-Dinitrobenzoico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	324	-	-
4-Nitroacetofenona	74	-	49	-	-	-	-	-	41.4	0.105	100, 18.5 ^d	-	-
4-nitroanilina	0.6	-	0.1	-	0.02	-	-	-	-	-	0.71 ^d	-	-
4-nitrobenzaldehido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.52 ^d	-	-
4-nitrobenzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56 ^d	-	-
4-nitrobenzeno metil sulfonato	52	-	94	-	-	-	-	-	-	-	32.7 ^d	-	-
4-nitrobenzoato	3	-	1	-	0.1	-	-	-	-	-	2.37 ^d	-	-
4-nitrofenol	0.5	-	0.1	-	0.75	-	-	-	-	-	0.71 ^d	-	-
4-nitrotolueno	1	-	0.4	-	0.04	-	-	-	-	-	1 ^d	-	-
m-dinitrobenzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	167	-	-
Methyl 4-nitrobenzoato	24	48	43	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-
Nifuroxim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47	-	-
Nitrobenzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
Nitrofurantoina	82	-	21	13	25.3	-	23	-	-	-	102	-	15
Nitrofurazona	73, 45 ^a , 83 ^b	30, 65*	13	6	20.6	142	14	72.8	550	-	-	97	20
Nitrofurazona+dicumarol	63	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrofurazona+FMN	20	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o-dinitrobenzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91	-	-
o-nitrobenzaldehido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	-	-
Pentyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	620	-	-
p-nitrobenzaldehido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	104	-	-
p-nitrobenzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	305	-	-
Acido p-nitrobenzoico	-	-	-	-	-	-	-	-	3.2	-	10	-	-
p-nitrobenzyl alcohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
Tetryl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	800	-	-

Tabla 2. (Continuación)

Sustrato	Actividad Nitro/Flavin reductasa (umol/min/mg prot)												
	NfsA ^{1,B}	NfsA ^{x,B}	NfsB ^{2,A}	NfsB ^{y,A}	NfsB ^{3,A**}	FRP ^{4,B}	Frasel ^{5,A}	SnrA ^{6,B}	Cnr ^{7,A}	Cnr ^{z,A}	NR ^{8,A}	NfrA1 ^{9,B}	NfrA ^{10,B}
Quinonas													
1,4-Benzoquinona	163	57	251	252	41.7	206	47	-	-	-	1200 ^c	-	-
1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5 ^c	-	-
1,4-Naftoquinona (menadiona)	-	-	60	115	35.5	-	48	-	-	-	200 ^f	-	-
1,4-Naftoquinona+dicumarol	21	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,8-Dihidroxi-9,10-antraquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ^c	-	-
1-hidroxi-9,10-antraquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5 ^c	-	-
2,3-Dicloro-1,4-naftoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ^c	-	-
2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	47.3	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-Diaziridinil-1,4-Benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1610 ^c	-	-
2,5-dimetil-3,6-diaziridinil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71 ^c	-	-
2,6-Dimetil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	704 ^c	-	-
2-Hidroxi-1,4-naftalenediona (lawsone)	-	-	-	-	33.7	-	-	-	-	-	160 ^c	-	-
2-Hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Metil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	666 ^c	-	-
2-Metil-1,4-naftoquinona (menadiona-menaquinona)	24	77	-	-	16.7	119	-	-	136	0.349	50 ^c	118.9 ^d	-
2-metil-3-hidroxi-1,4-naftoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111 ^c	-	-
2-Metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (plumbagina)	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	150 ^c	-	-
5,8-Dihidroxi-1,4-naftoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111 ^c	-	-
5-hidroxi-1,4-naftoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	77 ^c	-	-
9,10-antraquinona-2,6-disulfonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83 ^c	-	-
9,10-antraquinona-2-sulfonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83 ^c	-	-
9,10-Fenantreno quinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	333 ^c	-	-
Antraquinona-2,6-disulfonato	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinona-2-sulfonato	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetrametil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17 ^c	-	-
Trimetil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400 ^c	-	-
Otros compuestos													
2,6-dicloroindofenol	29	7	2	24	0.36	98	0.4	-	-	-	-	-	-
Fe(EDTA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 ^c	-	-
Ferricianida K3[Fe(CN)6]	251	183	387	539	360	410	40	-	-	-	39 ^c	-	97
ferricianida+FMN	140	-	452	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azul de metileno	3	6	2	-	0	62	-	-	-	-	-	-	-
Mitomicina C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ^c	-	-
Tartrazina	0.8	27	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-
Cr VI ⁽¹¹⁾	3.8	-	3.9	-	-	10.7	-	-	-	-	-	-	-
Cofactores													
NADH ^C	-	-	-	-	-	-	-	-	102	0.29	-	-	-
NADPH ^C	85 ^a ,83 ^b	46	-	-	-	145	-	-	99	0.25	-	61	-
NADPH ^D	1 ^a	46	-	-	-	25	-	-	-	-	-	10	-

Referencias: 1(19), 2(28), 3(17), 4(20), 5(18), 6(2), 7(33), 8(9), 9(54), 10(55), 11(47), x(20), y(18), z(33), a(20), b(15), c(56), d(8). Cambio de aminoácido: x[E99G], y[F124S], z[L33R]. Valores obtenidos con: A(NADH), B(NADPH), C(NFZ), D(NFN), E(FMN), como donador o aceptor de electrones. *Condiciones no saturantes. **Valores obtenidos en condiciones de anaerobiosis

Las enzimas que conforman la familia de las nitro/flavín reductasas, comparten de manera general, características en cuanto al tipo de catálisis reductiva, su secuencia de aminoácidos y estructura proteica. Esto ha permitido que se les catalogue como miembros de una misma familia enzimática a pesar de sus diferencias en cuanto a los sustratos que pueden reducir.

Específicamente, todas las enzimas consideradas dentro de la familia de nitro/flavín reductasas tienen la capacidad de reducir nitrocompuestos, no obstante, las nitrorreductasas NfsA y SnrA, NfsB, Cnr, NR, cuentan con una mínima capacidad para reducir flavínas (2,9,17,19,28,33).

Hasta la fecha, el papel fisiológico de las nitrorreductasas no se ha definido. No obstante, las flavín reductasas de las bacterias luminosas como *V. harveyi* y *V. fischeri*, participan en reacciones de bioluminiscencia, mediante el complejo reductasa-luciferasa, produciendo el FMN reducido metabolizable por la luciferasa (20,25,42,46,57,58,59).

El amplio grupo de sustratos reducibles por las nitrorreductasas, indica la baja selectividad que tienen estas enzimas hacia sus sustratos. Al respecto, Nivinskas y col. (13), sostienen que la catálisis reductiva, en particular la catálisis llevada a cabo con la nitrorreductasa de *E. cloacae*, está definida por las propiedades de óxido reducción de los nitrocompuestos y no por su estructura particular. Específicamente, la catálisis de las nitrorreductasas pertenecientes al grupo NfsB/FRaseI, se caracteriza por una dependencia entre el potencial redox de los sustratos y la actividad reductasa. Esta dependencia entre los dos factores se ha interpretado matemáticamente a través de modelos lineales y parabólicos (8,13) representando la correspondencia entre los dos parámetros. La variación entre los modelos matemáticos empleados para el ajuste, está de acuerdo al intervalo de potencial utilizado para el análisis. La relación entre el potencial redox y la catálisis reductiva de las nitrorreductasas del grupo NfsB/FRaseI, incluye la evaluación de manera bioquímica y biológica con ensayos de toxicidad y mutagenicidad (10,60).

Considerando lo anterior y los estudios realizados al respecto, se puede concluir que la reducción dielectrónica realizada por las nitrorreductasas del grupo NfsB/FRaseI, está determinada principalmente por las características de óxido reducción de los sustratos y por ende de su capacidad de aceptar los electrones implicados en la catálisis, independientemente de la estructura de los nitrocompuestos reducibles. Sin embargo, a pesar de que existe información acerca de la reducción de diversos compuestos por las enzimas del grupo NfsA/Frp y que su eficiencia catalítica es diferente respecto del grupo NfsB/FRaseI, hasta la fecha no se ha determinado si el proceso catalítizado por primer grupo, evaluado biológica y bioquímicamente, depende del valor de potencial redox de los compuestos reducibles. Al respecto el presente trabajo se enfoca en evaluar la actividad de las nitrorreductasas SnrA y Cnr como modelo para responder esta interrogante.

CAPITULO 3. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad catalítica de las principales nitrorreductasas de *Salmonella typhimurium* y su relación con el potencial redox de diversos nitro compuestos y quinonas

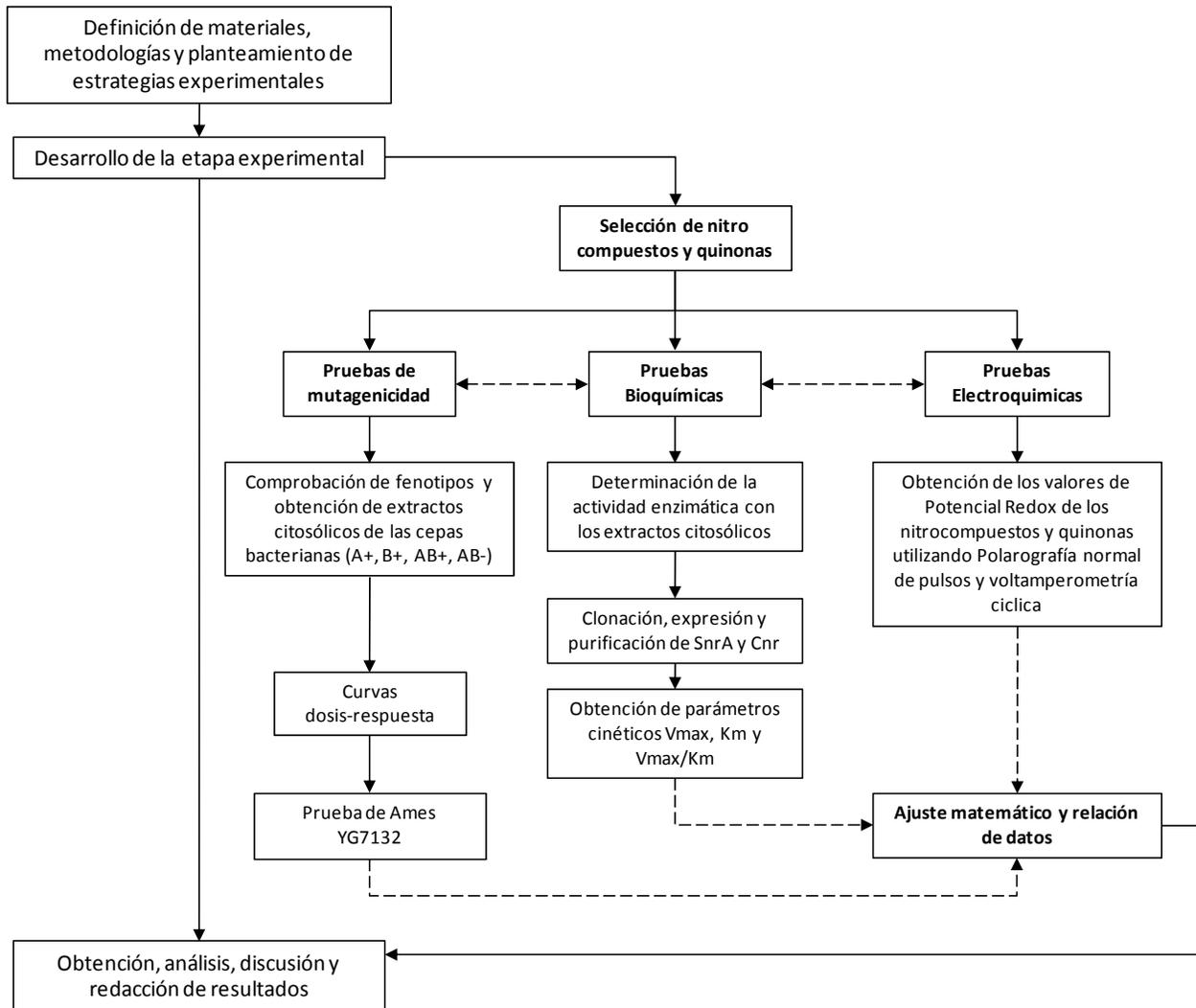
2.2. Objetivos particulares

1. Evaluar la mutagenicidad de diferentes nitrocompuestos ambientales con extractos citosólicos obtenidos de cepas mutantes de *S. typhimurium* que difieren en la expresión de las nitrorreductasas SnrA y Cnr
2. Clonar, expresar y purificar las nitrorreductasas SnrA y Cnr de *S. typhimurium*
3. Definir los parámetros cinéticos V_{max} , K_m y V_{max}/K_m con los nitro compuestos y quinonas empleando las nitrorreductasas SnrA y Cnr purificadas
4. Calcular el potencial de media onda ($E_{1/2}$) de cada uno de los nitro compuestos y quinonas y relacionar estos resultados con los valores de potencia mutagénica y los valores de eficiencia catalítica con cada nitrorreductasa

2.3. Hipótesis

La actividad catalítica de SnrA y Cnr evaluada biológica y bioquímicamente, depende del valor de potencial redox de los compuestos reducibles

2.4. Estrategia de trabajo



CAPITULO 4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Selección de los nitrocompuestos y quinonas

Los compuestos empleados para el desarrollo de la fase experimental, están divididos en dos grupos. Los sustratos activables por las nitrorreductasas y que su reactividad puede ser medida mediante ensayos de mutagenicidad como la prueba de Ames y los sustratos cuya reducción enzimática puede ser determinada espectrofotométricamente. La selección de estos compuestos estuvo de acuerdo con los valores de potencial redox.

4.2. Pruebas de mutagenicidad

4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de *Salmonella typhimurium* LT2 (cepa silvestre) fue proporcionada por J. Roth, University of California Davis, CA. USA, y fue utilizada para obtener las cepas derivadas RC1378 (*nfsA*::T-POP2), RC1503 (*nfsB*::Mud-cam), RC1517 (*nfsA*::T-POP2; *nfsB*::Mud-cam). Estas cepas fueron proporcionadas por R. Camacho-Carranza IIB-UNAM (tabla 3).

Tabla 3. Descripción y nomenclatura de las cepas bacterianas utilizadas

cepa	características genóticas	Nitrorreductasa presente ^a	Nomenclatura	Fuente
TR7079	Cepa silvestre LT2	<i>snrA</i> y <i>cnr</i>	AB ⁺	J. Roth, University of California Davis, CA.
RC1503	<i>cnr101</i> ::MudCm (Cm ^R) ^b	<i>snrA</i>	A ⁺	R. Camacho Carranza, IIB UNAM México
RC1378	<i>snrA101</i> ::Tn10d(T-POP2) (Tc ^R) ^b	<i>cnr</i>	B ⁺	R. Camacho Carranza, IIB UNAM México
RC1517	<i>snrA101</i> ::Tn10d(T-POP2) (Tc ^R) <i>cnr101</i> ::MudCm (CmR) ^b	Ninguna	AB ⁻	R. Camacho Carranza, IIB UNAM México
YG7132	(<i>hisD3052</i> , <i>gal</i> , Δ [<i>chl</i> , <i>uvrB</i> , <i>bio</i>], <i>rfa</i> , <i>cnr</i> ⁻ [Km ^r], pKM101; Ap ^r , Km ^r)	Ninguna	-	Yamada <i>et al.</i> , 1997

^aLas cepas son derivadas de *S. enterica* serotipo Typhimurium LT2, construidas por transposición al azar con MudCm and T-POP2 y seleccionadas de acuerdo a su susceptibilidad hacia la nitrofurantoína

^bGen de las nitrorreductasas Cnr y SnrA los cuales corresponden a los genes *nfnB* y *mdaA* respectivamente.

Las diferentes cepas bacterianas fueron crecidas de manera rutinaria a 37°C sobre agar nutritivo NB (Nutrient Broth (Difco®) con 1.5% de agar y 0.5% de NaCl y en caldo nutritivo ONB#2 (Oxoid® nutrient broth #2) con agitación orbital a 150 rpm (Lab Line Incubator Shaker orbital Daigger®). Cuando fue necesario, el medio de cultivo se complementó con 20µg ml⁻¹ de cloramfenicol y tetraciclina.

La comprobación de los fenotipos de las cepas A⁺, B⁺ y AB⁻, se realizó en agar NB con 15µg ml⁻¹ de nitrofurantoína en el caso de las cepas A⁺ y B⁺ y 25µg ml⁻¹ de nitrofurantoína en el caso de la cepa AB⁻. De acuerdo con los marcadores de cada cepa, el medio de cultivo se complementó con 20µg ml⁻¹ de cloramfenicol y tetraciclina (Tabla 3).

