Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXIV, 2010, 121-133.** Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (http://bq.unam.mx/mensajebioquimico)
(*ISSN-0188-137X*)

BIOQUÍMICA DE LA SELENOCISTEÍNA, EL 21er AMINOÁCIDO, Y ROL DE LAS SELENOPROTEÍNAS EN LA SALUD HUMANA

Gustavo Salinas
Departamento de Biociencias de la Facultad de Química, Universidad de la República.
Instituto de Higiene, Avda. A. Navarro 3051, Piso 2, Montevideo, Uruguay
gsalin@fq.edu.uy

Resumen

El selenio es un elemento traza esencial para el ser humano. La importancia de este elemento se debe a las selenoproteínas, un conjunto discreto de proteínas, que poseen el inusual aminoácido selenocisteína; un análogo de la cisteína, que contiene selenio en lugar de azufre. La selenocisteína es incorporada a la síntesis ribosomal de proteínas mediante un mecanismo específico, montado sobre el aparato traduccional canónico, que permite la decodificación de codones UGA como selenocisteína. La selenocisteína es un aminoácido más reactivo que la cisteína, que, en las selenoproteínas de función conocida, está siempre involucrado en la catálisis redox. El selenoproteoma del ser humano consta de 25 proteínas. Si bien no se conoce la función de todas las selenoproteínas, en los últimos años se ha avanzado sustancialmente en dilucidar las funciones de muchas de ellas. Las selenoproteínas son importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox (debido a las selenoproteínas de los sistemas de la tiorredoxina y del glutatión), en el metabolismo de las hormonas tiroideas (debido a las tironina deyodinasas), en la maduración de los espermatozoides (debido principalmente a una de las glutatión peroxidasas), y en la función muscular (debido principalmente a la selenoproteína N), entre otros procesos fisiológicos. Finalmente, se reseñan los estudios realizados sobre la tiorredoxina glutatión reductasa de platelmintos parásitos. En los últimos años hemos contribuido a dilucidar los mecanismos catalíticos de las diferentes actividades que posee esta singular selenoproteína multifuncional que ejerce el control global de la homeostasis redox de los parásitos platelmintos.

Palabras clave: Selenocisteína, selenoproteínas, selenio, enzimas antioxidantes, tiorredoxina glutatión reductasa.

Abstract

Selenium is an essential trace element for humans. Its importance is due to selenoproteins, a discrete set of proteins possessing the rare amino acid selenocysteine, an analog of cysteine, which contains selenium instead of sulfur. Selenocysteine is incorporated into proteins by a specific mechanism, superimpose on the canonical translational apparatus, which allows UGA codons to be decoded as selenocysteine. Selenocysteine is more reactive than cysteine, and in selenoproteins of known function is always involved in redox catalysis. The human selenoproteome consists of 25 proteins. In recent years important advances have been made in elucidating the function of many selenoproteins, although specific functions have not been ascribed to all of them. Selenoproteins are important in maintaining redox homeostasis (due to selenoproteins of the thioredoxin and glutathione systems), metabolism of thyroid hormones (due to thyronine deiodinases), sperm cells maturation (mainly due to one of the glutathione peroxidases), and muscle function (mainly due to selenoprotein N), among other physiological processes. Finally, studies on thioredoxin glutathione reductase from flatworm parasites are summarized. In the last years, we have contributed to elucidate the catalytic mechanisms underlying the different activities of this unique multifunctional selenoprotein, which controls the overall flatworm parasites redox homeostasis.

Keywords: Selenocysteine, selenoproteins, selenium, antioxidant enzymes, thioredoxin glutathione reductase.

Un poco de historia del Selenio: de elemento tóxico a micronutriente

El elemento selenio (Se) fue descubierto en 1817 por J.J. Berzelius, investigando la causa de una enfermedad que padecían trabajadores de la industria de la producción de ácido sulfúrico a partir de piritas. Mucho antes, Marco Polo había reportado en sus crónicas de viajes lo que, retrospectivamente, habrían sido los efectos de la intoxicación de caballos por ingestión de altas dosis selenio acumulado en determinadas plantas nativas de una región de China: las pezuñas de los caballos se debilitaban y caían. Muchos siglos después, en Nebraska se describe un síndrome similar al reportado por Marco Polo, y posteriormente, se identificó al Se como el componente tóxico. Los esfuerzos iniciales de investigación fueron dirigidos a evitar la toxicidad por selenio. Rápidamente se reconoció la existencia de suelos ricos en Se y la existencia de ciertas plantas que acumulan este elemento (revisado en [1,2]). En 1957, la mala reputación del Se cambió en la comunidad científica y en el público en general, gracias a los trabajos de K. Schwarz: estudiando la levadura como fuente de proteínas, notó que el cambio de levadura de cerveza por la levadura de tórula (conocida también como levadura forrajera) en la alimentación de las ratas provocaba necrosis en el hígado, de lo que dedujo que uno o más componentes esenciales estaban presentes en una levadura y no en la otra. Entre estos componentes se identificó el denominado “factor 3”, que inequívocamente contenía selenio [3]. El selenio fue rápidamente reconocido como un elemento traza esencial en mamíferos, y su deficiencia como causa de algunas enfermedades [1,2]. La enfermedad del músculo blanco, una distrofia muscular que afectaba al ganado en crecimiento se asoció a suelos deficientes en Se y pudo prevenirse con la suplementación con Se. La deficiencia de Se fue posteriormente asociada a otras afecciones, como la infertilidad en machos. A mediados de la década de los 1970s, se demostró

que una cardiomiopatía humana, denominada enfermedad de Keshan, endémica en la provincia homónima de China, estaba asociada a la dieta deficiente de Se, debido a suelos muy pobres en selenio, siendo el virus de Coxsackievirus un cofactor de esta enfermedad: un ambiente deficiente en Se en el tejido del corazón parece seleccionar una variante cardiovirulenta de estos virus. Esta enfermedad, que tiene síntomas en común con la enfermedad del músculo blanco en animales, se trata y se previene con la suplementación con Se. La enfermedad de Kashin Beck, una artritis deformante es también asociada a dietas pobres en selenio en ciertas regiones de Asia; la deficiencia de yodo sería un cofactor de esta enfermedad. Recapitulando esta perspectiva histórica podemos decir que el margen entre niveles tóxicos de Se y niveles dietarios requeridos para prevenir deficiencias en Se es estrecho. La distribución desigual de Se en la corteza terrestre puede entonces acarrear problemas de salud tanto por exceso como por déficit del este elemento traza.

Las pistas iniciales relacionadas con la funciones específicas del Se provinieron del lado de la enzimología: los trabajos de J.T. Rotruck y col. [4] y de L. Flohe y col. [5] de 1973 determinaron que la glutatión peroxidasa de mamíferos, una enzima que reduce peróxido (ver más adelante), contenía selenio. Ese mismo año, el grupo de T. Stadtman demostraba que la glicina reductasa de ciertos microorganismos era una selenoproteína [6]. La naturaleza química del selenio en estas enzimas demoraría en dilucidarse y depararía numerosas sorpresas.

El 21er aminoácido: la selenocisteína

A diferencia de la mayoría de los elementos traza, que cumplen su función como cofactores enzimáticos, el Se en las selenoproteínas está presente bajo la forma de un aminoácido: la selenocisteína (Sec, en código de tres letras; U, en código de una letra); un análogo de la cisteína (Cys), que contiene Se en lugar de azufre (S) [7] (Figura 1). La selenocisteína tiene algunas diferencias con la cisteína, la más importante es su pKa: en tanto el pKa de Cys es 8.3, el de Sec es de 5.2, lo cual implica que a pH neutro el tiol de Cys está mayoritariamente en su forma neutra (protonada), en tanto el grupo selenol de Sec está cargado negativamente, como selenolato (ver Figura 1); además el átomo de Se tiene mayor polarizabilidad que el del S. Estas características confieren mayor nucleofilia al átomo de Se (con respecto al S) en un rango más amplio de pH, y por tanto una mayor reactividad. Las enzimas que contienen Sec en el sitio activo son, por norma, catalíticamente más eficientes que las homólogas que contienen Cys [8]. En cierta medida Sec puede considerarse una “súper cisteína” de reactividad extrema. De hecho, en las selenoproteínas de función conocida Sec está involucrada siempre en la función proteica, en reacciones redox [9,10]. Es interesante señalar en el paralelismo con Cys (el único otro aminoácido que participa en reacciones redox) que si bien Sec puede sustituir a Cys en catálisis redox, no sustituye a Cys en el plegamiento oxidativo, ni en la catálisis no redox (por ejemplo en las cisteín-proteasas).

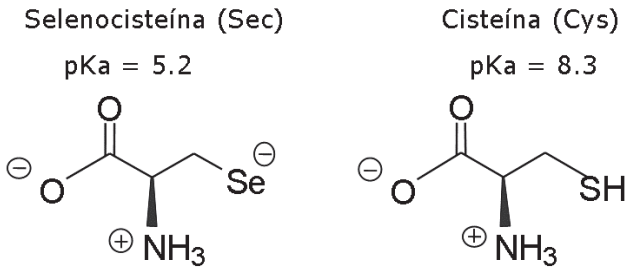

Figura 1. Fórmula de la selenocisteína (Sec) y de la cisteína (Cys). Debido a sus pKa a pH fisiológico la cadena lateral de la Sec está cargada negativamente, no así la de Cys. Dependiendo del contexto proteico el pKa del grupo selenol de Sec y del grupo tiol de Cys puede variar.

Al hallazgo de que el selenio estaba como Sec en ciertas enzimas siguieron otros más sorprendentes: Sec es incorporado a las cadenas polipeptídicas en crecimiento en el ribosoma, pero a diferencia de los 20 aminoácidos canónicos, Sec es codificada por un codón UGA (un codón que usualmente especifica la terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica) [11], reprogramado para codificar Sec por un elemento de incorporación de Sec (elemento SECIS, del inglés Sec Insertion Sequence) presente, exclusivamente en los ARNm de las selenoproteínas (Figura 2). El elemento SECIS es el que desambigua el significado del codón UGA, y se localiza "secuencia abajo" del codón UGA: 10 nucleótidos hacia el extremo 3´ del ARNm en bacterias, y en la región 3´ no traducida en archaeas y eucariotas [12]. Aunque varían en secuencia todos poseen una estructura de "tallo-bucle" conservada. Estos hallazgos permitieron ampliar el código genético que se suponía que contenía solamente 20 palabras (ver Recuadro 1), e incorporar el concepto de la "codificación a distancia". La dilucidación del mecanismo completo de incorporación de Sec fue liderada por el grupo de A. Böck en Alemania, en una serie de artículos clásicos que identificaron todos los genes que participan en la vía de incorporación de selenio en bacterias [13-16]. Además de la recodificacíon de un codón UGA por el elemento SECIS, otros aspectos novedosos surgieron de estas investigaciones del grupo alemán. A diferencia de los aminoacil-ARNt convencionales, que son reconocidos por un factor de elongación general, denominado EF-Tu, que media la incorporación de los aminoacil-ARNt al ribosoma, el selenocisteinil-ARNt^{Sec} es reconocido por un factor de elongación específico (denominado SelB o EF-Sec), el cual reconoce además de GTP y ARNt^{Sec}, al elemento SECIS del ARNm y media la incorporación del ARNt^{Sec} al riobosoma. En eucariotas el factor de elongación que une Sec-ARNt^{Sec} no interacciona directamente con el elemento SECIS, sino a través de la proteína de unión a SECIS, denominada SBP2 [17]; además, otras proteínas, como la proteína ribosomal L30, participan en el proceso de descodificación [18]. La Figura 2 resume el mecanismo de incorporación de Sec en bacterias y en eucariotas.

Otro aspecto novedoso de la síntesis de Sec es que ocurre exclusivamente sobre su ARNt (no existe la síntesis del aminoácido libre). El ARNt^{Sec} es previamente aminoacilado con serina, por una seril-ARNt sitetasa convencional (la misma enzima que cataliza la formación de seril-ARNt^{Ser}) dando lugar a seril-ARNt^{Sec}, el cual es luego modificado por la selenocisteína sintetasa a selenocisteinil-ARNt^{Sec} [19]. En eucariotas (y en archaeas), dos enzimas diferentes, en lugar de una, catalizan el pasaje de Ser-ARNt^{Sec} a Sec-ARNt^{Sec} [20], tal como se muestra en la Figura 3 . En todos los casos el átomo de Se proviene del selenofosfato, el cual es sintetizado por la selenofosfato sintetasa (conocida como selD en bacterias o SPS2 en eucariotas) a partir de selenuro y ATP.

Sintéticamente podemos decir que la incorporación de Sec a la síntesis proteica requiere de algunos "ajustes" del aparato traduccional convencional. La similitud global del mecanismo de síntesis e incorporación de Sec en los tres dominios de lo viviente sugiere que la incorporación de la palabra Sec al código genético apareció una sola vez en la evolución, previo a la separación de los dominios. La existencia de linajes que no incorporan Sec indica que éstos perdieron esta capacidad ancestral, e indica que existen diferentes presiones selectivas que determinan el mantenimiento o la pérdida de la incorporación de Sec en lo viviente [21].