4.2.2. Preparación de los extractos citosólicos y determinación de su actividad

Los extractos citosólicos de las cepas A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺ se obtuvieron a partir de su crecimiento en medio líquido ONB#2. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,000 x g por 30 minutos, se lavaron y suspendieron en 3 volúmenes de amortiguador (pH 7.5) con Tris-HCl 50mM (Promega®) y dithiothreitol 1mM (DTT) (CAS# 27565-41-9, Sigma-Aldrich). Durante el proceso, las bacterias se mantuvieron a 4°C, se rompieron con ultrasonido (Microson-Ultrasonic cell disrupter XL-Misonix®) y se ultracentrifugaron a 100,000 x g por 60 minutos a 4°C. La concentración de proteína de cada extracto citosólico se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Bio-Rad (Richmond, California) con una curva estandarizada de albúmina bovina (Sigma-Aldrich). La actividad nitrorreductasa de los diferentes extractos citosólicos se determinó mediante la reducción de nitrofurantoína ($\Delta\epsilon_{373} = 21.4\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la oxidación de NADPH ($\Delta\epsilon_{340} = 6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [9]) en un espectrofotómetro de doble haz (Camspec M350T). La mezcla de reacción (1ml) se incubó a 25°C por 10 minutos, e incluyó Tris-HCl 50mM (pH 7.5), DTT 1mM, nitrofurantoína (NFN) 25µM (CAS# 67-20-9, Sigma-Aldrich) 50µg ml⁻¹ de proteína y β-NADPH 100mM ó NADH 100mM. La reacción se inició con la adición de la coenzima y la velocidad inicial de reacción se determinó a 32±2°C.

4.2.3. Nitrocompuestos y determinación de la actividad mutagénica

Los ensayos de mutagenicidad se realizaron con los siguientes compuestos: 2-Nitrofluoreno (2NF) (CAS# 22250-99-3), 2,7-Dinitrofluoreno (2,7DNF) (CAS# 5405-53-8), 1-Nitropireno (1NP) (CAS# 5522-43-0), 1,3-Dinitropireno (1,3DNP) (CAS# 75321-20-9), 1,6-Dinitropireno (1,6DNP) (CAS# 42397-64-8), 1,8-Dinitropireno (1,8DNP) (CAS# 42397-65-9), de acuerdo a lo descrito por Maron y Ames (61) utilizando el extracto citosólico de cada cepa (A⁺, B⁺, AB⁻, AB⁺) como sistema de activación metabólica. El medio líquido ONB#2 complementado con ampicilina (25µg/ml) y kanamicina (25µg/ml), se utilizó para el crecimiento de toda la noche de la cepa YG7132 (*hisD3052*, *gal*, Δ [*chl*, *uvrB*, *bio*], *rfa*, *cnr*⁻ [Km^r], pKM101; Ap^r, Km^r) la cual es deficiente en *cnr* y *snrA*. Cada ensayo incluyó cuatro concentraciones del nitro compuesto disuelto en DMSO. Las concentraciones empleadas en el ensayo, se seleccionaron considerando los datos obtenidos a partir de una curva dosis-respuesta previa. Cada tratamiento se realizó por triplicado y los valores del promedio se presentan en los resultados como revertantes de His⁺ por placa. El promedio del número de revertantes se estimó sustrayendo la cantidad obtenida con DMSO.

4.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron con los extractos citosólicos de cada una de las cepas A⁺, B⁺, AB⁻, AB⁺. En las pruebas preliminares se establecieron algunas de las condiciones de medición para posteriormente obtener los parámetros cinéticos con las nitrorreductasas purificadas.

4.3.1. Pruebas preliminares

Para llevar a cabo los ensayos preliminares de actividad, se consideraron varias metodologías entre ellas las descritas por Kumar y Jayaraman (27), Carroll y col. (7), Zenno y col. (18) y Liochev y col. (62), esta última fue la metodología seleccionada para la realización del ensayo y a partir de ésta se ajustaron las condiciones de prueba y las cantidades en la mezcla de reacción. Los parámetros como el coeficiente de extinción molar de la NFN, la concentración de proteína y la concentración de NADPH, fueron adaptados para el ensayo como se describe a continuación:

el coeficiente de extinción molar se estableció a una λ de 373 nm ($\Delta\epsilon_{373}$) utilizando un intervalo de 1.2 a 33.6 μM de NFN disuelta en DMSO. Asimismo, la cantidad de proteína adecuada para los ensayos enzimáticos se seleccionó a partir de los datos obtenidos con el extracto citosólico de la cepa de *S. typhimurium* LT2 con 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de proteína.

4.3.1.1. Ensayo de actividad nitrorreductasa

Los ensayos de la actividad nitrorreductasa se realizaron utilizando los extractos citosólicos de las diferentes cepas de *S. typhimurium*, midiendo la reducción de NFN y la oxidación de NADPH. La reducción de NFN fue empleada con el fin de establecer la actividad nitrorreductasa de los extractos citosólicos y la oxidación de NADPH se empleó para cuantificar la actividad nitrorreductasa con los distintos nitrocompuestos.

4.3.1.1.1. Reducción de nitrofurantoína

La mezcla de reacción (1ml) se incubó a 25°C por 10 minutos, e incluyó Tris-HCl 50mM (pH 7.5), DTT 1mM, NFN 25 μM , 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de proteína y NADPH o NADH 100mM. La reacción se inició con la adición de NADPH o NADH y la velocidad inicial se determinó espectrofotométricamente mediante el monitoreo de la reducción de la NFN a 32 \pm 2°C. Cada tratamiento se realizó por triplicado y los valores del promedio se presentan en los resultados como la actividad nitrorreductasa (μmoles^{-1} de NFN reducida $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) con cada uno de los extractos citosólicos de las cepas A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺.

4.3.1.1.2. Oxidación de NADPH

La oxidación del NADPH se monitoreó utilizando las mismas condiciones que el ensayo de reducción de NFN, adicionando 25 μM de cada uno de los nitrocompuestos: NFN (CAS# 67-20-9), 4-Nitroquinolina 1-oxido (4NQNO) (CAS# 56-57-5), Nitrofurazona (NFZ) (CAS # 59-87-0) y Metronidazol (MTZ) (CAS# 443-48-1). Cada tratamiento se realizó por triplicado y los valores del promedio se presentan en los resultados como la actividad nitrorreductasa (μmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) con cada uno de los compuestos evaluados

4.3.2. Obtención de las nitrorreductasas *SnrA* y *Cnr* purificadas

4.3.2.1. Amplificación y clonación de *SnrA* y *Cnr*

Los genes *snrA* y *cnr* fueron amplificados a partir del ADN genómico de la cepa de *S. typhimurium* LT2, el cual fue obtenido siguiendo el protocolo descrito por Frederick y col.(63) con modificaciones. El pellet para la extracción del ADN de la bacteria, se obtuvo a partir de 25 mL de cultivo crecido durante 16 horas en medio LB a 37°C. El ADN total obtenido se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1% (agarosa ultrapure GIBCO BBL) en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA 1X). La amplificación de los genes *snrA* y *cnr* se realizó mediante la técnica de PCR (Mastercycler® - Eppendorf) con los oligonucleótidos SnrAF, SnrAR, CnrF y CnrR (Tabla 4). La mezcla de PCR estuvo conformada por 1.5 U de ADN polimerasa (Platinum Pfx DNA polymerase-Invitrogen), Buffer Pfx , 10 mM de DNTP's, 50 mM de MgSO₄ y 10 pmol de cada uno de los oligonucleótidos. Después de 2 minutos a 94 °C la amplificación se efectuó en 35 ciclos que incluyeron 40 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento de los oligonucleótidos en un intervalo de temperaturas que correspondió de 57.9 - 67.9°C y 55.9 a 65.9 para SnrA y Cnr respectivamente, 40 segundos de extensión a 68 °C y 5 minutos de extensión final a 68 °C. La purificación se efectuó con QUIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN INC) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa con buffer TAE.

Tabla 4. Descripción y nomenclatura de los oligonucleótidos utilizados

Oligonucleotido	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)
SnrAF	5'-CAC ATA TGA GTC CGA CCA TTG AAC TTC TTT G-3'	65.6
SnrAR	5'-GAG GAT CCC GCG TAT CAT ACA CTG GCC-3'	66.8
CnrF	5'-CAC ATA TGG ATA TCG TTT CTG TCG C-3'	60.5
CnrR	5'-CAG GAT CCT TAA ACT TCC GTC AGT GTG G-3'	59.2

*La temperatura de alineamiento se estimó utilizando el programa DNAMAN®

Los oligonucleótidos SnrAF/SnrAR, y CnrF/CnrR empleados en la amplificación de la secuencia codificante de *snrA* y *cnr*, contienen los sitios de corte para NdeI y BamHI (Fig. 8.). El producto amplificado por PCR, así como el vector de expresión pET15-b (Novagen, Cat. No. 69661-3), fueron digeridos con NdeI (Fermentas) y BamHI (New England Biolabs). Los productos generados luego de la restricción, se analizaron en un gel de agarosa con buffer TAE y posteriormente fueron purificados a partir del gel con QUIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN INC) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Posteriormente se realizó la unión de cada uno de los fragmentos y el vector lineal. La mezcla de unión incluyó 2 U de ADN ligasa (T4 DNA ligase [Roche]), amortiguador de unión y 100 pmol de cada uno de los fragmentos y del vector. A partir de cada uno de los productos de PCR digeridos y unidos al vector pET15-b, se originaron las construcciones que fueron denominadas como pET15b-*snrA* y pET15b-*cnr*.

Las cepas de *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) fueron proporcionadas por A. Vallecillo-Maza, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México (Tabla 5). Estas cepas se emplearon para la propagación del vector de expresión pET15-B (Novagen), la clonación y la expresión de las nitrorreductasas.

Tabla 5. Descripción y nomenclatura de las cepas bacterianas utilizadas

Cepa	Característica relevante
<i>E. coli</i> TOP10	F' (<i>lac</i> I ^q Tn10 (Tet ^R) <i>mcr</i> A Δ(<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) Φ80 <i>lac</i> ZΔM15 Δ <i>lac</i> X74 <i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rps</i> L (Str ^R) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- (<i>omp</i> T <i>hsd</i> S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3))
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F- (<i>dcm omp</i> T <i>hsd</i> S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)) [pLysS Cam ^r]

La cepa de *E. coli* TOP10F' fue transformada con cada una de las construcciones, utilizando el procedimiento descrito por Inoue y col. (74). La incubación de las células transformadas se hizo a

37°C en medio LB conteniendo 0.1 mg ml⁻¹ de ampicilina. La verificación de cada una de las construcciones se realizó mediante un análisis de restricción con enzimas que reconocen los sitios de corte dentro del fragmento y en el vector. Se emplearon las enzimas de restricción PvuII (Fermentas) y EcoRV (Fermentas) para el análisis de pET15b-*snrA* y pET15b-*cnr*, respectivamente. Finalmente para la expresión de las nitrorreductasas, se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y *E. coli* BL21 (DE3) con las construcciones pET15b-*snrA* y pET15b-*cnr*.

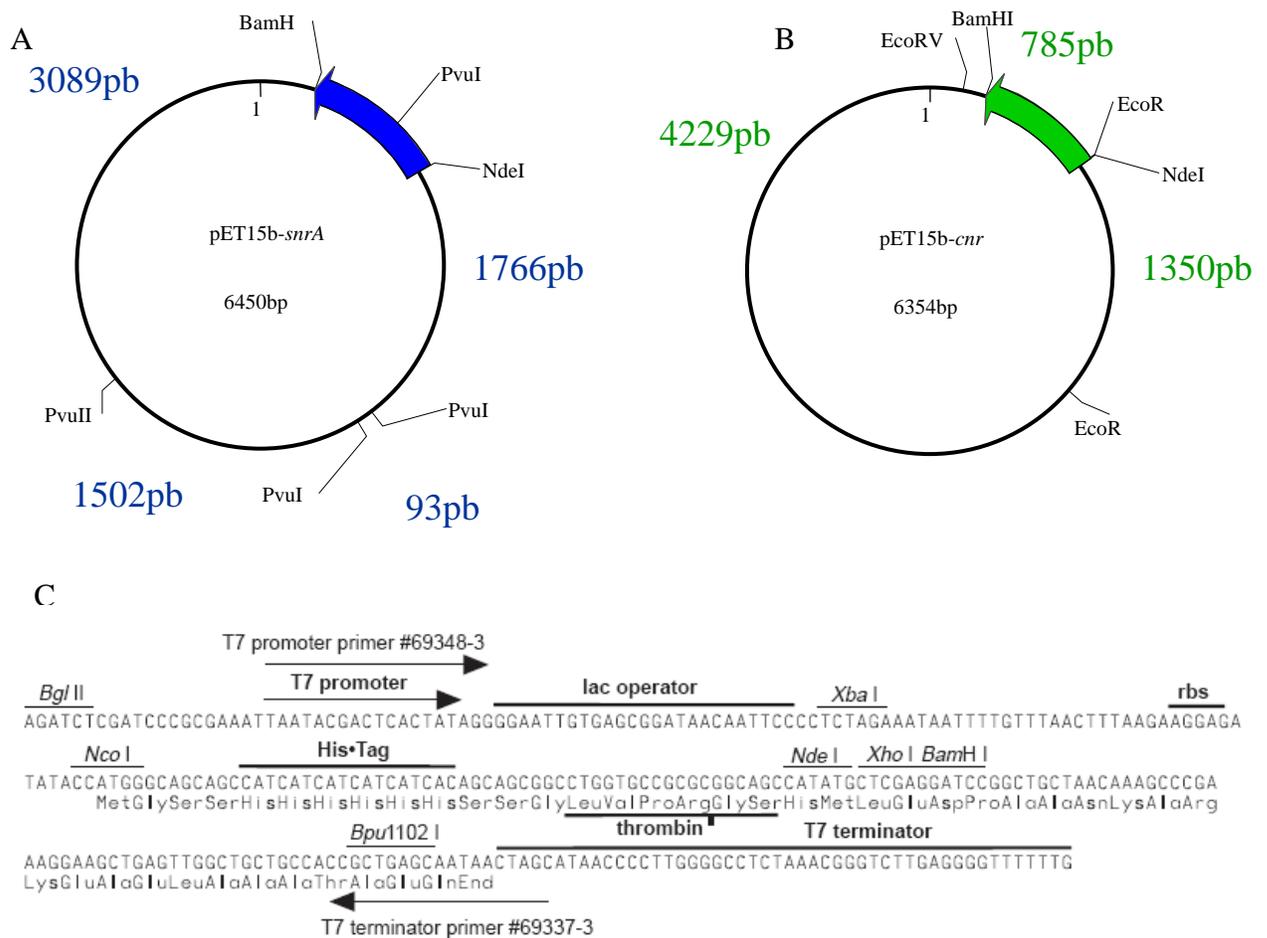


Figura 8. Vectores de expresión construidos a partir del plásmido pET15-b (Novagen), conteniendo los genes de las nitrorreductasas *snrA* (A) y *cnr* (B). El diagrama incluye los puntos de corte y la longitud de los fragmentos resultantes de la restricción con PvuII (pET15b-*snrA*) y EcoRV (pET15b-*cnr*) y. (C) Región de expresión y clonación del plásmido pET-15b. Las proteínas expresadas a partir de este vector incluyen una secuencia terminal con seis residuos de histidinas (His-Tag® N-terminal)

4.3.2.2. Expresión y purificación de SnrA y Cnr:

Las cepas construidas *E. coli* BL21(DE3) pLysS (F- *dcm ompT hsdS* ($r_B^- m_B^-$) *gal* λ (DE3) [pLysS Cam^r] acarreando pET-15b-*snrA* y *E. coli* BL21(DE3) (F- *ompT hsdS_B* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3) acarreando pET-15b-*cnr*, se utilizaron para la expresión de las proteínas SnrA y Cnr unidas en el extremo amino terminal a la secuencia con seis residuos de histidinas (Fig. 8). El crecimiento de las cepas se realizó de manera rutinaria a 37°C sobre Agar LB o en caldo LB complementado con ampicilina 0.4 mg ml⁻¹ a 150-200 rpm.

La presencia de cada uno de los plásmidos en la cepa de expresión y la comprobación de la restricción de los fragmentos correspondientes a los genes *snrA* y *cnr* se llevó a cabo de manera previa a la sobreexpresión de *His₆-SnrA* y *His₆-Cnr*. Se diluyó un mililitro del cultivo de las cepas construidas crecido durante toda la noche, en 100 ml de medio LB. Posteriormente se llevó a incubación a 37°C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar un valor de DO_{600nm}=0.6. La sobreexpresión de *His₆-SnrA* y *His₆-Cnr* se realizó una vez alcanzada la fase media exponencial de crecimiento, adicionando a cada uno de los cultivos 10uM de IPTG como inductor de la expresión y se continuó con la incubación durante cinco horas más bajo las mismas condiciones. La fracción citosólica se obtuvo a partir de la ruptura de las células bacterianas después de haber sido recuperadas por centrifugación a 10,000 x g por 30 minutos y lavadas con un amortiguador Tris-HCl 50mM y DTT 1mM (pH 7.5). El rompimiento de las células se realizó con ultrasonido y se recuperó el sobrenadante luego de la centrifugación a 100,000 x g por 60 minutos a 4°C. La concentración de proteína fue determinada de acuerdo a los protocolos descritos por Bio-Rad (Richmond, California) y Pierce (Rockland, Illinois) con una curva estandarizada de albúmina bovina (Sigma-Aldrich).