La secuenciación de genomas completos, junto al desarrollo de herramientas bioinformáticas para detectar selenoproteínas permitió determinar selenoproteomas completos, y descubrir nuevas familias de selenoproteínas. Estas estrategias informáticas se basaron en i) detectar la presencia de elemento SECIS "secuencia abajo" de un codón UGA en marco, y ii) analizando las secuencias posteriores a UGA; a esta última estrategia ayudó enormemente la observación de que la mayoría de los genes de selenoproteínas poseen homólogos en los cuales Sec es reemplazado por Cys [9]. Estos estudios revelaron que los organismos que incorporan Sec lo hacen en un número muy reducido de proteínas, y mostraron que los selenoproteomas de diferentes taxa varían tanto en el número como en el tipo de familias de selenoproteínas encontradas. A manera de ejemplo sólo una selenoproteína existe en el gusano *Caenorhabditis elegans* y 25 en el ser humano [22]. Desde un punto de vista evolutivo ha habido

evolución linaje específica de Cys a Sec (que requiere además de una sustitución la aparición de un elemento SECIS), pero también de Sec a Cys [23]. Las presiones selectivas subyacentes a la preferencia de Sec o Cys en determinados taxa y en determinadas familias de proteínas no son totalmente claras; en este contexto es importante mencionar que si bien Sec aumenta la eficiencia de la catálisis redox, puede cambiar otras propiedades de las enzimas acarreando desventajas.

Finalmente, es importante reseñar que, además de la presencia de Se bajo forma de Sec, existen otras formas minoritarias de Se en lo viviente (ver Reacuadro 2).

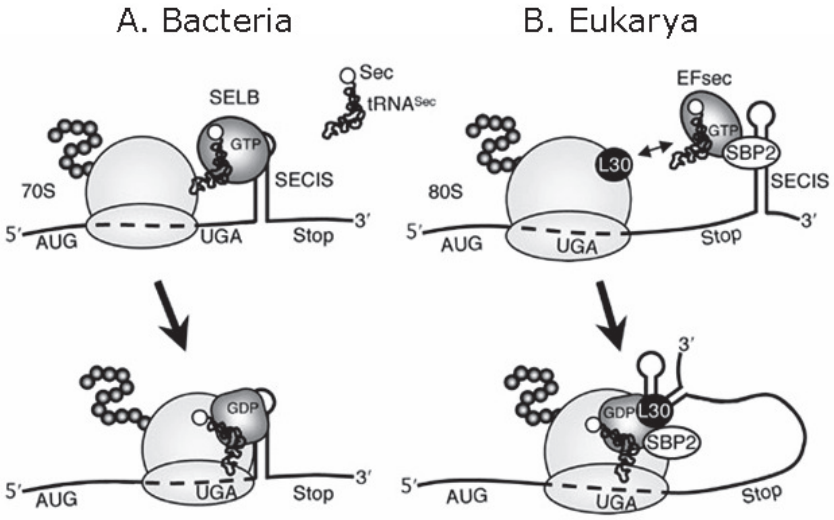

Figura 2. Incorporación de selenocisteína a la síntesis proteica. En bacterias SELB, el factor de elongación específico para Sec, une el elemento SECIS, GTP y ARNt^{Sec} formando un complejo cuaternario, la unión provoca de SELB al elemento SECIS un cambio conformacional que media la transferencia del ARNt^{Sec} al sitio A del ribosoma, ocupado por un codón UGA. En eucariotas el elemento SECIS une a la proteína de unión a SECIS (SBP2), que recluta al factor de elongación de Sec (EFSec) y al ARNt^{Sec}; luego de la asociación con el ribosoma, SBP2 es desplazada del elemento SECIS por la proteína ribosomal L30. El cambio conformacional del elemento SECIS promueve la hidrólisis de GTP y la liberación del ARNt^{Sec} al sitio A del ribosoma. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature Structural & Molecular Biology], [17], copyright (2005).

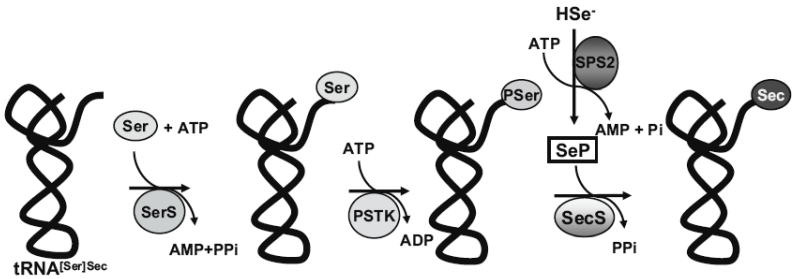

Figura 3. Biosíntesis de selenocisteína en eucariotas. El ARNt^{Sec} es aminoacilado por la seril-ARNt sintetasa (SerS), el residuo de serina es fosforilado por la O-fosfoseril-ARNt^{Sec} quinasa (PSTK) para dar lugar a O-fosfoseril-ARNt^{Sec}, que es convertido en selenocisteinil-ARNt^{Sec} por la selenocisteína sintetasa (SecS). SecS tiene también como sustrato al selenofosfato (SeP), cuya síntesis es catalizada por la selenofosfato sintetasa (SPS2) a partir de selenuro y ATP. Figura reproducida de [19].

Selenoproteínas humanas: su importancia en procesos fisiológicos y algunas generalizaciones sobre los mecanismos catalíticos de las selenoenzimas