La purificación de *His₆-SnrA* y *His₆-Cnr* se realizó con cromatografía de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC) siguiendo un protocolo no desnaturizante diseñado para la purificación de proteínas unidas a la secuencia de seis histidinas. Para la purificación se utilizó una columna HisTrap HP (Amersham-Pharmacia Biotech) de 1 ml adaptada al sistema AKTA prime (Amersham-Pharmacia Biotech) siguiendo las especificaciones del proveedor. La fracción citosólica (5ml) se aplicó al equipo previamente preequilibrado con un amortiguador de unión

conteniendo Tris-HCl 50mM, DTT 1mM, NaCl 300mM e Imidazol 10mM, pH 7.5. Posteriormente la proteína unida a la columna fue recuperada con un gradiente del amortiguador de elusión compuesto por Tris-HCl 50mM, DTT 1mM, NaCl 300mM e Imidazol 500mM, pH 7.5. Las fracciones se recopilaron y almacenaron a 4°C. Posteriormente se monitorearon por SDS/PAGE teñida con Azul brillante de Coomassie R250 y con inmunoblot PVDF-Anti-His6-peroxidase® Roche. De acuerdo a los resultados, se unieron las fracciones conteniendo a cada nitrorreductasa, se concentraron por ultrafiltración utilizando una columna Vivaspin (Sartorius) de 10000 de PM y se recuperaron las fracciones suspendiéndolas en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50mM, DTT 1mM, pH 7.5. La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (Pierce, Rockland-Illinois) y la conservación de las fracciones se realizó con la adición de 5% de glicerol a -80°C.

4.3.3. Pruebas bioquímicas con las nitrorreductasas SnrA y Cnr purificadas

4.3.3.1. Compuestos:

Los siguientes compuestos fueron obtenidos comercialmente (Sigma-Aldrich Co. y Fluka Chemie) y se usaron tal y como fueron recibidos. Las soluciones de trabajo se manejaron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®): 2-metil-1,4-benzoquinona (2M1,4BQ; CAS no. 553-97-9), 2,3-dicloro-1,4-benzoquinona (2,3DC1,4BQ; CAS no. 117-80-6), 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (5,8DH1,4NQ; CAS no. 475-38-7), 1,4-naftoquinona (1,4NQ; CAS no. 130-15-4), 2-Metil-1,4-naftoquinona (2M1,4NQ; CAS no. 58-27-5), NFN, NFZ y 4-nitrobenzaldehido (4NBZ; CAS no. 555-16-8).

4.3.3.2. Determinación preliminar de los parámetros cinéticos de los nitrocompuestos y quinonas

La determinación preliminar de los parámetros cinéticos de la 2M1,4BQ; 2,3DC1,4BQ; 5,8DH1,4NQ; 1,4NQ; 2M1,4NQ; NFN; NFZ; 4NBZ, se realizó espectrofotométricamente siguiendo la oxidación del NADP(H) [$\Delta\epsilon_{340} = 6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (7)] a $25 \pm 2^\circ$. La mezcla de reacción (1 ml) incluyó 100 μM β -NADPH y 10 concentraciones diferentes del respectivo compuesto en un amortiguador de Tris-HCl 50mM, pH 7.0 en condiciones de aerobiosis. La reacción se inició por la adición de 20nM de *His*₆-SnrA (SnrA) ó *His*₆-Cnr (Cnr) a 4°C. La velocidad inicial de

reacción para cada concentración de compuesto se determinó considerándose la porción lineal de la curva monitoreada cada segundo durante los primeros 3 minutos. La linearización de los datos con el fin de obtener el valor de los parámetros cinéticos se realizó mediante los métodos de doble recíproco (Lineweaver-Burk), Eadie Scatchard, Wolf-Augustinsson-Hofstee y Haynes-Woolf .

4.3.3.3. Actividad nitro y quinona reductasas de SnrA y Cnr:

La actividad nitrorreductasa de SnrA y Cnr con cada uno de los nitrocompuestos y quinonas fue determinada como se describió en las pruebas preliminares, ajustando el intervalo de concentración con cada compuesto y el tiempo de lectura. La mezcla de reacción (1 ml) incluyó 100 μM β -NADPH y 10 concentraciones de cada compuesto de prueba: 2M1,4BQ; 2,3DC1,4BQ; 5,8DH1,4NQ; 1,4NQ; 2M1,4NQ; NFN; NFZ; 4NBZ. La velocidad inicial de reacción se obtuvo considerando la porción lineal de la curva la cual fue monitoreada cada segundo durante el tiempo establecido en las pruebas preliminares para cada compuesto. Se realizaron dos experimentos independientes con cada compuesto por duplicado y en la sección de resultados se presenta el promedio de la actividad nitrorreductasa ($\mu\text{moles de NADPH ox. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$) obtenida mediante el cálculo realizado con el programa ORIGIN®

4.4. Pruebas electroquímicas

4.4.1. Obtención del potencial de media onda, parámetros de medición y condiciones de prueba

La obtención de los valores de potencial redox se llevó a cabo utilizando voltamperometría cíclica y polarografía normal de pulsos. Los voltamperogramas y polarogramas resultantes de las pruebas, fueron registrados utilizando un potenciostato/galvanostato modelo 273A, EG&G Princeton Applied Research. Las condiciones para la voltamperometría cíclica se establecieron con cada compuesto con una velocidad de barrido de 100mV s^{-1} . El potencial inicial, de cambio y final fueron diferentes para cada compuesto. En el caso de los nitrocompuestos, la voltamperometría cíclica se empleó para realizar un sondeo preliminar con el propósito de establecer el intervalo de potencial adecuado para realizar la polarografía normal de pulsos. En el

caso de las quinonas, la voltamperometría cíclica se utilizó para obtener el valor de potencial redox. Para los nitrocompuestos, la polarografía se llevo a cabo con una velocidad de barrido de 5 mV s^{-1} , con un incremento de 4 mV, con un potencial inicial de -0.2V (0.03V – 1,3-DNP y 0.1V – 4NQNO) y un potencial final de -0.8V (-0.7V – 4NQNO). Todos los experimentos se realizaron en una celda electroquímica de 10 ml con un sistema de tres electrodos consistentes en un electrodo de trabajo HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode) (voltamperometría) y DME (Dropping Mercury Electrode) (polarografía), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl sat. E = +0.197 vs ENH). Se empleó como electrolito soporte 4:1 DMSO y un amortiguador con 0.1M de Tris-HCl (Promega®), preparado con agua purificada con un sistema Milli-Q (Millipore ®). Las soluciones stock de cada compuesto fueron preparadas a una concentración entre 10^{-3} y 10^{-4} M en DMSO (Merck®) y se prepararon diluciones a partir de la solución stock hasta obtener cuatro concentraciones finales. Estas concentraciones se seleccionaron de acuerdo con las características polarográficas de cada compuesto de prueba. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en una solución desoxigenada mediante el burbujeo de nitrógeno (N_2) por 10 minutos.

CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Pruebas de mutagenicidad

Selección de las concentraciones de prueba

Con el fin de determinar las diferencias a nivel de la activación de los nitrocompuestos, utilizando los extractos citosólicos de las cepas *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻, AB⁺, se realizó la selección de cuatro concentraciones de cada compuesto para llevar a cabo la prueba de Ames. Esta selección se hizo considerando la información obtenida de las curvas dosis respuesta, realizadas con el extracto citosólico de la cepa silvestre que posee las dos nitrorreductasas (AB⁺), como sistema de activación metabólica. Las cuatro concentraciones de cada nitrocompuesto se encuentran en la porción lineal de cada curva dosis-respuesta (Fig. 9)

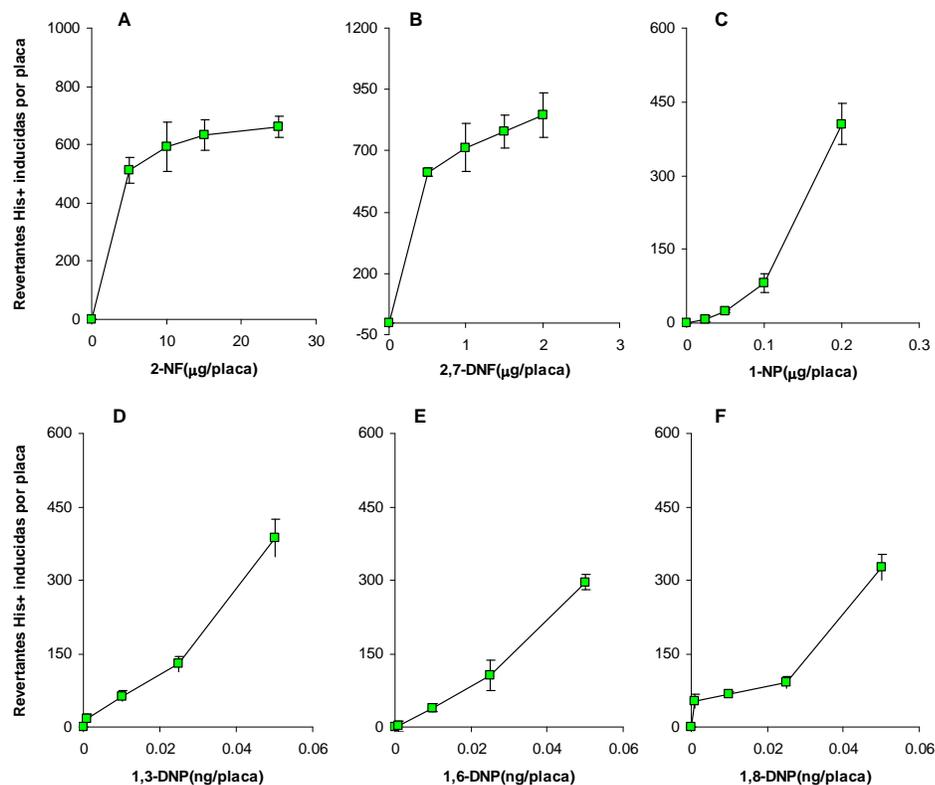


Figura 9. Respuesta mutagénica de *S. typhimurium* YG7132 en la curva dosis respuesta con el extracto celular de la cepa silvestre de *S. typhimurium* (AB⁺). Nitrocompuestos: a) 2-NF; b) 2,7-DNF; c) 1-NP; d) 1,3-DNP; e) 1,6-DNP; f) 1,8-DNP.

Las pruebas de mutagenicidad se realizaron después de las curva dosis respuesta, con los diferentes extractos citosólicos obtenidos de las cepas de *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺, con cada uno de los siguientes compuestos: 2NF; 2,7DNF; 1NP; 1,3DNP; 1,6DNP; 1,8DNP. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6. Cabe señalar que todos los nitrocompuestos empleados en las pruebas, producen predominantemente mutaciones por corrimiento de fase y con la cepa utilizada en el ensayo de Ames, *S. typhimurium* YG7132 (derivada de *S. typhimurium* TA98), fueron obtenidos los resultados derivados de este tipo de efecto mutagénico.

Tabla 6. Respuesta mutagénica de los nitrocompuestos después de su activación por las diferentes nitrorreductasas presentes en los extractos citosólicos.

Compuesto	Concentración (µg) por placa	Extracto citosólico de las cepas de <i>S.typhimurium</i> ¹				Sin extracto citosólico
		A ⁺	B ⁺	AB ⁻	AB ⁺	
2,7Dinitrofluoreno	0	23.3	32.3	32.3	32.3	32.3
	0.01	152.7	234.3	166.7	249.3	80.5
	0.025	314	512.7	288.3	534.7	118.7
	0.05	636	831	564.7	916.7	157.7
	0.1	897.3	1561	1064	1461.7	235
	Revertantes inducidas/µg*	9719	15953	10111	20313	3749
2-Nitrofluoreno	0	24.3	24.3	24.3	24.3	24.3
	0.1	65.3	78.7	65	141.7	47.3
	0.25	110	149.3	94	200	67.3
	0.5	140	183.3	190.3	311.3	99.3
	1	233.7	373.7	348.3	441	138
	Revertantes inducidas/µg*	229	359	320	959	219
1-Nitropireno	0	26.7	26.7	26.7	26.7	26.7
	0.025	37.3	69	36	73.3	32
	0.05	54.3	131.7	56	95.3	35.3
	0.1	103.3	206	104.3	141.7	66
	0.2	231.3	479	146	449.3	79.3
	Revertantes inducidas/µg*	852	1993	503	1242	288
1,3-Dinitropireno	0	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3
	0.001	24	27.7	27.7	43.7	27
	0.01	44.3	104.3	42.7	113	38.3
	0.025	51	140.3	47.7	302.7	31
	0.05	248.3	547.7	119.7	739	42
	Revertantes inducidas/ng*	111	514	87	995	24**
1,6-Dinitropireno	0	33.7	33.7	33.7	33.7	33.7
	0.001	58.3	87.3	79.7	86.7	56
	0.01	133	149.3	154.3	178	81
	0.025	199.3	157.3	149.3	192.3	87.7
	0.05	221.3	266	242	289.7	90.3
	Revertantes inducidas/ng*	958	1016	948	1206	323
1,8-Dinitropireno	0	29.7	29.7	29.7	29.7	29.7
	0.001	25.7	28.3	24.3	28.7	25.7
	0.01	49.3	88	54.7	44	41
	0.025	164.7	149.7	91.3	88.7	68.3
	0.05	203.3	336.3	220.7	251.7	144
	Revertantes inducidas/ng*	412	568	328	221	203

1. Extractos citosólicos de *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺

* Valor de la pendiente calculada con el programa SALANAL. **Sin diferencia significativa ANDEVA Valor de P = > 0.001.

El valor de la respuesta mutagénica sin compuesto se obtuvo como el promedio del número de colonias revertantes en seis placas en dos experimentos independientes

A partir de los resultados anteriores, se determinó el número de revertantes inducidas por nanomol.

Tabla 7. Revertantes inducibles His⁺ por nmol de nitrocompuesto

Nitrocompuesto	Extracto citosólico obtenido de las cepas de <i>S. typhimurium</i>				
	A ⁺	B ⁺	AB ⁻	AB ⁺	Control
2-Nitrofluoreno	48.4	75.8	67.6	202.6	46.3
2,7-Dinitrofluoreno	2490.2	4087.5	2590.6	5204.6	56.1
1-Nitropireno	210.7	492.8	124.4	307.1	71.2
1,3-Dinitropireno	32439.8	150216.5	25425.8	290788.8	7014.0
1,6-Dinitropireno	279975.5	296926.0	277053.0	352453.5	94396.8
1,8-Dinitropireno	120407.0	165998.0	95858.0	64587.3	59326.8

Considerando los datos presentados en la tabla 7, se puede concluir que todos los nitrocompuestos pueden ser activados a través de la catálisis reductiva y es mayor la activación con el extracto que tiene las dos nitrorreductasas (AB⁺). El número de revertantes por nanomol generado por el extracto AB⁺ es mayor con los compuestos 2-NF, 27-DNF, 1,3-DNP y 1,6-DNP, comparándolo con el resto de los extractos citosólicos, demostrando el aumento del efecto mutagénico cuando las dos nitrorreductasas están presentes. El extracto A⁺ produce 1.9 veces más revertantes que AB⁺ con el 1,8DNP, siendo éste el único sustrato en donde A⁺ tiene un papel relevante respecto a los otros extractos citosólicos. Los valores de revertantes por nanomol de A⁺ con el 1NP, 1,3DNP y 1,6DNP son inferiores a los obtenidos con AB⁺ y B⁺. En el caso de los nitrofluorenos (2DNF y 2,7DNF) A⁺ genera un número menor de revertantes que el extracto sin ninguna nitrorreductasa (AB⁻). Esto sugiere que la presencia de SnrA en el extracto es irrelevante para la activación de estos compuestos ya sea por una baja actividad hacia estos sustratos o una inhibición del proceso catalítico. En el caso del extracto B⁺, el número de revertantes por nanomol es mayor con los compuestos 1NP y 1,8DNP respecto de los valores de los demás extractos citosólicos. Al comparar los valores de revertantes por nanomol de B⁺ con A⁺, se puede decir que B⁺ genera 1.6 veces más revertantes que A⁺ con 2NF y 2,7DNF, y 2.3 y 4.6 veces más

con 1NP y 1,3DNP, respectivamente. Con 1NP y 1,8DNP, el número de revertantes de B⁺ respecto de AB⁺, resulta en 1.6 y 2.6 veces más revertantes.

En el caso del extracto que carece de SnrA y Cnr (AB⁻), el número de revertantes inducidas por nanomol con 1,8DNP, es 1.5 veces mayor respecto al valor obtenido con el extracto de la cepa silvestre AB⁺. Este resultado sugiere la presencia de otra enzima con actividad sobre el 1,8DNP, la cual podría generar un producto con características mutagénicas detectables mediante la prueba de Ames, utilizando la cepa de *S. typhimurium* YG7132. Sin embargo, en presencia de las dos nitrorreductasas en el extracto AB⁺, la actividad de esta enzima parece inhibirse. De forma contraria, con el 1,3DNP, el extracto citosólico AB⁺ respecto a AB⁻ resulta en 11.4 veces más el número de revertantes.

Con el objeto de corroborar si el número de revertantes obtenido con cada nitrorreductasa de manera individual (extractos A⁺ y B⁺), resulta en un número similar al obtenido con el extracto AB⁺, que contiene a las dos nitrorreductasas; se realizó la suma del número de revertantes. A partir de este análisis se puede decir que el número de revertantes del extracto que contiene a las dos enzimas es diferente. En el caso de los nitrofluorenos los valores de la suma de A⁺ y B⁺ es muy similar al obtenido con AB⁺. Con el 1NP, 1,6DNP y 1,8DNP, la suma del número de revertantes de A⁺ y B⁺ es 2.3, 1.6 y 4.4 veces mayor que el valor obtenido con la cepa AB⁺. No obstante, en el caso del 1,3DNP, el valor de la suma de A⁺ y B⁺ es inferior al obtenido con AB⁺, cuyo valor corresponde a 1.6 veces. Esta información sugiere que al menos con 1NP, 1,6DNP y 1,8DNP, la presencia de SnrA y Cnr en el mismo extracto citosólico, resulta en un efecto inhibitorio de alguna de las dos enzimas.

En algunos reportes publicados por otros autores, se ha sugerido que en términos de la mutagenicidad, determinada con la prueba de Ames, las nitrorreductasas de *S. typhimurium*, exhiben diferencias a nivel de la especificidad del sustrato (2,3,7). Estos estudios se han enfocado en comparar las respuestas mutagénicas de las diferentes cepas de *S. typhimurium* *his* G46 (TA100 y derivadas) y *his*3052 (TA98 y derivadas). Estas cepas no son isogénicas respecto a las dos nitrorreductasas (6) y la actividad que presentan es diferente hacia los nitrocompuestos.

Desde la década de los 70's, los ensayos de mutagenicidad han empleado diferentes cepas de *S. typhimurium* modificadas genéticamente, con el fin de determinar el potencial carcinógeno y mutagénico de diversos compuestos incluyendo varios nitrocompuestos aromáticos y heterocíclicos (más de 100 estudios de un total de 91 hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados [48]). Las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en los ensayos de mutagenicidad, además de tener modificaciones genéticas que proveen a la bacteria de una mayor sensibilidad a los mutágenos (mutación de *rfa*, *uvrB*, presencia del factor R) y la mutación en el operón de histidina (*his*), poseen deleciones que involucran, en algunos casos, la secuencia del gen *mdaA* de la NR SnrA. La deleción de *mdaA* es especialmente importante para el proceso de mutagénesis debido al papel ampliamente reconocido de las nitrorreductasas en la activación de nitroarenos a mutágenos (6). La falta de esta nitrorreductasa fue notada por Yamada y col. (37), en estudios de activación de nitrocompuestos por nitrorreductasas, reflejando las diferencias existentes en cuanto a la ausencia de la NR SnrA a nivel de las cepas de *S. typhimurium* empleadas en las pruebas de mutagénesis.

Al respecto, en la tabla 8 se presentan los valores del potencial mutagénico (revertantes His⁺ por nanomol de nitrocompuesto) de algunas cepas relacionadas con las empleadas en el presente trabajo. Dentro de estos reportes no se presenta información acerca de la nitrorreductasa SnrA, ni de la respuesta mutagénica con alguna cepa que posea solamente esta nitrorreductasa ya sea por deleción de *Cnr* en la cepa parental ó por introducción de un vector con el gen de esta nitrorreductasa. A pesar de esto, se pueden observar las diferencias en cuanto a la activación de los nitrocompuestos cuando la cepa carece de SnrA como es el caso de la cepa de *S. typhimurium* TA1538 y su derivada TA98.

Tabla 8. Potencial mutagénico en cepas de *S. typhimurium* empleadas en el ensayo de Ames

Cepa de <i>S. typhimurium</i>	Nitrorreductasa presente	Nitrocompuesto							
		1-NP	1,3-DNP	1,6-DNP	1,8-DNP	1-NN	2-NN	2-NF	2,7-DNF
RC1503^d	SnrA⁺	211	32440	279976	120407			48	2490
RC1378^d	Cnr⁺	493	150217	296926	165998			76	4087
TA98 ^a	SnrA ⁻ Cnr ⁺	237	144760	255000	734000				
TA98 ^b	SnrA ⁻ Cnr ⁺	453	144760	183570	254000	0.50	0.20	18	471
TA98 ^c	SnrA ⁻ Cnr ⁺	373			231000		2.9	47	
LT2^d	SnrA⁺ Cnr⁺	307	290789	352454	64587			203	5205
TA100 ^a	SnrA ⁺ Cnr ⁺	148	42658	12303	54954				
TA100 ^c	SnrA ⁺ Cnr ⁺	74			24900		11.2	28	
RC1517^d	SnrA⁻ Cnr⁻	124	25426	277053	95858			68	2591
TA98NR ^a	SnrA ⁻ Cnr ⁻	11	24750	209000	401000				
TA1538NR ^c	SnrA ⁻ Cnr ⁻	2060			46400		4.1	484	
TA1538 ^b	SnrA ⁻ Cnr ⁺	85	78960	61100	34700	-0.05	0.02	9.0	346
TA1538 ^c	SnrA ⁻ Cnr ⁺	20			43000		0.50	34	
TA98 ^{c*}	SnrA ⁻ Cnr ⁺⁺	24700			285000		20.5	926	
TA100 ^{c*}	SnrA ⁻ Cnr ⁺⁺	3050			163		42.7	163	
Efecto mutagénico predominante		CF	CF	CF	CF	SB	SB	CF	CF

*Cepa con Cnr en pBR322 (85)

CF: Corrimiento de fase, SB: Sustitución de bases

Referencias: a (48), b (10), c (85), d) Este trabajo

Considerando lo anterior, el presente trabajo es el primero en presentar la actividad de SnrA sobre los distintos nitrocompuestos evaluados en el ensayo de Ames. A partir de los datos y los reportados por otros autores, se puede decir que las diferencias existentes entre los valores de mutagenicidad obtenidos y los reportados se deben a la inclusión de los extractos citosólicos dentro del ensayo y por lo tanto en algunos casos el número de revertantes por nanomol es mayor, posiblemente por el efecto sumatorio de revertantes producidas por el extracto y por la cepa de prueba *per se*.

5.2. Pruebas bioquímicas

Con el fin de evaluar de manera más particular las diferencias encontradas en los experimentos de mutagenicidad entre las dos nitrorreductasas, se midió la actividad de las enzimas sobre diferentes nitrocompuestos y quinonas, primero con los extractos citosólicos y algunos compuestos y posteriormente con las enzimas purificadas.

5.2.1. Pruebas preliminares

El desarrollo de las pruebas bioquímicas con los extractos citosólicos de las distintas cepas y posteriormente con las proteínas purificadas, se realizó considerando la estandarización de varios de los parámetros de medición. A continuación se presentan los resultados obtenidos de esta estandarización y los valores utilizados para el desarrollo de las pruebas.

Coefficiente de extinción molar de la NFN y concentración de proteína

El coeficiente de extinción molar determinado ($\Delta\varepsilon_{373}$) $21.4\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 10), es similar al reportado por Liochev y col. (62). Los datos obtenidos y presentados en este trabajo, se obtuvieron considerando este coeficiente calculado bajo las mismas condiciones experimentales. La cantidad de proteína adecuada para realizar las pruebas de actividad reductasa con los extractos citosólicos, correspondiente a $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$, se seleccionó a partir de la porción lineal de la gráfica de actividad específica ($\mu\text{moles min}^{-1}$) vs. la concentración de proteína ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Concentración de NADH

La concentración de la coenzima NADPH seleccionada para los ensayos enzimáticos, fue de $100\ \mu\text{M}$ (Fig. 11). La selección de esta concentración se realizó a partir de los datos obtenidos teniendo en cuenta que la actividad específica, en $\mu\text{moles min}^{-1}$ de NFN reducida, es diferente de acuerdo a la fuente de equivalentes reductores empleada. Con el NADPH la cantidad de NFN reducida en el tiempo es mayor en comparación con la cantidad reducida con NADH como cosustrato, y considerando que las dos nitrorreductasas pueden usar NADPH, se siguió utilizando esta coenzima como fuente de electrones durante la catálisis medida espectrofotométricamente.

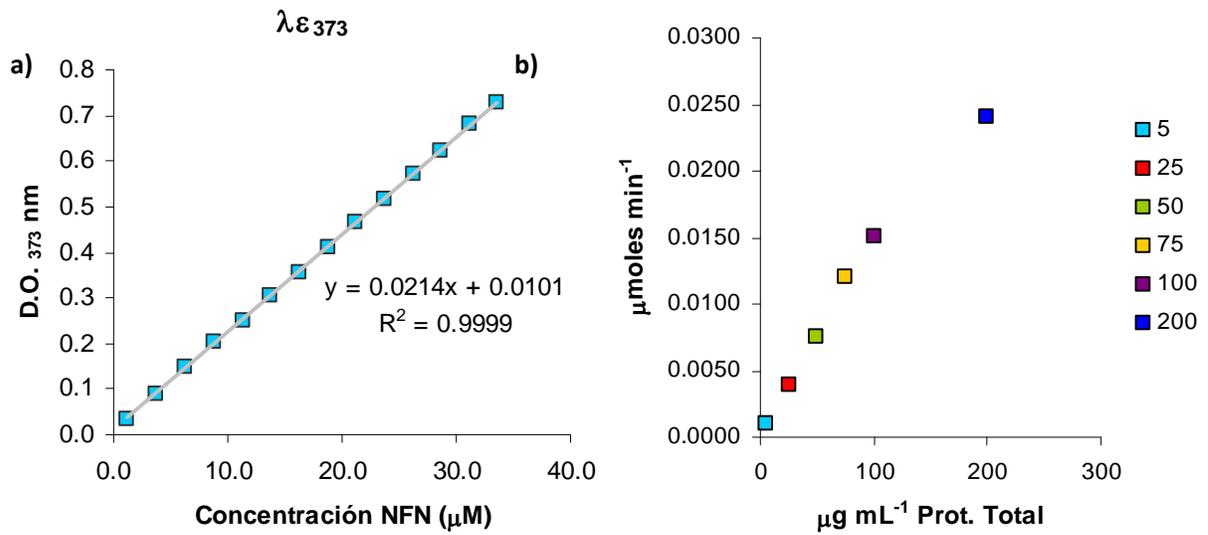


Figura 10. a). Obtención del valor del coeficiente de extinción molar de la NFN. b). Actividad enzimática a diferentes concentraciones de proteína del extracto celular de la cepa de *S. typhimurium* LT2 (AB+)

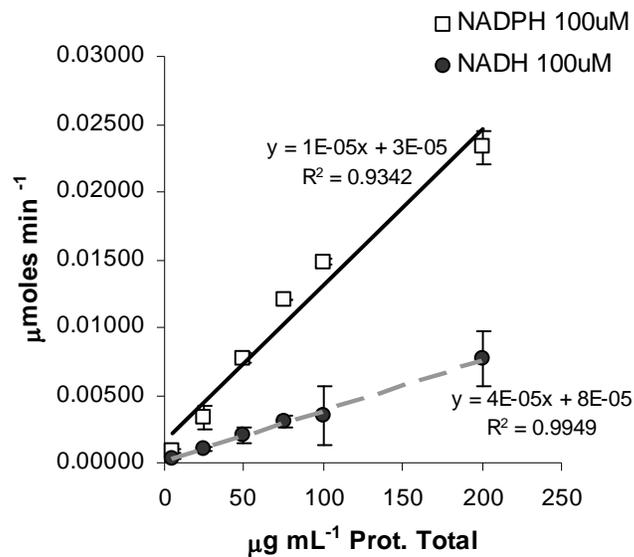


Figura 11. Actividad enzimática del extracto celular de la cepa de *S. typhimurium* LT2 (AB+) con NADH y NADPH para la selección de la concentración de la coenzima para el ensayo de reducción.

5.2.2. Ensayo de actividad nitrorreductasa con los extractos citosólicos

La actividad nitrorreductasa ($\mu\text{moles de NFN red. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$) de las cepas de *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺ fue determinada con las coenzimas NADPH y NADH. En la figura 12, se presentan los valores de velocidad de reducción de la NFN con cada uno de los extractos citosólicos utilizando las dos coenzimas.

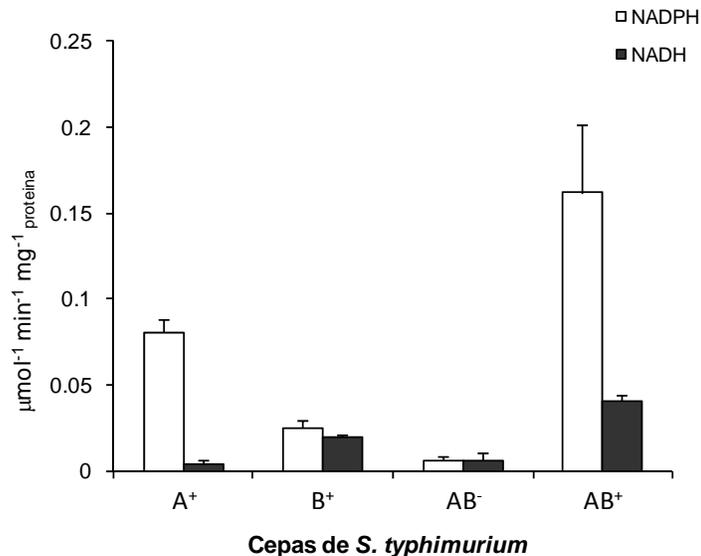


Figura 12. Actividad sobre la NFN de los extractos citosólicos de las cepas de *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺ con NADPH y NADH. Las diferencias entre los promedios se calcularon mediante una ANDEVA de una vía y la prueba de Tukey *P < 0.05

Aparentemente, la velocidad de reducción es mayor cuando se utiliza NADPH. Específicamente, A⁺ presenta una actividad 21 veces mayor con NADPH que con NADH y B⁺ reduce la NFN a la misma velocidad con ambas coenzimas. A⁺ con respecto a B⁺ reduce 3.1 veces más rápido la NFN con NADPH y la cepa AB⁺ reduce la NFN 3.9 veces más rápido con NADPH que con NADH, 2 veces más que A⁺ y 6.3 veces más que B⁺ con NADPH. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las cepas AB⁻ y B⁺ respecto a la utilización de NADH o NADPH.

Estos resultados concuerdan con las evidencias presentadas por Bryant y col. (22) con *E. coli* y Tatsumi y col.(5) con *S. typhimurium*, respecto a las diferencias entre las dos enzimas a nivel de la catálisis de la nitrofurazona y la utilización de las dos coenzimas con los extractos citosólicos bacterianos.

De igual forma, se determinó la oxidación de NADPH con las cuatro cepas de *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺, con los nitrocompuestos metronidazol, nitrofurazona, nitrofurantoína y 4 nitroquinolina 1-oxido (Fig. 13).

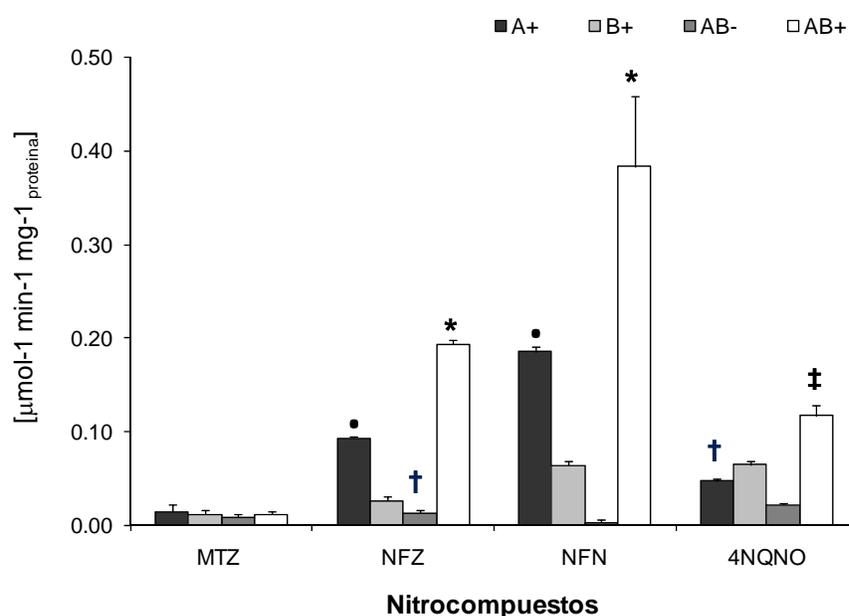


Figura 13. Actividad nitrorreductasa de los diferentes extractos citosólicos de las cepas de *S. typhimurium* A⁺, B⁺, AB⁻ y AB⁺ con NADPH y con los nitrocompuestos MTZ, NFZ, NFN y 4NQNO. La diferencia entre los promedios se calculó con un ANDEVA y la prueba de Tukey. *, P < 0.05 (versus los demás extractos citosólicos del mismo nitrocompuesto). ‡, P < 0.05 (vs. A⁺ y AB⁻).•, P < 0.05 (vs B⁺). †, P > 0.05 (vs. B⁺ del mismo compuesto).