Varias de las selenoproteínas presentes en humanos (y en mamíferos) son enzimas antioxidantes extremadamente eficientes, que forman parte de los sistemas de la tiorredoxina y del glutatión [22]. Estos sistemas mantienen la homeostasis redox de las células a expensas del poder reductor del NADPH, y participan en una variedad de procesos celulares [24]. Un esquema de cómo funcionan estos sistemas se presenta en la Figura 4a. En el sistema tiorredoxina, la selenoenzima tiorredoxina reductasa, una piridín-nucleótido tiol-disulfuro óxido-reductasa, oxida al NADPH y reduce a la forma oxidada de la tiorredoxina. La tiorredoxina reducida posee una multiplicidad de funciones, entre ellas provee electrones para enzimas esenciales (por ejemplo a la ribonucleótido reductasa), y enzimas antioxidantes, ejerce control redox de factores de transcripción y participa en el plegamiento de proteínas. Los mamíferos poseen tres formas de tiorredoxina reductasas, (citosólica, mitocondrial y específica de testículo), y las tres contienen un residuo de Sec redox activo, como parte del tetrapéptido GCUG (U denota Sec) carboxi-terminal. Así, en mamíferos todos los procesos dependientes del sistema tiorredoxina son selenio-dependientes. Los organismos *knock out* tanto en la tiorredoxina reductasa citosólica como en la tiorredoxina reductasa mitocondrial no son viables; la eliminación de estos genes da lugar a letalidad embrionaria. Uno de los blancos de la tiorredoxina es la enzima antioxidante metionina sulfóxido reductasa, que cataliza la reducción de metionina oxidada (libre y en proteínas) a metionina. Una de las formas de la metionina sulfóxido reductasa, que reduce específicamente el estereoisómero R, contiene Sec en su sitio activo. Otra enzima antioxidante, la glutatión peroxidasa (GPx), en tanto, es uno de los blancos del sistema glutatión. En humanos existen 8 GPx, de las cuales 5 contienen Sec en su sitio activo. De estas últimas, la GPx1 o citosólica fue la primer selenoproteína animal conocida. Es una enzima antioxidante extremadamente eficiente que cataliza la reducción de hidroperóxidos dependiente de glutatión (revisado en [2]). La GPx4, también conocida como fosfolípido hidroperóxido GPx, es la única GPx esencial en la embriogénesis en mamíferos; además de su función antioxidante de reducción de hidroperóxidos lipídicos, cumple un rol estructural esencial en la maduración de los espermatozoides [25]. Las funciones de las otras tres GPx que son selenoproteínas (GPx2 o gastrointestinal, GPx3 o plasmática y GPx6) no están totalmente dilucidadas, aunque se sabe que son importantes en situaciones de estrés oxidativo; en tanto las GPx que no contienen Sec no han sido estudiadas. La selenoproteína W es una selenoproteína antioxidante dependiente de glutatión, pero la función precisa que cumple esta selenoproteína se desconoce. Posee el motivo redox CXXU en un dominio tiorredoxina y se expresa predominantemente en músculo esquelético y corazón, en particular durante el desarrollo.

Recuadro 1: El código genético no es universal

Bastante antes de que el código genético fuera dilucidado, entre los investigadores que estudiaban el "problema del código" había ya consenso en que el número de aminoácidos incorporados durante la síntesis ribosomal de proteínas era 20. Más tarde, la dilucidación del código genético, que estableció una correspondencia entre codones o tripletes de nucleótidos y los 20 aminoácidos, fue recibida con beneplácito por la comunidad científica. La proclamación de que el código era "universal", es decir el mismo desde *Escherichia coli* hasta el ser humano constituía una constatación de la unidad histórica de lo viviente. Pero la naturaleza siempre sorprende: hoy sabemos que, en realidad, existen al menos 20 códigos diferentes, incluyendo nuestro propio código genético mitocondrial, que difiere de nuestro código nuclear. Luego del descubrimiento de la selenocisteína como aminoácido, se sumaría al diccionario de traducción la palabra 22: la pirrolisina [35], un aminoácido filogenéticamente restringido a unas pocas especies procariotas, codificado por un codón UAG. La variante más reciente del código genético fue descubierta en el organismo ciliado *Euplotes crassus*, en el cual UGA especifica la inserción de Cys y Sec, demostrando que el código genético puede utilizar un codón para codificar más de un aminoácido [36].También a nivel del código se manifiesta la unidad y diversidad de lo viviente: todos los códigos que hoy conocemos son variantes sutiles de un código ancestral.

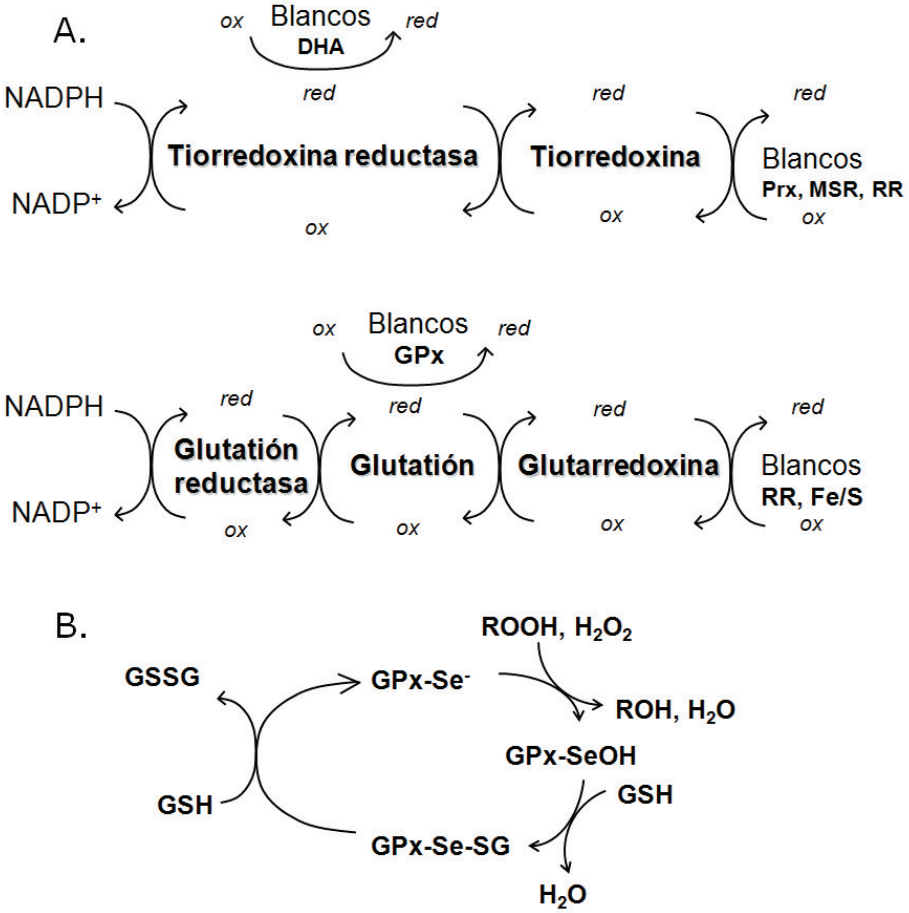

Figura 4. A. Flujo de electrones en los sistemas tiorredoxina y glutatión. En ambos sistemas, el NADPH es el dador inicial de equivalentes de reducción. En el sistema tiorredoxina (panel superior) los electrones son cedidos a la tiorredoxina reductasa, de ésta a la tiorredoxina. La tiorredoxina tiene numerosos blancos, entre ellos la peroxirredoxina (Prx, que reduce peróxido de hidrógeno), la metionina sulfóxido reductasa (MSR, que reduce metionina oxidada), la ribonucleótido reductasa (RR, que reduce ribonucleótidos), y es una proteína disulfuro reductasa general; la tiorredoxina reductasa también puede reducir blancos de bajo peso molecular, entre ellos el dehidroascorbato (DHA) y el ácido lipoico. En el sistema glutatión (panel inferior), los electrones del NADPH son cedidos a la glutatión reductasa, de ésta al glutatión, de éste a la glutarredoxina y de la glutarredoxina a diferentes blancos, entre ellos la RR. La glutarredoxina participa además en la biogénesis de centros Fe/S; en glutatión, en tanto, puede ceder electrones a otros blancos como la glutatión peroxidasa (GPx, que reduce peróxido de hidrógeno a agua e hidroperóxidos a alcoholes), funciona como un antioxidante general y además participa en reacciones de detoxifiación mediadas por glutatión S-transferasas. Todas las reacciones esquematizadas involucran intercambios tiol(selenol)-disulfuro(selenil-sulfuro) reversibles. **B.** Esquema del mecanismo catalítico de las glutatión peroxidasas. La forma reducida de la GPx (esquematizada como GPx-Se^-, en la que el selenol está como selenolato) reacciona con peróxido de hidrógeno o con hidroperóxidos orgánicos (ROOH), dando lugar a agua y alcoholes orgánicos (ROH), dando lugar a la forma oxidada por dos electrones de la GPx. La GPx oxidada es luego reducida en dos reacciones que involucran transferencia de un electrón, regenerando la forma reducida de la enzima. Como resultado neto de la reducción de peróxidos dos moléculas de glutatión reducido (GSH) dan lugar a glutatión oxidado (GSSG).

De forma análoga a lo que ocurre con las Cys redox activas durante el ciclo catalítico, donde su estado de redox cambia reversiblemente de tiol(ato) (estado de oxidación -2) a disulfuro (-1) o a sulfénico (0); en las tiorredoxina reductasas, las glutatión peroxidasas y la metionina sulfóxido reductasa, los mecanismos catalíticos involucran al grupo selenol(ato) (estado de oxidación -2) de Sec que cambia reversiblemente a selenil-sulfuro (análogo al disulfuro, estado de oxidación -1) o selenénico (análogo al sulfénico, estado de oxidación 0). Un esquema de los intermediarios formados durante el ciclo catalítico de la glutatión peroxidasa se muestra en la Figura 4B. También es importante señalar que en las selenoproteínas con centros redox conteniendo Sec y Cys (por ejemplo motivos "redoxinas" como CXXU, UXXC y CU), como parte del ciclo catalítico, Sec ocupa siempre la posición homóloga a la Cys redox activa "atacante" o "nucleofílica"; no se ha encontrado Sec en la posición "resolutiva" del mecanismo.

Las yodotironinas deyodinasas constituyen otra familia de selenoproteínas; en humanos existen 3 deyodinasas, todas selenoenzimas. La tiroxina (conocida como T4 o tetrayodo tironina) es una pro-hormona de larga vida, que debe ser activada por deyodinación a T3 (triyodo tironina), una hormona de vida media corta, que modula la expresión de genes en muchos tejidos, a través de la unión a factores de transcripción que promueven el metabolismo. En todos los vertebrados existen enzimas que activan T4 (a T3) y que inactivan T4 y T3. La deyodinación de T4 a T3 ocurre en el anillo fenólico exterior de T4 y es catalizada por las deyodinasas 1 y 2 (Figura 5). Como contrapunto de la vía de activación, la activación de T4 puede ser prevenida por deyodinación del anillo aromático interno, dando lugar a una forma inactiva de la hormona (rT3), y T3 puede ser irreversiblemente inactivada también por deyodinación del anillo interno; estas reacciones son catalizadas por la deyodinasa 3 (y en menor medida por la deyodinasa 1) [26]; además las deyodinasas 1 y 2 pueden también actuar sobre rT3, sin consecuencias en la función hormonal (Figura 5). A su vez, la expresión y la actividad de las tres deyodinasas están sujetas a regulación. Estos mecanismos complejos (y no completamente entendidos) aseguran la homeostasis de la función tiroidea, en particular ante cambios ambientales como la ingesta variable de yodo. La deyodinasa 1 es particularmente importante para suministrar T3 al plasma y regular la cantidad de T4 en plasma, en tanto la deyodinasa 2 es requerida para mantener niveles importantes de T3 en el cerebro. Los ratones *knock out* en cualquiera de las yodotironina deyodinasas son viables, pero dan diferentes tipos de transtornos: los *knock out* en las deyodinasas 1 y 2 dan problemas importantes de crecimiento y auditivos, entre otros; en tanto *knock out* en la deyodinasa 3 provocan toxicidad en la tiroides e hipotiroidismo. En línea con la importancia de estas selenoproteínas en el metabolismo de las hormonas tiroideas, se ha identificado que defectos genéticos en la proteína de unión a SECIS son causa de metabolismo anormal de las hormonas tiroideas.

En términos mecanísticos, las reacciones catalizadas por las deyodinasas son deshalogenaciones reductivas y el mecanismo que se propone involucra un intermediario Se-I oxidado; el sitio activo de las deyodinasas contiene el motivo FGSXTU dentro de un dominio con plegamiento Trx.

Otra selenoproteína de función conocida es la selenofosfato sintetasa (SPS2), que cataliza la síntesis de selenofosfato (un precursor de la síntesis de Sec) a partir de ATP y selenuro. La selenoproteína P, la única que codifica para múltiples residuos de Sec; posee 10 codones UGA en marco, aunque incorpora un número menor de residuos de Sec por cadena polipeptídica, ya que la incorporación de Sec no es un proceso 100% eficiente. La selenoproteína P es la más abundante en plasma y se supone que es importante en el transporte y la movilización de Se [27]. Los ratones *knock out* en la selenoproteína P muestran deficiencia de Se en muchos órganos; en particular en los testículos y en el cerebro y sufren de desórdenes neurológicos e infertilidad en los machos. Los espermatozoides carecen de vaina en la parte distal de la pieza media. La dieta con elevado Se restablece algunos de los síntomas de los desórdenes neurológicos. La selenoproteína N está implicada en la función muscular, pero su función precisa no es conocida. Existe un vínculo claro entre ciertas miopatías y la selenoproteína N; las mutaciones en la selenoproteína N llevan a distrofia muscular de espina

rígida y al fenotipo clásico de la miopatía con multiminicore. Finalmente, existen otras selenoproteínas de función desconocida, entre ellas, SelH, SelI, SelM, SelT, SelV y Sel15 o Sep15, todas ellas con presuntos motivos redox conteniendo Sec (CXXU o variantes de éste) dentro de un dominio Trx. En tanto SelK, SelO y SelS, también de función desconocida, son selenoproteínas con un residuo de Sec carboxi-terminal.