Entre los extractos citosólicos no hay diferencias en cuanto a la actividad reductasa obtenida con el MTZ. Con la NFZ como sustrato, A⁺ reduce 3.6 veces más que B⁺ y 7.2 veces más que AB⁻. El extracto B⁺ reduce la NFZ dos veces más que AB⁻ y el extracto AB⁺ reduce a la NFZ 15 veces más que AB⁻. Con NFN, el extracto con A⁺ reduce 2.9 veces más que B⁺ y 59.6 veces más que

AB⁻. El extracto con B⁺ reduce 20.6 veces más que AB⁻ y AB⁺ reduce 123.2 veces más que AB⁻. Con 4NQNO no hay diferencias significativas entre A⁺ y B⁺ (Fig. 13).

Vale la pena mencionar que al igual que en las pruebas de mutagenicidad, la suma del valor de actividad de A⁺ y B⁺ respecto al obtenido con AB⁺ es diferente. Específicamente, con NFN y NFZ, la suma de los dos extractos corresponde al 61.4 y 65% de la actividad total obtenida con AB⁺, reflejando nuevamente la posible interferencia al estar presentes las dos nitrorreductasas en el mismo extracto.

5.2.3. Purificación de las nitrorreductasas SnrA y Cnr

Con el fin de profundizar acerca de las diferencias observadas en los ensayos de mutagenicidad y las pruebas bioquímicas empleando los extractos citosólicos y con el propósito de establecer una relación entre actividad enzimática de SnrA y Cnr y los valores de potencial de óxido reducción de los sustratos, se planteó la obtención de los parámetros cinéticos de las nitrorreductasas purificadas con diferentes nitrocompuestos y quinonas. A continuación se presentan los resultados de la clonación, la expresión y purificación de las nitrorreductasas y su posterior evaluación bioquímica.

5.2.3.1. Amplificación por PCR y clonación de los genes *nfsA* y *cnr*

A partir del ADN total aislado de *S. typhimurium* LT2, se logró la amplificación de los genes *snrA* y *cnr* con los oligonucleótidos SnrAF/SnrAR, y CnrF/CnrR. Los productos obtenidos con la prueba de PCR correspondieron al tamaño esperado para *snrA* (723pb) y *cnr* (654pb) (Figs. 14 y 15)

Es importante mencionar que para la amplificación de *snrA*, y con el fin de ajustar los dos oligonucleótidos a una temperatura de alineamiento óptima, fue necesario incluir un segmento de la secuencia corriente abajo del gen posterior al codón de paro, que en la secuencia de la proteína corresponde a la porción carboxilo terminal.

La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos determinó la calidad de la amplificación de los genes de *snrA* y *cnr*. En el caso de *snrA*, el intervalo de temperatura óptima fue de 65.9 a 66.9°C. Para la amplificación de *cnr* el intervalo de temperatura óptima fue de 60.1 a 61.4°C (Fig. 15 y Tabla 9.)

Tabla 9. Intervalos de temperaturas usadas para la amplificación de los genes *snrA* y *cnr*

Oligonucleótidos	Temperaturas de alineamiento				
	Carril 1	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5
SnrAF y SnrAR	60.8	62	64.7	65.9*	66.9**
CnrF y CnrR	56.7	57.6	58.8	60.1*	61.4**

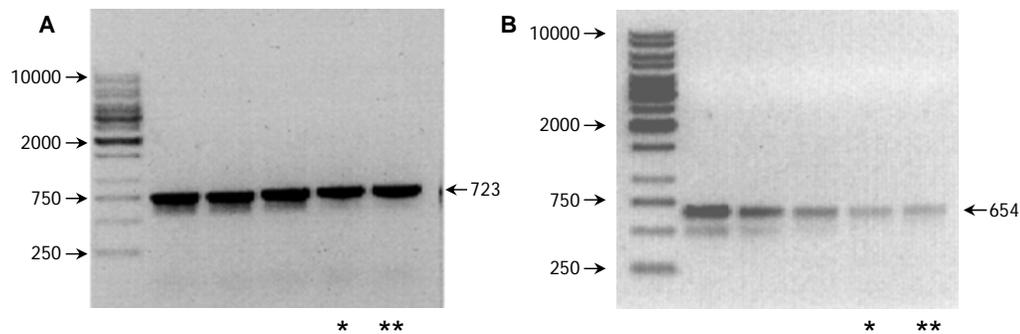


Figura 15. Productos de PCR de los genes *snrA* (A) y *cnr* (B). La temperatura de amplificación para cada carril se especifica en la tabla 3. El marcador de peso molecular empleado fue de 1Kb, de 14 fragmentos (MPM 1 Kb Gene Ruler ADN ladder Promega).

El vector de clonación y cada uno de los fragmentos amplificados y purificados se cortaron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I (Fig. 16). Posteriormente, cada uno de los fragmentos y el vector de clonación se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, se purificaron a partir del gel y se incluyeron en la mezcla de reacción de unión. A continuación se siguió el protocolo para la transformación de la cepa de *E. coli* TOP10F'. Con el fin de corroborar la transformación de la cepa de *E. coli* TOP10F' con cada una de las construcciones, se obtuvo el ADN plasmídico a partir de cuatro colonias diferentes y se realizó el corte con enzimas de restricción. El tamaño de

los fragmentos resultantes correspondieron a los tamaños esperados de acuerdo al análisis de restricción teórico: con *PvuII* para la construcción (93, 1502, 1766 y 3089 pb) y con *EcoRV* para pET15b-*cnr* (785, 1350, 4229 pb) (Fig. 16). Los tamaños de los vectores originales sin digestión enzimática corresponden a 6450pb para pET15b-*snrA* y a 6354 para pET15b-*cnr*.

Como se muestra en la figura 16, la digestión con *EcoRV* de pET15b vacío, genera dos fragmentos con un tamaño de 4229 y 2972pb. La cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y BL21(DE3) fueron transformadas finalmente con cada una de las construcciones pET15b-*snra* y pET15b-*cnr* aisladas, purificadas y verificadas de acuerdo al patrón de restricción esperado para cada caso.

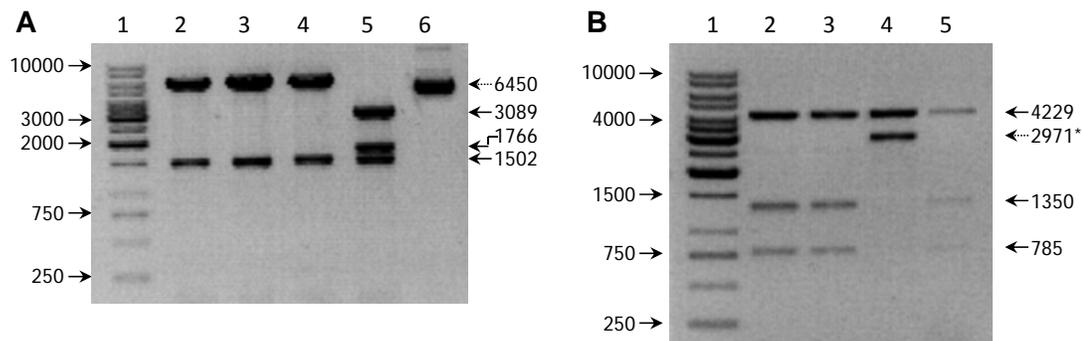


Figura 16. Productos obtenidos a partir del corte con enzimas de restricción: (A) Restricción con *PvuII* para la construcción pET15b-*snrA*. Carril 1 MPM (1 Kb Gene Ruler ADN ladder Promega), carriles 2, 3 y 4: construcciones que no cumplen el patrón de restricción, carril 5: construcción con el patrón de restricción esperado, carril 6: control (vector sin digerir). (B) Restricción con *EcoRV* para pET15b-*cnr*, carriles 2, 3 y 5 construcciones con el patrón de restricción esperado, carril 4: control (*vector digerido).

5.2.3.2. Expresión y purificación de *SnrA* y *Cnr*:

En la fase media exponencial de crecimiento de cada uno de los cultivos de las cepas de *E. coli* BL21 que contenían a pET15b-*snrA* y pET15b-*cnr*, se adicionó IPTG como inductor de la expresión. La concentración de IPTG se seleccionó de acuerdo al patrón de expresión obtenido

(Fig. 17). Como se mencionó en materiales y métodos, la recolección de las fracciones a partir de las cuales se recuperaron las nitrorreductasas purificadas, se hizo mediante cromatografía de afinidad con ion metálico inmobilizado (IMAC) como sistema de purificación, siguiendo un protocolo no desnaturalizante.

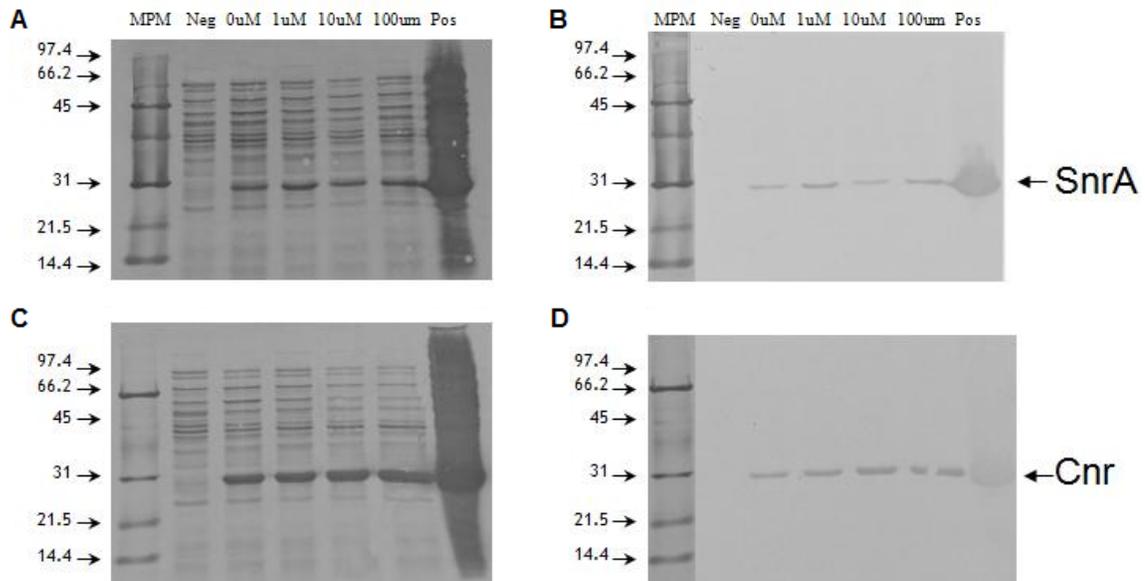


Figura 17. Inducción con IPTG 0, 1, 10 y 100 μ M. A y C) SDS/PAGE 12%, MPM: Standard S, Low range (Biorad). B y D) Inmunoblot (PVDF/Anti-*His6*-peroxidase® Roche). Control negativo (carril 2): Cepa sin plásmido. Control positivo (carril 7): citosol *His6*-NR verificada

Durante el proceso de purificación, se recuperaron 37 fracciones de cada uno de los citosoles conteniendo a SnrA y Cnr. Considerando su posición en cada cromatograma, las fracciones obtenidas fueron visualizadas con SDS/PAGE 12% y se seleccionaron aquellas con mayor cantidad y calidad de *His6*-SnrA y *His6*-Cnr, en adelante SnrA y Cnr. La presencia de SnrA y Cnr se hizo evidente por el intenso color amarillo característico del FMN. La colección se realizó uniendo las fracciones 14-20 (SnrA) y 13-19 (Cnr) (Fig. 18).

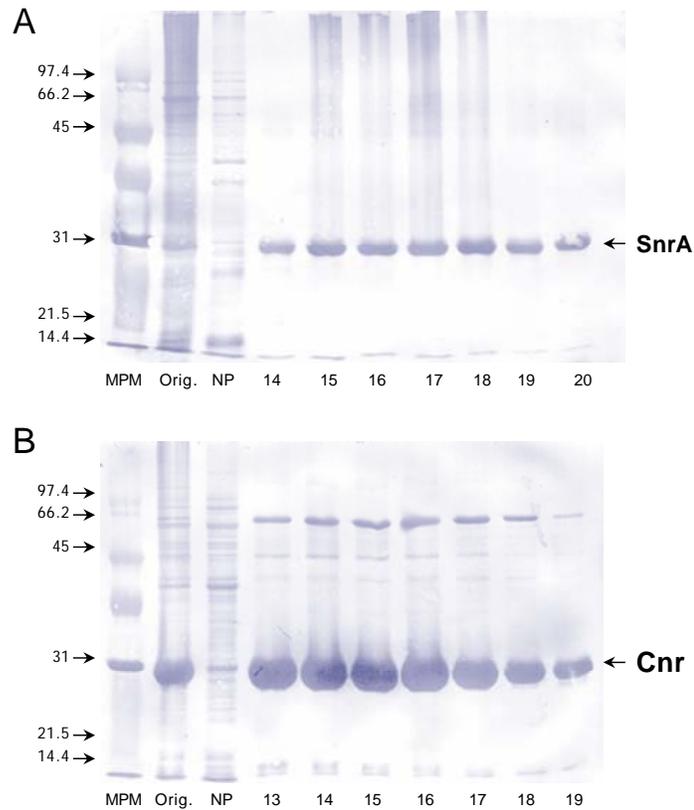


Figura 18. Análisis de las fracciones colectadas durante la segunda purificación de las nitrorreductasas SnrA y Cnr. SDS/PAGE 12%, Nitrocelulosa-Ponceau. MPM: Standard S, Low range (Biorad): Carriles: 1. MPM, 2. Citosol original, 3. Fracción no unida. Los números corresponden a la fracción colectada.

Las fracciones colectadas de cada nitrorreductasa se concentraron por ultrafiltración y se conservaron con glicerol al 5% a -80°C hasta su uso posterior en las pruebas de actividad bioquímica. A partir de esta purificación se obtuvieron 13ug por ml de LB de SnrA y 26 μg por ml de LB de Cnr aproximadamente. Estos valores de proteína corresponden al 6.5% y 79% de la cantidad total de proteína para SnrA y Cnr, respectivamente.

5.2.4. Determinación de los parámetros cinéticos con SnrA y Cnr purificadas

La determinación de los parámetros cinéticos V_{max} ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$), K_m (μM) y V_m/K_m ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}/\mu\text{M}$) se llevó a cabo mediante la medición espectrofotométrica de la oxidación de NADPH con 2-metil-1,4-benzoquinona (2M1,4BQ), 2,3-dicloro-1,4-benzoquinona (2,3DC1,4BQ), 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (5,8DH1,4NQ), 1,4-naftoquinona (1,4NQ), 2-Metil-1,4-naftoquinona (2M1,4NQ), Nitrofurantoína (NFN), Nitrofurazona (NFZ), 4-nitrobenzaldehído (4NBZ). Estos compuestos exhiben un intervalo de potencial redox (E^{17} , el cual se refiere al potencial de punto medio de un electrón a pH 7.0) de -282 a +90mV. La mezcla de reacción incluyó varias concentraciones del sustrato, las cuales fueron seleccionadas de manera preliminar. La velocidad inicial de reacción se calculó considerando la porción lineal de la curva la cual fue monitoreada cada segundo durante el tiempo adecuado. Los resultados presentados corresponden al promedio de dos experimentos independientes realizado por duplicado con 10 concentraciones del respectivo compuesto. Los valores de V_{max} y K_m fueron obtenidos con el programa ORIGIN® mediante el ajuste no lineal de los datos de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 10. Valores de V_{max} , K_m , y V_m/K_m de SnrA y Cnr con diferentes nitrocompuestos y quinonas

Compuesto	V_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) [*]			K_m (μM) [*]			V_m/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}/\mu\text{M}$) [*]		
	SnrA	Cnr	Relación	SnrA	Cnr	Relación	SnrA	Cnr	Relación
4-Nitrobenzaldehido	33±2	16±0.1	2.0x	147±1	175±9	1.2x	0.2±0.01	0.09±0.01	2.4x
Nitrofurazona	308±11	31±0.1	9.8x	26±0.1**	76±3	3.0x	12±0.9**	0.4±0.01	29.2x
Nitrofurantoína	330±8**	42±0.1	7.9x	38±0.5	50±0.1	1.3x	9±0.1	0.8±0.0	10.7x
2-Metil-1,4-Naftoquinona	77±18**	28±10	2.8x	204±50.0**	53±6	3.9x	0.4±0	0.5±0.3	1.4x
1,4-Naftoquinona	233±12**	61±5	3.8x	128±10**	12±1	10.5x	2±0.2	6±1	2.8x
5,8-Dihidroxi-1,4-Naftoquinona	49±4	8±4	5.9x	2±0.3	1±0.5	1.8x	22±0.9**	6±1	3.5x
2,3-Dicloro-1,4-Naftoquinona	55±2	27±3	2.0x	4±1	4±1	1.0x	15±3	7±2	2.0x
2-Metil-1,4-Benzoquinona	220±33**	79±4	2.8x	66±3	9±0.2	7.3x	3±0.6	9±1	2.6x

*Promedio obtenido con el programa ORIGIN. **ANDEVA, prueba de Tukey, valor de $P=0.05$.