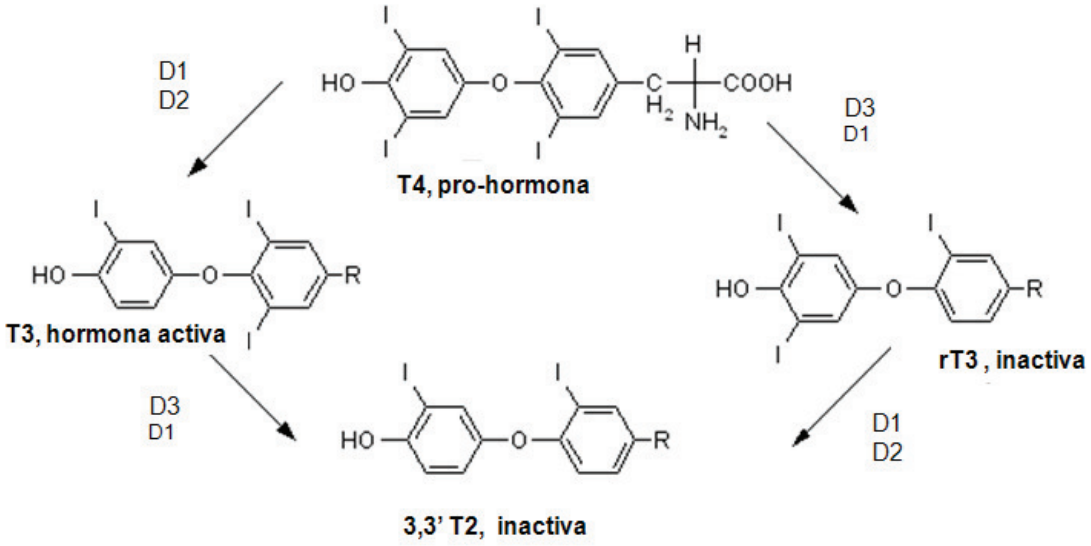

Figura 5. Mecanismos de activación e inactivación de las yodotironinas por las yodotironinas deyodinasas D1, D2 y D3. D1 y D2 son enzimas que participan, esencialmente, en la activación de T4 a T3, en tanto D3 participa en la inactivación de T3.

Si bien no se conoce la función de todas las selenoproteínas, en los últimos años se ha avanzado enormemente en dilucidar las funciones de muchas de ellas, y en los procesos fisiológicos en los que intervienen. A manera de resumen, podemos decir que hoy sabemos que las selenoproteínas son importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox, el metabolismo hormonal tiroideo, la maduración de los espermatozoides, y la función muscular. Finalmente, de acuerdo a estudios recientes las selenoproteínas tienen también un papel importante en la inmunocompetencia de los vertebrados.

Una selenoproteína multifuncional en detalle: la tiorredoxina glutatión reductasa de platelmintos

Desde hace algunos años comenzamos a estudiar las defensas antioxidantes de un organismo parásito, el platelminto *Echinococcus granulosus*, causante de la hidatidosis. Los organismos parásitos que causan infecciones crónicas son excelentes modelos para el estudio de defensas antioxidantes, ya que están sometidos al estrés oxidativo del sistema inmune del hospedero. Algunas investigaciones tempranas, en particular la ausencia de catalasa (una enzima que dismuta peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno), nos dieron pistas de que las defensas antioxidantes en este organismo dependían de los sistemas tiorredoxina y glutatión. De manera sucinta podemos reseñar que nuestro trabajo y el de otros grupos de investigación que trabajan en bioquímica de platelmintos permitieron demostrar la existencia de un escenario bioquímico muy particular en platelmintos parásitos en relación a estas vías metabólicas [28-31]. A diferencia de sus hospederos vertebrados estos parásitos carecen de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa convencionales y por tanto no poseen sistemas tiorredoxina y glutatión

canónicos; en cambio poseen la selenoenzima tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), que define un sistema tiorredoxina-glutatión "ligado" que provee de electrones a ambas rutas. La secuenciación de los genomas de los platelmintos parásitos confirmó la ausencia de los genes de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa, y la existencia de un gen que codifica para TGR. La TGR posee varios centros redox y, a nivel de estructura primaria, proviene de la fusión de un dominio glutarredoxina a los dominios de una tiorredoxina reductasa, tal como se esquematiza en la Figura 6a. Para disecar como funciona esta enzima multifuncional, generamos un conjunto de proteínas recombinantes, incluyendo mutantes en los diferentes sitios redox activos; para las construcciones de selenoproteínas incluimos un elemento SECIS bacteriano que permitiera la decodificación del codón UGA^{Sec} en bacterias. En base a estos recombinantes determinamos que el residuo de Sec es esencial para las funciones tiorredoxina y glutatión reductasas, en tanto el dominio glutarredoxina es esencial para la actividad glutatión reductasa, pero no para la actividad tiorredoxina reductasa; la Figura 6b resume el flujo de electrones en la TGR para las diferentes actividades. Estos resultados indican que la homeostasis redox es dependiente de Sec, y sugieren la existencia de una bisagra flexible entre el dominio glutarredoxina y los dominios tiorredoxina reductasa, lo cual concuerda con la estructura tridimensional la TGR de *Schistosoma mansoni*, recientemente publicada [32]. Una peculiaridad de la actividad glutatión reductasa de la enzima es que exhibe un comportamiento histerético (un retraso en alcanzar la velocidad máxima) a alta concentración de glutatión oxidado [30]. Este comportamiento histerético de la enzima lo hemos asociado a la glutationilación de la enzima por glutatión oxidado, y la salida de la histéresis a la deglutationilación por glutatión reducido [33]. Recientemente hemos encontrado que la enzima posee actividad deglutationilante (de remoción de glutatión) frente a disulfuros mixtos péptidos-glutatión; como la actividad glutatión reductasa, la actividad deglutationilante es también dependiente de Sec y del dominio glutarredoxina, y es inhibida por cocientes altos de concentraciones de glutatión oxidado/glutatión reducido. Las actividades glutatión reductasa y deglutationilante de la TGR ocurren, a nivel del dominio glutarredoxina, a través de un mecanismo monotiólico.

Otros resultados que hemos obtenidos indican la existencia de variantes mitocondrial y citosólica de TGR en los platelmintos parásitos, producto del inicio alternativo de la transcripción del gen de la TGR. Esto sumado a la existencia de tiorredoxinas mitocondrial y citosólica (provenientes estas de diferentes genes), que aceptan electrones de la TGR indica la existencia de sistemas ligados tiorredoxina-glutatión, dependientes de Sec, en ambos compartimientos subcelulares [28,33].

Recuadro 2: Otras formas de selenio en la naturaleza

En los organismos vivos, además de estar presente como Sec, la forma más importante y más distribuida de selenio en las proteínas, el selenio ocurre en las proteínas bajo otras formas. En ciertas bacterias el selenio está presente en algunas molibdoproteínas (proteínas que contienen molibdeno), como la xantina deshidrogenasa y la ácido nicotínico hidroxilasa. Estas enzimas contienen selenio bajo la forma de un cofactor lábil, que contiene Se-Mo y está directamente involucrado en catálisis. Ni la naturaleza química exacta del Se en este cofactor ni su síntesis son conocidas. Por otra parte, el Se puede encontrarse en las proteínas bajo la forma de L-selenometionina; este aminoácido análogo a la metionina es incorporado a la síntesis proteica en lugar de metionina, con baja frecuencia y al azar (esto se debe a que las enzimas involucradas en la síntesis e incorporación de Met no discriminan entre el átomo de S y el de Se). Otra forma bajo la que se presenta el Se en la naturaleza es la 2-selenouridina, una base modificada análoga a la tiouridina, identificada, exclusivamente, en la posición de balanceo (wobble) de los anticodones de los $ARNt^{Lys}$, $ARNt^{Glu}$ y $ARNt^{Gln}$ de algunas bacterias; se piensa que esta modificación incrementa la fidelidad de la traducción de los codones terminados en purina. Finalmente, algunas plantas seleníferas acumulan diferentes compuestos de bajo peso molecular de Se como defensas químicas para evitar ser devoradas.

Las vías del glutatión y de la tiorredoxina en conjunto son esenciales en una variedad de procesos fisiológicos. Como la TGR de platelmintos parásitos es la única enzima que provee electrones a ambas vías, su inhibición afectará la síntesis de ADN, la homeostasis redox global y otros procesos esenciales en estos organismos. Este escenario bioquímico único que contrasta con el de los hospederos de los parásitos ha llevado a estudiar a la TGR como blanco de drogas para estas parasitosis. De hecho, en estudios recientes se ha validado a la TGR como blanco de drogas para platelmintos [34], y se han identificado estructuras de amidas fosfínicas, oxadiazoles. Actualmente, algunos de nuestros estudios están centrados en la búsqueda de inhibidores de quimiotecas discretas de moléculas electrofílicas, explotando la reactividad del selenolato de Sec, un nucleófilo extremadamente reactivo.

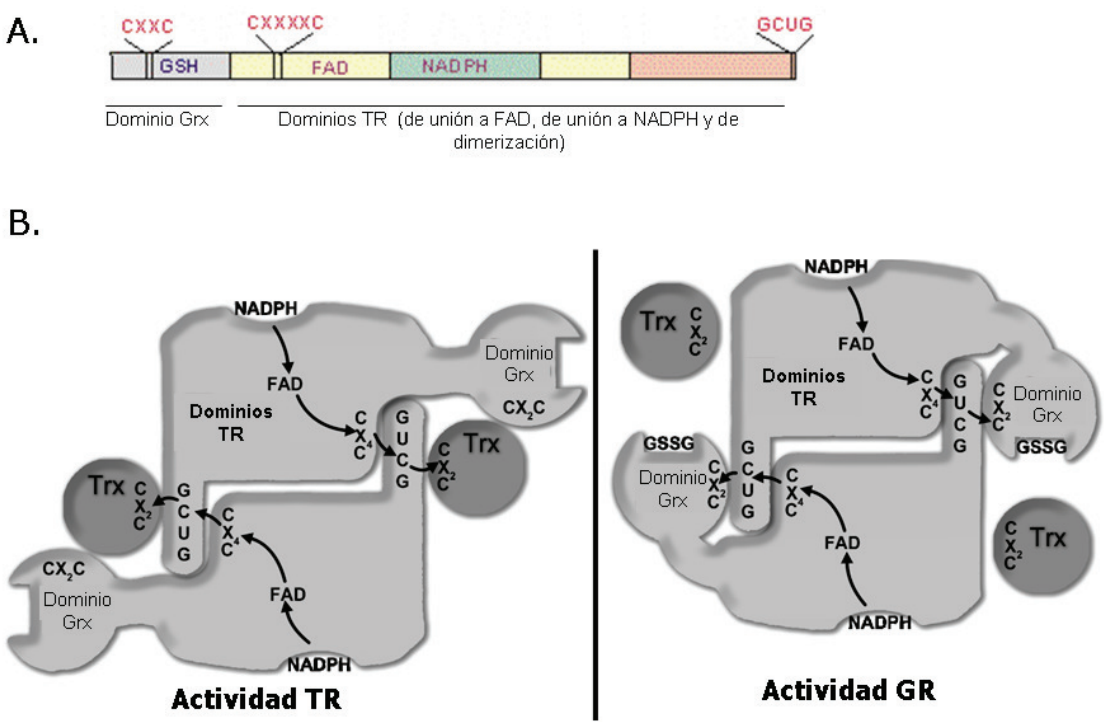

Figura 6. A. Estructura primaria de la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR). En gris se indica el dominio glutarredoxina N-terminal, en amarillo el dominio discontinuo de unión a FAD, en verde el dominio de unión a NADPH y en rosado el dominio de dimerización. Se indican los centros redox, así como el grupo prostético FAD, y los ligandos glutatión (GSH) y NADPH. **B.** Modelo de la secuencia del flujo de electrones a través del sistema ligado glutatión-tiorredoxina para la actividad tiorredoxina reductasa (TR, a la izquierda) y para la actividad glutatión reductasa (GR, a la derecha), de acuerdo a los resultados obtenidos con la TGR y un conjunto de mutantes de la TGR (en el centro redox amino-terminal, CX_2C, en centro redox carboxi-terminal (GCUG) y un mutante sin dominio glutarredoxina, Grx). Como se muestra, el dominio Grx de la TGR sería el responsable de la reducción del GSSG (actividad GR). Esto implica un paso en dirección contraria al que ocurre en el sistema del GSH, el cual es posible debido a la proximidad de los potenciales redox estándar del GSH y de la Grx. Para ambas actividades se requiere el centro redox que contiene selenocisteína.