El valor de la relación entre los parámetros cinéticos corresponde a la diferencia entre el máximo y el mínimo valor.

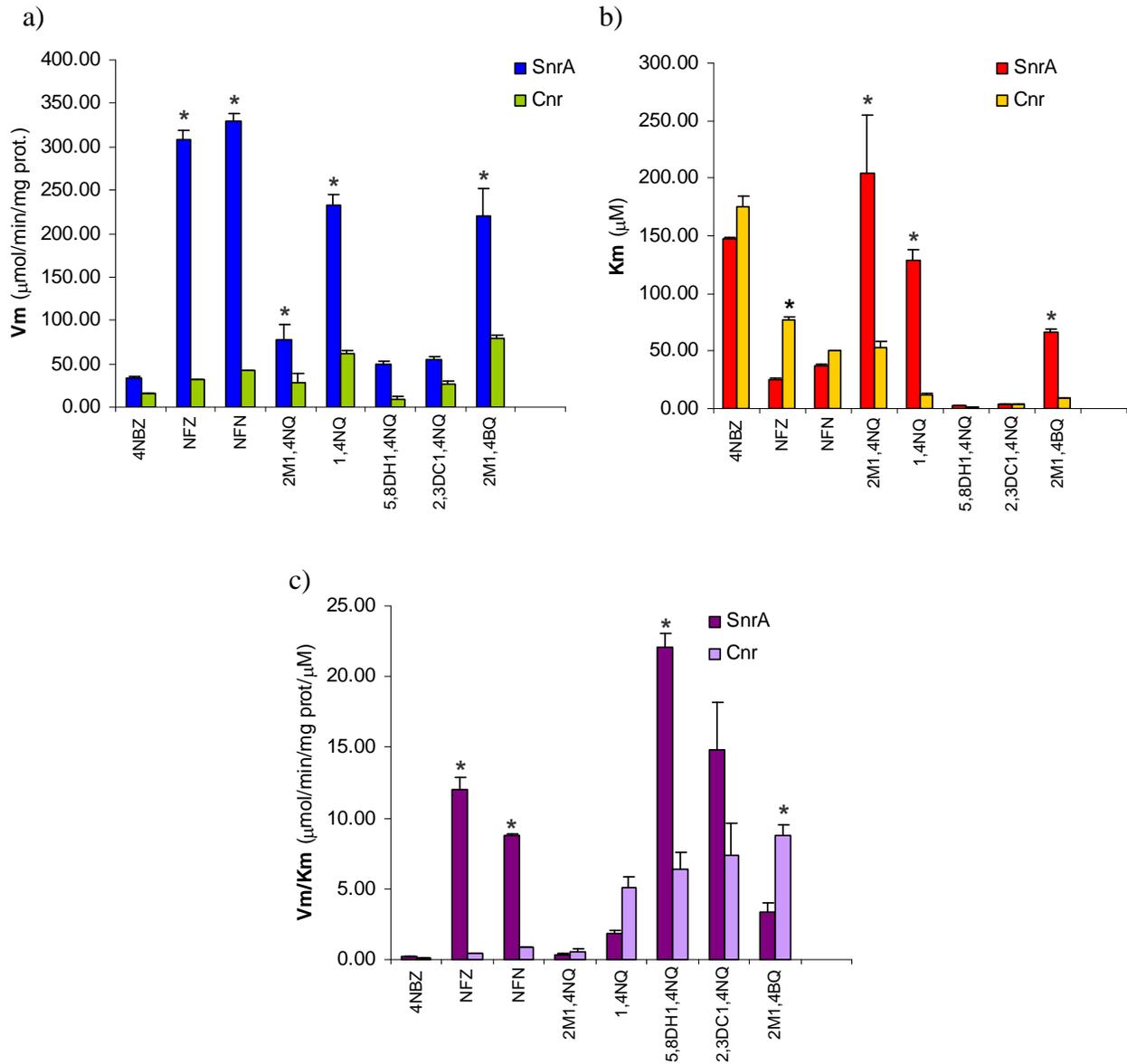


Figura 19. Datos de los parámetros cinéticos obtenidos con los diferentes nitrocompuestos y quinonas, con las nitrorreductas SnrA y Cnr purificadas. Los valores graficados corresponden a los valores promedio. a) Valores de V_{max} ($\mu\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}$), b) Valores de K_m (μM), c) Valores de V_{max}/K_m ($\mu\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg } \mu\text{M}$). *ANDEVA, Prueba de Tukey, valor de $p=0.05$

Los mejores resultados en cuanto a la capacidad catalítica (mayor a 2.5 veces el valor del parámetro) se obtuvieron con SnrA utilizando 2M1,4NQ, 1,4NQ, 5,8DH1,4NQ NFZ y NFN. Con estos dos últimos sustratos, la capacidad reductiva de SnrA es superior que con los demás

compuestos (330 ± 8 y 308 ± 11 $\mu\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}$) siendo esta actividad, 7.9 y 11 veces mayor que la de Cnr. La máxima capacidad catalítica de Cnr se logra con 2M1,4BQ (79 ± 4 $\mu\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}$) respecto de los demás sustratos, sin embargo este resultado es 2.8 veces menor comparado con SnrA. En el caso del valor de Km, la afinidad entre el sustrato y la enzima es mayor con 5,8DH1,4NQ como sustrato con ambas enzimas y es menor con 2M1,4NQ en el caso de SnrA y con NFZ en el caso de Cnr. En cuanto la eficiencia en el proceso de reducción, determinada mediante la relación V_{max}/K_m , SnrA reduce NFZ, NFN, 5,8DH14NQ, 4NBZ y 2,3DC1,4NQ, 29, 7, 3.5, 2.4 y 2 veces con mayor eficiencia que Cnr. Por el contrario, Cnr reduce las quinonas 1,4NQ y 2M1,4-BQ 2.8 y 2.6 veces más eficientemente que SnrA.

Considerando lo anterior, se puede concluir que las mayores diferencias entre las dos enzimas se encuentran en la utilización de sustratos como la NFZ, la NFN, 5,8DH-14NQ y 1,4-NQ. Retomando los datos bioquímicos obtenidos con los extractos citosólicos, la reducción de NFZ y NFN también favorece a SnrA respecto Cnr. Aunque los valores son menores en cuanto a la actividad enzimática ($\mu\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}$) se mantiene la proporción de una mayor actividad de SnrA con NFZ y NFN (3.6 y 2.9 veces más actividad reductasa en los ensayos con el extracto citosólico comparada con Cnr, respectivamente y 9.8 y 7.9 con las enzimas purificadas), conservándose la proporción de una mayor actividad de SnrA sobre la NFN. Desafortunadamente en las pruebas biológicas, los resultados obtenidos con NFZ y cada uno de los extractos citosólicos, no ofrecieron la información suficiente al respecto. Esto se debe a que la cepa YG7132 empleada en la prueba de Ames, la cual es derivada de la TA98, no es la más adecuada para ver el tipo de mutación generada por los nitrofuranos (datos no mostrados) y por lo tanto la relación de la actividad entre los datos biológicos y bioquímicos no pudo ser determinada.

Con fines comparativos, se muestra en la tabla 11 los datos de otros autores junto con los datos obtenidos en el presente trabajo. Debido a la falta de información respecto al valor de Km en la mayoría de estos reportes, solamente se exponen los valores de V_{max} y la comparación se realiza considerando este parámetro únicamente.

Tabla 11. Datos de actividad nitro/quinona reductasa de las enzimas homólogas de SnrA y Cnr reportados en la literatura

Sustrato	Actividad Nitro/quinona reductasa (μmol/min/mg prot)														
	NfsA ^{1B}	NfsA ^{xB}	NfsB ^{2A}	NfsB ^{yA}	NfsB ^{3A} **	FRP ^{4B}	FraseI ^{5A}	SnrA ^{6B}	Cnr ^{7A}	Cnr ^{zA}	NR ^{8A}	NfrA1 ^{9B}	NfrA10 ^B	SnrA ^B *	Cnr ^B *
Nitrocompuestos															
4-nitrobenzaldehido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.52 ^(d)	-	-	32.63	16.09
Nitrofurantoina	82	-	21	13	25.3	-	23	-	-	-	102	-	15	330.34	41.70
Nitrofurazona	73, 45 ^a , 83 ^b	30,65***	13	6	20.6	142	14	72.8	550	-	-	97	20	308.10	31.48
Quinonas															
1,4-Naftoquinona	-	-	60	115	35.5	-	48	-	-	-	200 ^(e)	-	-	232.66	61.43
2,3-Dicloro-1,4-naftoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ^(e)	-	-	55.43	27.06
2-Metil-1,4-benzoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	666 ^(e)	-	-	219.99	79.16
2-Metil-1,4-naftoquinona	24	77	-	-	16.7	119	-	-	136	0.349	50 ^(e) , 118.9 ^(d)	-	-	77.00	28.00
5,8-Dihidroxi-1,4-naftoquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111 ^(e)	-	-	48.70	8.20
Cofactores															
NADH ^C	-	-	-	-	-	-	-	-	102	0.29	-	-	-	-	-
NADPH ^C	85 ^a , 83 ^b	46	-	-	-	145	-	-	99	0.25	-	61	-	-	-
NADPH ^D	1 ^a	46	-	-	-	25	-	-	-	-	-	10	-	-	-

Referencias: 1(19), 2(28), 3(17), 4(20), 5(18), 6(2), 7(33), 8(9), 9(54), 10(55), 11(47), x(20), y(18), z(33), a(20), b(15), c(56), d(8). Cambio de aminoácido: x[E99G], y[F124S], z[L33R]. Valores obtenidos con: A(NADH), B(NADPH), C(NFZ), D(NFN), E(FMN), como donador o aceptor de electrones. *Valores obtenidos en este trabajo. **Valores obtenidos en condiciones de anaerobiosis. ***Condiciones no saturantes

A partir de los datos presentados en la tabla anterior, se puede concluir que las diferencias más importantes ocurren entre Cnr, los valores previamente reportados para esta nitrorreductasa y NR. Es importante mencionar que los valores reportados para las enzimas homólogas, se obtuvieron con NADH como fuente de equivalentes reductores y por esta razón las diferencias son notables con todos los compuestos exceptuando 4-NBZ y 2,3-DC-14NQ. El presente trabajo aporta información respecto a la actividad nitro y quinona reductasa de Cnr con NADPH como coenzima durante la catálisis siendo esta actividad 2 y 2.4 veces mayor comparada con NfsB con NFN y NFZ como sustratos.

Con SnrA, los valores obtenidos superan los reportados, con excepción de 2M14NQ y 58DH14NQ los cuales fueron comparados con NR que está más relacionada con Cnr (88% de identidad). A pesar de esto, la actividad de SnrA sobre sustratos como 4NBZ, 23DC14NQ, NFZ y NFN es superior que la reportada para NR y las otras nitrorreductasas relacionadas con SnrA como son FraseI, NfrA 1 y NfrA.

5.3. Pruebas electroquímicas

Obtención del potencial de media onda

Con el fin de relacionar el valor de potencial redox de los nitrocompuestos y quinonas empleados en los ensayos y los resultados de las pruebas de mutagenicidad y bioquímicas, se determinaron de los valores de potencial de media onda ($E_{1/2}$) de cada uno de ellos (Tabla 12). El valor promedio de ($E_{1/2}$) se determinó a partir de cuatro concentraciones (10^{-3} – 10^{-4} M). La metodología empleada para la medición del potencial obedeció al intervalo de voltaje observable en cada prueba, en particular en el caso de las quinonas al ser compuestos con valores más positivos, cercanos al valor de la barrera anódica del electrodo de trabajo ($Hg^0 \rightarrow Hg^{2+} + 2e^-$).

Tabla 12. Valores del potencial Redox $E_{1/2}$ de los compuestos evaluados biológica y bioquímicamente

Compuesto	E 1/2 (mV) vs ENH*			Valor de potencial reportado en la literatura
	pH 7.5	pH 7.0	pH 4.5	
1,8DNP	-280±6		-222±7	-555 ^a
1,6DNP	-312±6		-210±6	-493 ^a
4NQNO	-320±6		-247±18	-195 ^b
1,3DNP	-382±5		-240±3	-525 ^a
2,7DNF	-502±6		-502±11	-720 ^a
NFZ	-510±3	-341±26	-530±8	-282 ^b
NFN	-542±10	-282±6	-476±3	-255 ^f
1NP	-585±3		-572±13	-750 ^a
2NF	-670±6		-671±15	-870 ^a
1NN	-671±8		-658±9	-855 ^a
2NN	-687±17		-648±13	-850 ^a
MTZ	-782±6		-700±10	-480 ^c
2,3DC1,4NQ		197±5**		-35 ^d
1,4NQ		158±0.1**		-150 ^d
2M1,4NQ		47±7**		-200 ^d
5,8DH1,4NQ		35±2**		-110 ^d
2M1,4BQ		-159±5**		10 ^d
4NBZ		-298±10**		-315 ^e

*Valores de potencial obtenidos con polarografía normal de pulsos.

**Valores de potencial obtenidos con voltametría cíclica.

Referencias: a (10), b (65), c (64), d(9), e (56), f(13)

Los datos de potencial resultantes se compararon con los encontrados en la literatura. Existen variaciones en las condiciones experimentales utilizadas, sin embargo con los nitrocompuestos, se obtiene una buena la correlación entre los valores determinados y los reportados (Fig. 20). La comparación entre los datos de potencial de las quinonas, resulta en un valor de correlación inferior.

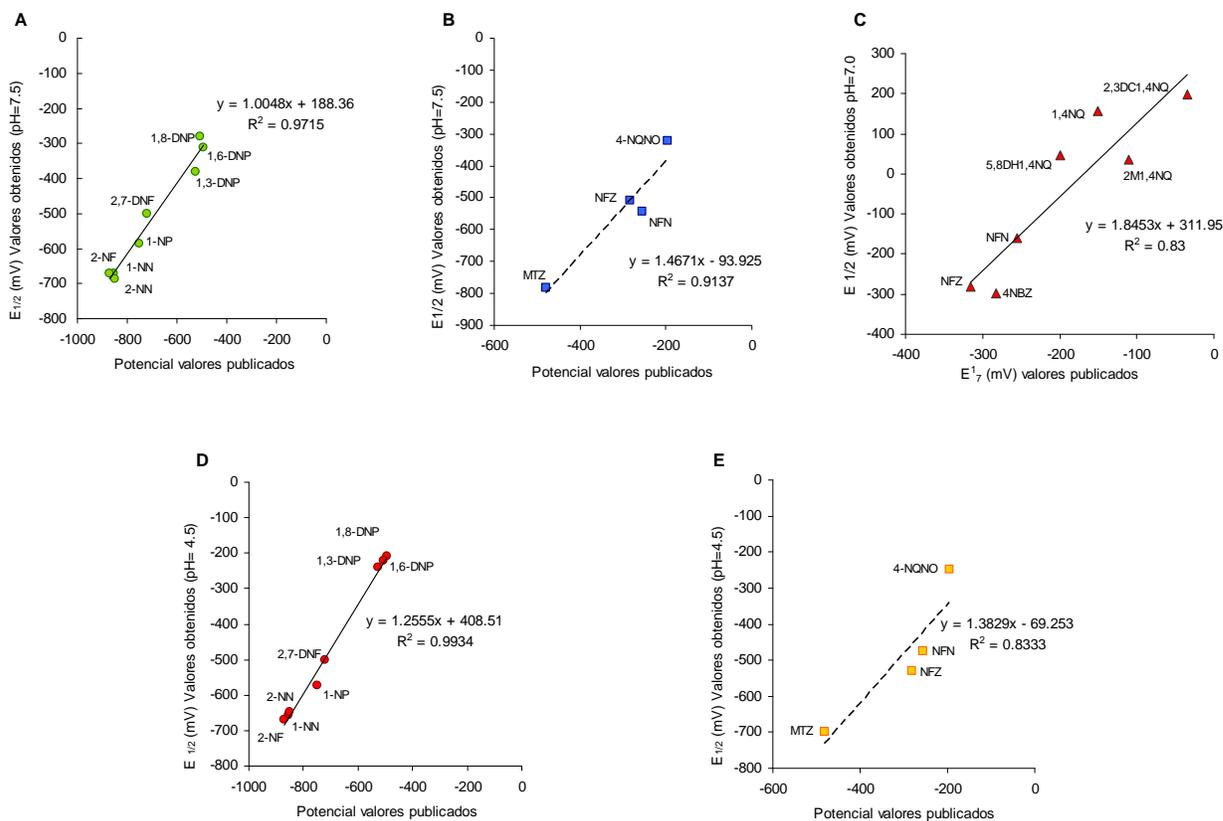


Figura 20. Correlación entre los valores de ($E_{1/2}$) reportado en la literatura vs el valor de ($E_{1/2}$) obtenido en este trabajo. Valores de $E_{1/2}$ a pH 7.5: (A) nitroaromáticos (B) nitroheterocíclicos. Valores de $E_{1/2}$ a pH 7.0 de las quinonas y algunos nitrocompuestos (C), valores de $E_{1/2}$ a pH4.5: (D) nitroaromáticos, (E) nitroheterocíclicos.

5.4. Integración, análisis de resultados y discusión final

Con el propósito de comprobar la hipótesis respecto a que la actividad catalítica de SnrA y Cnr evaluada biológica y bioquímicamente depende del valor de potencial redox de los compuestos reducibles, se graficaron los datos de potencial vs los de la actividad mutagénica obtenidos con

los extractos citosólicos de las diferentes cepas de *S. typhimurium* A⁺ y B⁺, así como los datos de potencial vs los valores de Vmax/Km de SnrA y Cnr purificadas. Específicamente para la primera comparación se utilizaron los compuestos con valores de -670 a -280mV y para la segunda, se emplearon los datos de los compuestos con valores de potencial de -315 a 10 mV.

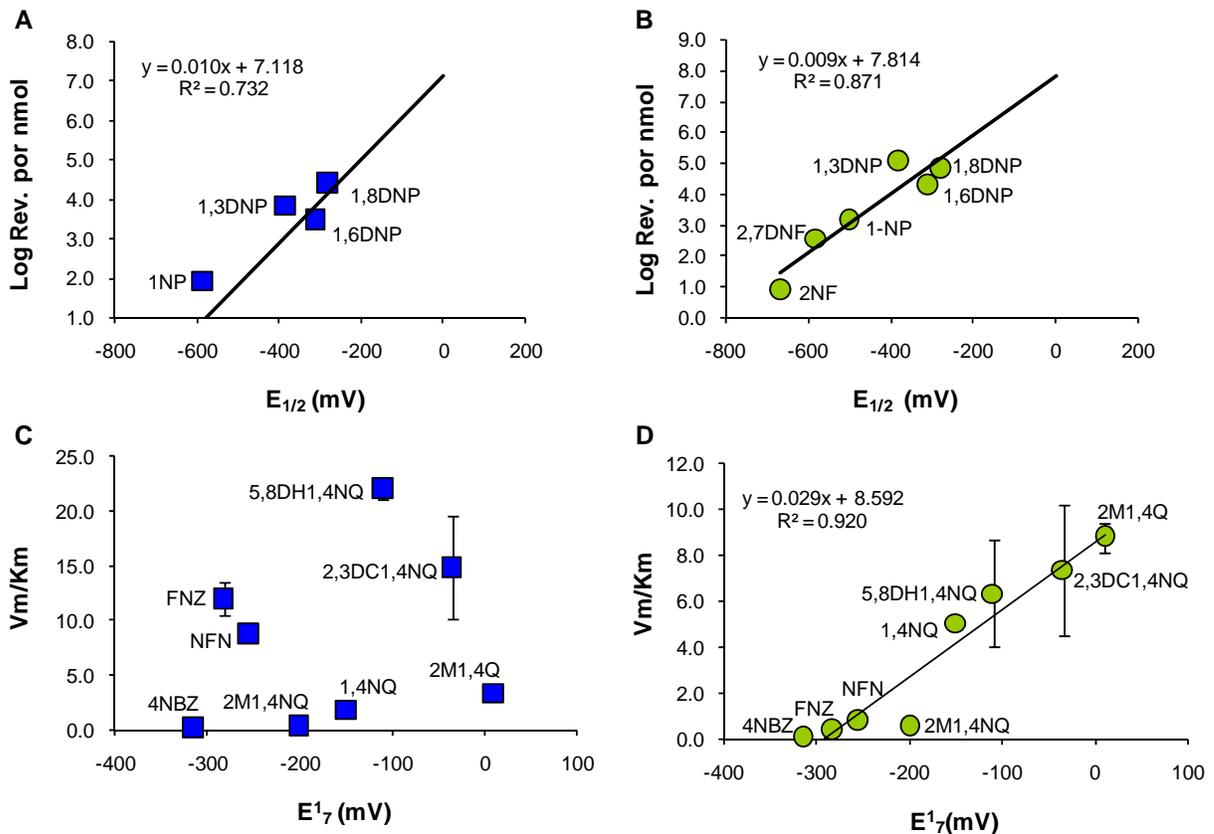


Figura 21. Relación entre los valores del potencial redox $E_{1/2}$ y los valores del logaritmo de la potencia mutagénica (revertantes producidas por nanomol) determinada para cada compuesto con el extracto citosólico A⁺ (A)* y B⁺ (B)*. Relación entre el valor del potencial redox $E^1_{7^{**}}$ y los valores de Vmax/Km para cada compuesto, evaluados con SnrA (C) y Cnr (D) purificadas.

*A estos datos se les sustrajo el valor de reversión obtenido con el extracto AB⁻ con el propósito de restar el efecto de otras enzimas incluidas en el extracto citosólico

**Valores tomados de las referencias 42 y 43.

La relación entre los valores de potencial redox ($E_{1/2}$) vs los de mutagénesis, obtenidos con el extracto citosólico A⁺ (SnrA), presenta un coeficiente de determinación intermedio ($R^2= 0.73$), indicando que el 73% de la variación de la potencia mutagénica de los nitrocompuestos reducidos por SnrA se explica por las características de oxidoreducción de los nitrocompuestos. Por lo tanto se puede afirmar, que la actividad de SnrA a nivel biológico, determinada con la prueba de Ames, depende parcialmente de las características redox de los sustratos. El 27% de la variación restante puede estar definida por otros factores no determinados.

En el caso del extracto que contiene a Cnr (B⁺), la relación entre los parámetros tiene un coeficiente de determinación intermedio (valor de $R^2=0.87$), indicando que el 87% de la variación de los datos de potencia mutagénica de los nitrocompuestos reducidos por Cnr se explican a partir de las características redox de los nitrocompuestos. Por consiguiente, se puede afirmar, que la actividad de Cnr a nivel biológico, determinada con la prueba de Ames, depende mayoritariamente de las características redox de los sustratos. El 13% de la variación restante puede estar definida por otros factores no determinados.

Considerando los resultados obtenidos de la regresión lineal realizada entre la eficiencia catalítica del proceso de reducción (V_{max}/K_m) y el potencial redox de los compuestos, se puede afirmar que en el caso de SnrA, la dispersión en la gráfica y la falta de una relación entre los dos parámetros ($R^2=0.06$, dato no mostrado) indica que la eficiencia catalítica de esta nitrorreductasa no está determinada por las características de oxidorreducción de los sustratos evaluados. Queda inconclusa la explicación en cuanto al coeficiente de determinación intermedio obtenido con las pruebas de mutagenicidad, el cual puede atribuirse a un factor ausente en las pruebas con las enzimas purificadas. En el caso del análisis con la nitrorreductasa Cnr, la relación entre los dos parámetros está definida por un buen ajuste de los datos, con un coeficiente de determinación que permite afirmar que el 92% de la variación de los datos de la eficiencia del proceso de reducción realizado por esta enzima está definido por las características de oxidorreducción de los nitrocompuestos, reafirmando la correlación obtenida a nivel biológico. El 8% de la variación restante queda indeterminada. A partir de esta apreciación se puede concluir que la movilización de los electrones realizada por la nitrorreductasa Cnr durante el proceso de reducción esta

definida por las características de los sustratos para aceptar los electrones transferidos, siendo el 1,8DNP y la 2M1,4BQ los compuestos con el valor de potencial más alto en cada prueba y con los que se obtienen los mejores resultados de mutagénesis y eficiencia catalítica por esta enzima.

Considerando el análisis anterior, se puede concluir que la actividad catalítica de SnrA evaluada biológicamente, depende parcialmente del valor de potencial redox de los compuestos reducibles, sin embargo a nivel bioquímico, no existe una dependencia entre los valores de potencial redox de los sustratos evaluados y la actividad de esta enzima. Por el contrario, la actividad catalítica de Cnr, evaluada biológica y bioquímicamente utilizando NADPH, depende mayoritariamente del valor de potencial redox de los compuestos reducibles, existiendo una correlación lineal entre los dos parámetros.

Una relación similar a la obtenida entre los valores del potencial redox $E_{1/2}$ y de la potencia mutagénica del extracto citosólico con Cnr, fue reportada previamente por Klopman y col. (10). Estos autores determinaron que la mutagenicidad de diversos nitrocompuestos con las cepas de *S. typhimurium* TA 98 (SnrA⁻, Cnr⁺) y TA 1538 (SnrA⁻, Cnr⁺) está directamente relacionada con su potencial de media onda ($E_{1/2}$). El valor del coeficiente de determinación que presentan estos autores ($R^2=0.94$), fue obtenido mediante la relación entre los dos parámetros. Bryant y deLuca (66) encontraron de igual forma, una relación lineal entre el potencial de punto medio de un electrón (E^{1_7}) y el logaritmo de la velocidad de reducción ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) de 7 nitrobenzenos por la nitrorreductasa homóloga de NfsB de *Enterobacter cloacae*, sin embargo no presentaron ningún valor del coeficiente de determinación para la relación lineal encontrada. Un resultado similar fue obtenido también por Nivinskas y col. (9), con la misma NR de *E. cloacae* utilizando el valor de K_{cat}/K_m de cada uno de los 19 compuestos empleados y sus valores de E^{1_7} (-485 a -255 mV). A diferencia de los reportes anteriores, el comportamiento de los datos fue descrito mediante un modelo parabólico, el cual según los autores, permitió explicar de mejor manera la correlación entre los dos parámetros ($R^2=0.70$).

Es importante resaltar que se han reportado evidencias respecto a la correlación entre diferentes nitrorreductasas de una misma bacteria y el potencial redox de sus sustratos. Esta información fue

obtenida por Sisson y col. (64). Estos autores mencionan que la preferencia de sustrato por cada una de las nitrorreductasas presentes en *Helicobacter pylori* (FrxA y RdxA) es dependiente del potencial redox de los nitrocompuestos. RdxA reduce MTZ (bajo potencial redox, -485 mV) y FrxA reduce nitrofuranos (alto potencial redox, 270mV), sin embargo, las dos enzimas reducen de igual forma nitazoxanida (intervalo medio de potencial redox, -360mV), indicando un traslape de actividad en este intervalo de potenciales redox. Esta evidencia sugirió al comienzo del presente trabajo y durante el planteamiento de la hipótesis, la posibilidad de que las dos nitrorreductasas encontradas en *S. typhimurium* presentaran este tipo de comportamiento, cada una con una preferencia determinada hacia un intervalo de potencial. Sin embargo con los datos obtenidos, se puede afirmar que a diferencia de las nitrorreductasas de *H. pylori*, la SnrA de *S. typhimurium* no tiene este comportamiento y Cnr muestra una relación con el potencial redox de sus sustratos.

De manera adicional, los datos presentados y analizados, ofrecen evidencia suficiente para catalogar a las nitrorreductasas de *S. typhimurium* en dos contextos diferentes. Cnr a nivel de las pruebas de mutagenicidad, genera un mayor número de revertantes y por lo tanto su papel es mayoritario durante este proceso medido en términos biológicos. No obstante, a nivel bioquímico y específicamente a nivel de la actividad, ya sea dentro del extracto citosólico o con la enzima purificada, SnrA reduce con mayor rapidez y mayor eficiencia la mayoría de los compuestos evaluados y por lo tanto a nivel bioquímico la nitrorreductasa SnrA tiene mayor importancia.

Una explicación de la diferencia de los datos biológicos y bioquímicos obtenidos con SnrA, pueden analizarse desde la perspectiva de los productos generados a partir del metabolismo reductor de las nitrorreductasas en el ensayo de Ames. La actividad biológica de los nitrocompuestos resulta a partir de la reducción del grupo nitro sobre la molécula y en el caso de las nitrorreductasas el metabolismo de este tipo de compuestos procede a través de la reducción secuencial por dos electrones generando compuestos nitroso, hidroxilamino y amino (68). Aunque no fueron determinados los metabolitos formados durante la catálisis de SnrA y Cnr, se podría sugerir, que los productos generados por esta última, corresponderían mayoritariamente a compuestos más electrofílicos o en mayor cantidad, a compuestos metabolizables por otras

enzimas que potencialicen sus características mutagénicas. Se ha descrito que el proceso de reducción realizado por las nitrorreductasas está acoplado al proceso de O-acetilación realizado por la acetilCoA: amina aromática N-acetiltransferasa (NAT) que metaboliza los metabolitos hidroxilamino a especies mucho más reactivas (38) que reaccionan con el ADN. Las diferencias en los productos resultantes de la catálisis entre las dos enzimas podrían llegar a explicar el papel mayoritario de Cnr en las pruebas biológicas a pesar de que SnrA tiene una mayor eficiencia en el proceso de reducción.

En la literatura, la nitrorreductasa NfsB de *E. coli*, la homóloga de Cnr, ha sido descrita como la “menor” nitrorreductasa en esta bacteria, la cual es sintetizada solo en una pequeña proporción respecto a la “mayor” NR, NfsA (15,17,20). Esta condición contrasta con la actividad obtenida a partir de los ensayos biológicos en donde la presencia de Cnr indica una mayor activación de los nitrocompuestos y en consecuencia una mayor mutagenicidad. No obstante, si se consideran los resultados de actividad nitrorreductasa medida espectrofotométricamente con los extractos citosólicos, la nitrorreductasa SnrA tiene mayor actividad en este tipo de ensayos. La cantidad de cada nitrorreductasa fue igualada en los ensayos con las enzimas purificadas con el propósito de uniformizar esta condición y aún así, la mayor actividad se obtiene con SnrA. Es importante mencionar lo descrito por Whiteway y col. (51) en cuanto a la resistencia de cepas de *E. coli* a furazolidona o nitrofurazona. En este estudio se demostró que el primer paso en la resistencia a estos nitrocompuestos, está relacionada con una mutación en el gen de NfsA y que el incremento en la resistencia se encuentra asociado con un segundo paso de mutación en NfsB, reconociendo distintos niveles y contextos para cada enzima a pesar de reducir un mismo grupo de sustratos.

A pesar de las similitudes encontradas por Hritz y col. (14), en la estructura tridimensional de las enzimas que conforman la familia de las nitro/flavín reductasas (15,21,26,40,41,42) y en particular entre la NfsA de *E. coli* (87% vs SnrA) y NfsB (88.5% vs Cnr), las diferencias catalíticas encontradas entre las dos nitrorreductasas de *S. typhimurium*, podrían analizarse desde la perspectiva estructural teniendo en cuenta las características de cada enzima a nivel de los residuos flexibles y de los aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr) que cubren el lado-*re* del sistema anillado de la flavína (Fig. 3 y 5), implicados en el acceso de los sustratos al sitio activo y

el incremento de la especificidad de la enzima (14). Asimismo, y de acuerdo con Race y col. (43), sería interesante analizar las diferencias del potencial electrostático de las nitrorreductasas y la distribución de cargas en el sitio activo como un factor determinante a nivel de la orientación del sustrato, su selectividad, la afinidad de unión y su reactividad.

En el caso de SnrA las propiedades redox de los sustratos y del sistema por sí mismo no definen la actividad catalítica y por el contrario, la catálisis se ve favorecida por otro factor independientemente de la capacidad de esta enzima para transferir los electrones durante la reducción. Estos factores podrían llegar a estar relacionados con el tamaño del sitio activo, su composición, la topografía y flexibilidad del mismo, la flexibilidad del FMN en el interior del sitio activo, así como la estructura particular de los sustratos y su orientación durante la catálisis. Al respecto, se podría evaluar la capacidad reductiva de las dos nitrorreductasas utilizando el mismo compuesto con variaciones en cuanto a la posición del grupo nitro o quinona, que exhiban diferencias en los valores de potencial redox para así determinar la participación de la estructura de los sustratos a nivel de la catálisis reductiva.

Por otra parte, desde el punto de vista biológico es importante analizar la implicación que tiene la actividad catalítica de las nitrorreductasas en especial en cuanto a la reducción dielectrónica de compuestos como las quinonas. El presente trabajo aporta información respecto a la actividad quinona reductasa de SnrA y Cnr, en particular con SnrA, cuyas características quinona reductasas no habían sido reportadas.