Referencias

1. Oldfield, J. E. (2006) *Selenium: Its molecular biology and role in human health.* Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., and Berry, M. J (eds), 2nd Ed., Springer
2. Flohe, L. (2009) *Biochim Biophys Acta* **1790**(11), 1389-1403
3. Schwarz, K., and Foltz, C. M. (1957) *J Am Chem Soc* **79**, 3292-3293
4. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973) *Science* **179**(73), 588-590
5. Flohe, L., Gunzler, W. A., and Schock, H. H. (1973) *FEBS Lett* **32**(1), 132-134
6. Turner, D. C., and Stadtman, T. C. (1973) *Arch Biochem Biophys* **154**(1), 366-381
7. Cone, J. E., Del Rio, R. M., Davis, J. N., and Stadtman, T. C. (1976) *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(8), 2659-2663
8. Stadtman, T. C. (1996) *Annu Rev Biochem* **65**, 83-100
9. Gladyshev, V. N. (2006) *Selenium: Its molecular biology and role in human health.* Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., and Berry, M. J (eds), 2nd Ed., Springer
10. Lu, J., and Holmgren, A. (2009) *J Biol Chem* **284**(2), 723-727
11. Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986) *Embo J* **5**(6), 1221-1227
12. Zinoni, F., Heider, J., and Bock, A. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12), 4660-4664
13. Bock, A., and Stadtman, T. C. (1988) *Biofactors* **1**(3), 245-250
14. Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M. A., and Bock, A. (1988) *J Bacteriol* **170**(2), 540-546
15. Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A., and Bock, A. (1988) *Nature* **331**(6158), 723-725
16. Forchhammer, K., Leinfelder, W., and Bock, A. (1989) *Nature* **342**(6248), 453-456
17. Caban, K., and Copeland, P. R. (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**(1), 73-81
18. Chavatte, L., Brown, B. A., and Driscoll, D. M. (2005) *Nat Struct Mol Biol* **12**(5), 408-416
19. Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E., and Bock, A. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2), 543-547
20. Xu, X. M., Carlson, B. A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R. S., Berry, M. J., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2007) *PLoS Biol* **5**(1), e4
21. Romero, H., Zhang, Y., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2005) *Genome Biol* **6**(8), R66
22. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V. N. (2003) *Science* **300**(5624), 1439-1443
23. Zhang, Y., Romero, H., Salinas, G., and Gladyshev, V. N. (2006) *Genome Biol* **7**(10), R94
24. Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., and Tacnet, F. (2007) *FEBS Lett* **581**(19), 3598-3607
25. Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. (1999) *Science* **285**(5432), 1393-1396
26. Bianco, A. C., and Larse, P. R. (2006) *Selenium: Its molecular biology and role in human health.* Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., and Berry, M. J (eds), 2nd Ed., Springer
27. Hoffmann, P. R., Hoge, S. C., Li, P. A., Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., and Berry, M. J. (2007) *Nucleic Acids Res* **35**(12), 3963-3973
28. Agorio, A., Chalar, C., Cardozo, S., and Salinas, G. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* **278**(15), 12920-12928
29. Alger, H. M., and Williams, D. L. (2002) *Mol Biochem Parasitol* **121**(1), 129-139
30. Rendón, J. L., del Arenal, I. P., Guevara-Flores, A., Uribe, A., Plancarte, A., and Mendoza-Hernández, G. (2004) *Molecular and Biochemical Parasitology* (133), 61-69
31. Salinas, G., Selkirk, M. E., Chalar, C., Maizels, R. M., and Fernández, C. (2004) *Trends in Parasitology* **20**(7), 340-346
32. Angelucci, F., Miele, A. E., Boumis, G., Dimastrogiovanni, D., Brunori, M., and Bellelli, A. (2008) *Proteins* **72**(3), 936-945
33. Bonilla, M., Denicola, A., Novoselov, S. V., Turanov, A. A., Protasio, A., Izmendi, D., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2008) *J Biol Chem* **283**(26), 17898-17907

34. Kuntz, A. N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A. A., Califf, L. L., Dessolin, J., Arner, E. S., and Williams, D. L. (2007) *PLoS Med* **4**(6), e206
35. Hao, B., Gong, W., Ferguson, T. K., James, C. M., Krzycki, J. A., and Chan, M. K. (2002) *Science* **296**(5572), 1462-1466
36. Turanov, A. A., Lobanov, A. V., Fomenko, D. E., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Klobutcher, L. A., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2009) *Science* **323**(5911), 259-261

Semblanza del Dr. Gustavo Salinas

El Dr. Gustavo Salinas es Químico Farmacéutico egresado de la Universidad de la República, Uruguay. Realizó sus estudios doctorales y post-doctorales en el Departamento de Patología de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, en Biología Molecular de Parásitos. Desde su regreso a Uruguay, en 1996, sus investigaciones han girado, fundamentalmente, en torno a la caracterización de las defensas antioxidantes de platelmintos parásitos. Su trabajo ha contribuido a demostrar la existencia, en estos organismos, de un escenario bioquímico diferente al de los hospederos, con ausencia de sistemas tiorredoxina y glutatión independientes, y presencia de vías ligadas por la selenoenzima tiorredoxina glutatión reductasa. Sus investigaciones han caracterizado a nivel cinético y molecular esta enzima que juega un papel esencial en el control de la homoestasis redox global en estos organismos y constituye un blanco promisorio para el control de las infecciones por platelmintos. Sus investigaciones también han contribuido al estudio de la evolución de la incorporación del aminoácido selenocisteína en la síntesis proteica, demostrando que el código genético puede ser expandido por transferencia horizontal de los genes que participan en la incorporación de este aminoácido. Es investigador de nivel II del Sistema Nacional de Investigadores de Uruguay, y del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas. Ha dirigido y dirige tesis de grado y posgrado y ha publicado en prestigiosas revistas internacionales tales como The Journal of Biological Chemistry, Genome Biology and Nucleic Acids Research. Es Profesor Agregado en régimen de dedicación Total de la Universidad de la República. En el plano docente, imparte clases y es corresponsable de los cursos de grado de Introducción a las Ciencias Biológicas de la Facultad de Química y de postgrado de Bioquímica Redox de Tioles.