La posibilidad de que las nitrorreductasas formen parte de la defensa celular contra el estrés oxidante generado por las enzimas que llevan a cabo la reducción de nitrocompuestos, quinonas y colorantes por la transferencia de un solo electrón, ha sido referida constantemente en la literatura (23,62,2,67,55,70). Sin embargo no se ha demostrado una conexión directa entre la actividad quinona reductasa de las nitrorreductasas y su participación en eventos de protección antioxidante.

La expresión de la nitrorreductasa NfsA de *E. coli*, por ejemplo, puede estar regulada por tres reguladores transcripcionales que pertenecen a regulones implicados en la respuesta microbiana ante el estrés oxidante. Estos reguladores incluyen a marA, del regulón marRAB (65), soxS del regulón soxRS (62) y Rob, los cuales pertenecen a la misma familia de activadores AraC/XylS (68,69) y regulan la expresión de más de 70 genes implicados en la respuesta ante diferentes inductores de estrés.

Adams y Jia (53), quienes presentaron evidencia estructural y bioquímica acerca de la existencia de un ciclo redox quinona de tipo enzimático, específicamente por una monoquinol oxigenasa denominada YgiN la cual comparte su secuencia promotora con MdaB uno de los genes modulados por la expresión constitutiva de MarA identificados por Barbosa y col. (65). MdaB ha sido reportado como un modulador involucrado en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno formadas durante reacciones de reducción y oxidación por un solo electrón. Este gen al igual que MdaA (NfsA) fue identificado como uno de los genes involucrados en la resistencia al agente antitumoral DMP 840 (23).

Al respecto y considerando que SnrA y Cnr reducen eficientemente varias quinonas, sería interesante evaluar la capacidad protectora de estas ante los eventos de estrés oxidante generados a partir del metabolismo de las quinonas reducidas por un solo electrón y su relación con el ciclo redox quinona de tipo enzimático propuesto por Adams y col. (53).

Otros papeles fisiológicos como son la regulación de la acumulación de los donadores de electrones en el citosol bacteriano (15), así como la reparación de las proteínas dañadas durante el proceso de estrés (estrés disulfuro), podrían llegar a estar relacionados de igual forma con el mantenimiento del estado redox celular por parte de estas enzimas (55). Los miembros del regulón soxRS necesitan operar a diferentes niveles y de manera complementaria. Al respecto, la capacidad de las nitrorreductasas de oxidar coenzimas como el NADPH abren la posibilidad de participar no sólo como reductoras de algunos de los compuestos inductores de estrés como los nitrocompuestos y de quinonas implicadas en el transporte de electrones sino como enzimas que modulen los niveles de NADPH.

En ausencia de oxidantes, entre el 80-85% de la poza del NADPH en la cepa silvestre de *E. coli* está en estado reducido (31) y el mantenimiento del mismo bajo condiciones de estrés tal vez puede ser una de las funciones de estas enzimas considerando el amplio e indiscriminado grupo de sustratos aceptores de electrones que reducen. Hasta la fecha la pregunta acerca del papel fisiológico especialmente de las nitrorreductasas no ha sido resuelta. Sin embargo al compartir características bioquímicamente similares con enzimas como la DT diaforasa y características reguladoras con otras enzimas implicadas en el estado redox intracelular, abre la posibilidad de que estas enzimas pertenezcan al ciclo redox quinona y/o que participen activamente en el intrincado proceso de protección celular ante el estrés oxidante. Se necesitan estudios complementarios para definir de manera precisa el papel de estas enzimas en el citosol bacteriano y que a la vez permitan explicar la presencia de varias nitro/flavín reductasas en un solo microorganismo.

6. CONCLUSIONES

1. A partir de los diferentes resultados presentados en el presente trabajo, se puede concluir que la actividad catalítica de SnrA evaluada biológicamente, depende parcialmente del valor de potencial redox de los compuestos reducibles (73%), sin embargo a nivel bioquímico, no existe una dependencia entre los valores de potencial y la actividad de esta enzima. Por el contrario, la actividad catalítica de Cnr, evaluada biológica y bioquímicamente utilizando NADPH, depende mayoritariamente del valor de potencial redox de los compuestos reducibles, existiendo una correlación lineal entre los dos parámetros correspondiente al 87% y al 92%.
2. A partir de este trabajo se concluye igualmente, que todos los nitrocompuestos probados pueden ser activados a través de la catálisis reductiva por los diferentes extractos citosólicos utilizados en las pruebas de mutagenicidad, sin embargo, las diferencias en los productos resultantes de la catálisis entre las dos enzimas, podrían llegar a explicar el papel mayoritario de Cnr en estas pruebas a pesar de que SnrA tiene una mayor eficiencia en el proceso de reducción. Adicionalmente, se puede observar un aparente efecto inhibitorio de la actividad tanto en las pruebas biológicas como bioquímicas cuando las dos nitrorreductasas están presentes en el mismo extracto.

REFERENCIAS

1. **Koder**, R., Haynes, C., Rodgers, M., Rodgers, D., Miller, A. 2002. Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases. *Biochemistry*, **41**: 14197-14205
2. **Nokhbeh**, M., Boroumandi, S., Pokorny, N., Koziarz, P., Paterson, E., Lambert, I. 2002. Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA 1535. *Mutation Research*, **508**: 59-70
3. **Watanabe**, M., Ishidate, M., Nohmi, T. 1989. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA 98 and TA 100. *Mutation Research*, **216**: 211-220
4. **Paterson**, S., Boucher, S., Lambert, B. 2002. Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by SoxS. *Journal of Bacteriology*, **184**: 51-58
5. **Tatsumi**, K., Doi, T., Yoshimura H., Koga H., Horiuchi T. 1982. Oxygen-insensitive nitrofurane reductases in *Salmonella typhimurium* TA100. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **5**: 423-429.
6. **Porwollik**, S., Wong, R., Sims, S., Schaaper, R., DeMarini, D., McClelland, M. 2001. The DuvrB mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. *Mutation Research*, **483**: 1-11
7. **Carroll**, C., Warnakulasuriyarachchi, D., Nakhbeh, M., Lambert, I. 2002. *Salmonella typhimurium* mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductases *nfsA* and *nfsB*. *Mutation Research*, **501**: 79-98
8. **Bryant**, C., DeLuca, M. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 4119-4125
9. **Nivinskis**, H., Koder, R. L., Anusevicius, I., Sarlauskas, J., Miller, A., Cenas, N. 2000. Two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H nitroreductase: description of quantitative structure-activity relationships. *Acta Bioquímica Polonica*, **47**: 941-949
10. **Klopman**, G., Tonucci, D., Halloway, M., Rosenkraz, H. 1984. Relationship between polarographic reduction potential and mutagenicity of nitroarenes. *Mutation Research*, **126**: 139-144
11. **Peterson**, F. J., Mason, R. P., Hovsepian, J., Holzman, J. L. 1979. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**: 4009-4014
12. **McCalla**, D. R., A. Reuvers, C. Kaiser. 1970. Mode of action of nitrofurazone. *The Journal of Bacteriology*, **104**: 1126-1134.
13. **Frederick**, M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology* (2003) John Wiley & Sons.
14. **Hritz**, J., Zoldak, G., Sedlak, E. 2006. Cofactor assisted gating mechanism in the active site of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Proteins*, **64**: 465-76
15. **Kobori**, T., Sasaki, H., Lee, W., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M., Tanokura, M. 2001. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 2816-2823

16. **Koder**, R. L., Oyedele, O., Miller, A. 2001. Retro-Nitroreductase, a putative evolutionary precursor to *Enterobacter cloacae* strain 96-3 Nitroreductase. *Antioxidants & Redox Signaling*, **3**: 745-755
17. **Rau**, J., Stolz, A. 2003. Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawsone-dependent azo reductases. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3448-3455
18. **Zenno**, S., Koike, H., Tanokura, M., Saigo, K. 1996. Conversion of NfsB, a minor *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*, by a single amino acid substitution. *Journal of Bacteriology*, **178**: 4731-3.
19. **Zenno**, S., Hoike, H., Kumar, A. N., Jayaraman, R., Tanokura, M., Saigo. 1996. Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, **178**: 4508-4514
20. **Zenno**, S., Kobori, T., Tanokura, M., Saigo, K. 1998. Conversion of NfsA, the major *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase with an activity similar to that of Frp a flavin reductasa in *Vibrio harveyi*, by a single amino acid substitution. *Journal of Bacteriology*, **180**: 422-425
21. **Lovering**, A. L., Hyde, E. I., Searle, P. F., White, S. A. 2001. The structure of *Escherichia coli* nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **309**: 203-213
22. **Bryant**, D. W., McCalla, D. R., Leeksa, M., Leneuville, P. 1981. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, **27**: 81-86
23. **Chatterjee**, P. K., N. L. Sternberg. 1995. A general genetic approach in *Escherichia coli* for determining the mechanism(s) of action of tumoricidal agents: application to DMP 840, a tumoricidal agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 8950–8954.
24. **Bryant**, C., Hubbard, L., McElroy, W. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 4126-4130
25. **Lei**, B., Liu, M., Huang, S., Tu, S.C. 1994. *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. *The Journal of Bacteriology*, **176**: 3552-3558
26. **Tanner**, J., Lei, B., Liu, M., Tu, C., Krause, K. 1996. Flavin reductase P: Structure of dimeric enzyme that reduces flavin. *Biochemistry*, **35**: 13531-13539
27. **Kumar**, A., Jayaraman, R. 1991. Molecular cloning characterization and expression of a nitrofurantoin reductase gene of *Escherichia coli*. *Journal of Biosciences*, **16**: 145-149
28. **Zenno**, S., Koike, H., Tanokura, M., Saigo, K. 1996. Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to Frase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *The Journal of Biochemistry*, **120**: 736-744
29. **Blattner**, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayher, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, G. Mau, Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **227**: 1453–1462.

-
30. **Kang**, W.-K., T. Icho, S. Isono, M. Kitakawa, K. Isono. 1989. Characterization of the gene *rimK* responsible for the addition of glutamic acid to the C-terminus of ribosomal protein S6 in *Escherichia coli* K12. *Molecular and General Genetics*, **217**: 281–288.
 31. **Krapp**, A.R., Rodriguez, R.E., Poli, H.O., Paladini, D.H., Palatnik, J.F., Carrillo, N. 2002. The flavoenzyme ferredoxin (flavodoxin)-NADP(H) reductase modulates NADP(H) homeostasis during the soxRS response of *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, **184**:1474-80
 32. **Prinz**, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., Beckwith, J. 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 15661–15667.
 33. **Watanabe**, M., Nishino, T., Takio, K., Sofuni, T., Nohmi, T. 1998. Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry*, **37**: 23922-23928
 34. **Watanabe**, M., Ishidate, M., Nohmi, T. 1990. Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucleic Acids Research*, **18**: 1059
 35. **Barbosa**, M., Levy, S. 2002. Activation of the *Escherichia coli* *nfnB* gene by MarA through a highly divergent marbox in a class II promoter. *Molecular Microbiology*, **45**: 191-202
 36. **Salamanca-Pinzon**, S.G, Camacho-Carranza, R., Hernandez-Ojeda, S.L., Espinosa-Aguirre J.J. 2006. Nitrocompound activation by cell-free extracts of nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains. *Mutagenesis*, **21**: 369-74
 37. **Yamada**, M., Espinosa-Aguirre, J., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. 1997. Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA 1535 and TA 1538. *Mutation Research*, **375**: 9-17
 38. **Maron**, D., Ames, B., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**: 173-215
 39. **Haynes**, C., Koder, R., Miller, A., Rodgers, D. W. 2002. Structures of nitroreductase in three states. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 11513-11520
 40. **Parkinson**, G. N., Skelly, J. N., Neidle, S. 2000. Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: A prodrug-activating enzyme. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**: 3624-3631
 41. **Hecht**, H.J, Erdmann, H, Park, H.J, Sprinzl, M, Schmid, R.D. 1995. Crystal structure of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Nature Structural & Molecular Biology*, **2**: 1109–1114.
 42. **Koike**, H., Sasaki, H., Kobori, T., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M., Adman, E., Tanokura, M. 1998. 1.8 Å Crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins. *Journal of Molecular Biology*, **280**: 259-273
 43. **Race**, P. R., Lovering, A. L., Green, R. M., Osson, A., White, S. A., Searle, F. P., Wrighton, C. J., Hyde, E. 2005. Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. **280**: 13256-13264

44. **Fraaije**, M.W, Mattevi, A. 2000. Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. Trends in Biochemical Sciences, **25**: 126–132
45. **Ghisla**, S., Massey, V. 1989. Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. European Journal of Biochemistry, **181**: 1–17
46. **Rafii**, F., Franklin, W., Cerniglia, C.E. 1990. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. Applied and Environmental Microbiology, **56**: 2146-51
47. **Kwak**, Y. H., Lee, D. S., Kim, H. B. 2003. *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. Applied and Environmental Microbiology, **69**: 4390-4395
48. **Kielhorn**, D., Wahnschaffe, U., Mangelsdorf, I. Selected Nitro-And Nitro-Oxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental Health Criteria 229). Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, The International Labour Organization and the World Health Organization, and produced within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. 2003 pp
49. **Chesis**, P.L, Levin, D.E, Smith, M.T, Ernster, L, Ames, B.N. 1984. Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **81**: 1696-700
50. **Spain**, J. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annual Review of Microbiology, **49**: 523-555
51. **Whiteway**, J., Koziarz, P., Veall, J., Sandhu, N., Kumar, P., Hoecher, B., Lambert, I. 1998. Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-Nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, **180**: 5529-5539
52. **Schmitt**, H., Altenburger, R., Jastorff, B., Schüürmann, G. 2000. Quantitative structure-activity analysis of the algae toxicity of nitroaromatic compounds. Chemical Research in Toxicology, **13**: 441-450
53. **Adams**, M.A. Jia, Z. 2005. Structural and biochemical evidence for an enzymatic quinone redox cycle in *Escherichia coli*: identification of a novel quinol monooxygenase. Journal of Biological Chemistry, **280**: 8358-63
54. **Zenno**, S., Kobori, T., Tanokura, M., Saigo, K. 1998. Purification and characterization of NfrA1, a *Bacillus subtilis* nitro/flavin reductase capable of interacting with the bacterial luciferase. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **62**: 1978-87
55. **Streker**, K., Freiberg, C., Labischinski, H., Hacker, J., Ohlsen, K. 2005. *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. Journal of Bacteriology, **7**:2249-56.
56. **Nivinskis**, H., Staskeviciene S., Sarlauskas, J., Koder, R., Miller, A., Cenas, N. 2002. Two-electron reduction of quinones by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H: nitroreductase: quantitative structure-activity relationships. Archives of Biochemistry and Biophysics, **403**: 249-258
57. **Li**, X., Tu, S.C. 2006. Activity coupling of *Vibrio harveyi* luciferase and flavin reductase (FRP): oxygen as a probe. Archives of Biochemistry and Biophysics, **454**: 26-31.
58. **Tanner**, J., Lei, B., Liu, M., Tu, C., Krause, K. 1994. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of NADPH:FMN oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. Journal of Molecular Biology, **241**: 283-287

-
59. **Tatsumi**, K., Doi, T., Yoshimura H., Koga H., Horiuchi T. 1982. Oxygen-insensitive nitrofurantoin reductases in *Salmonella typhimurium* TA100. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **5**: 423-429.
60. **Sarlauskas**, J., Nemeikaite-Ceniene, A., Anusevicius, Z., Miseviciene, L., Julvez, M.M., Medina, M., Gomez-Moreno, C., Cenas, N. 2004. Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxylamino- and amino metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene: implications for their cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **425**: 184-192
61. **Maron**, D., Ames, B., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**: 173-215
62. **Liochev**, S., Hausladen, A., Fridovich, I. 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**: 3537-3539
63. **Frederick**, M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology* (2003) John Wiley & Sons.
64. **Sisson**, G., Goodwin, A., Raudonikiene, A., Hughes, N., Mukhopadhyay, A., Berg, D., Hoffman, P. 2002. Enzymes associated with reductive activation and action of Nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 2116-2123
65. **Olive**, P. 1981. Correlation between the half-wave reduction potentials of nitroheterocycles and their mutagenicity in chinese hamster V79 spheroids. *Mutation Research*, **82**: 137-145
66. **Barbosa**, T.M, Levy, S.B. 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *The Journal of Bacteriology*, **182**: 3467-74
67. **Perez-Reinado** E, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivian C, Roldan MD. 2005. Regulation and characterization of two nitroreductase genes, *nprA* and *nprB*, of *Rhodobacter capsulatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 7643-7649
68. **Gallegos**, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos, J.L. 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**: 393-410.
69. **Martin**, R.G., Rosner, J.L. 2001. The AraC transcriptional activators. *Current Opinion in Microbiology*, **4**: 132-137.