

# Estudio de la importancia de los mecanismos Redox en patógenos intracelulares

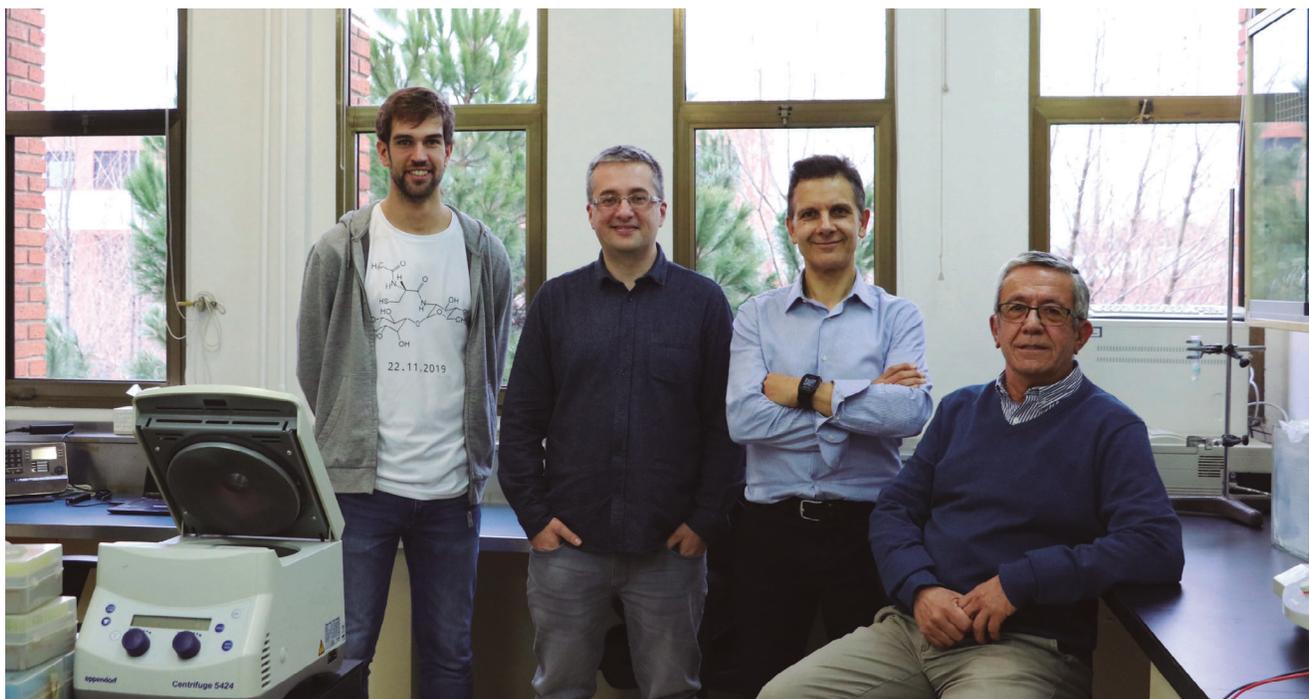
Álvaro Mourenza<sup>1</sup>, Jose A. Gil<sup>1,2</sup>, Luis M. Mateos<sup>1,2</sup>, Michal Letek<sup>1,3</sup>



<sup>1</sup> Departamento de Biología Molecular, Área de Microbiología, Universidad de León, 24071 León, España.

<sup>2</sup> Instituto de Biología Molecular, Genómica y Proteómica (INBIOMIC), Universidad de León, 24071 León, España.

<sup>3</sup> Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Universidad de León, 24071 León, España.



Miembros del grupo de izquierda a derecha: Dr. Álvaro Mourenza, Dr. Michal Letek, Prof. Luis Mariano Mateos y Prof. José Antonio Gil.

En el estado de oxidación-reducción de las células se pueden producir desequilibrios que generan lo que se conoce como estrés oxidativo. Ante este desequilibrio sobrenido, las células emplean sus mecanismos de control Redox para reestablecer el estado reducido inicial.

El grupo de investigación del área de microbiología de la Universidad de León liderado por el Prof. Luis M. Mateos, tiene una larga experiencia en el estudio de ciertos sistemas Redox presentes en actinobacterias. Su trabajo de investigación ha permitido descubrir las microrredoxinas (Mrx), proteínas esenciales en el control Redox intracelular de estas bacterias y cuyo mecanismo de acción

está ligado a la molécula antioxidante micotiol (MSH). El sistema MSH/Mrx sirve para preservar el estado reducido intracelular, esencial para el correcto funcionamiento de la mayoría de los sistemas proteicos en actinobacterias.

Además del sistema anteriormente indicado, el grupo del Prof. Mateos ha centrado sus estudios en otras proteínas esenciales para el control del estado Redox. Entre ellas destaca el trabajo realizado en colaboración con el grupo del Dr. Messens de la “Vrije Universiteit Brussel” en Bélgica. De esta forma se demostró el papel esencial que juega la proteína OxyR en la respuesta rápida de la bacteria frente al estrés oxidativo, usando como regu-

lador la proteína catalasa (KatA) que se activa en presencia de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Pedre *et al.*, 2019).

Recientemente, el Prof. Mateos comenzó a plantearse si estos sistemas basados en MSH/Mrx podrían también ser un sistema de supervivencia en patógenos intracelulares durante los procesos infecciosos. Las bacterias del filo *Actinobacteria* que se comportan como patógenos intracelulares (*Mycobacterium tuberculosis* o *Rhodococcus equi* entre otros) presentan importantes sistemas de control Redox, para lo cual cuentan con hasta tres posibles microrredoxinas en su genoma, entre otros componentes. Además, representantes de este grupo también utilizan el siste-

ma Redox tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TrxR), cuya presencia es ubicua en prácticamente todos los organismos estudiados. Finalmente, estas bacterias presentan un nuevo sistema de tiorredoxinas extracelulares (Etrx) que parecen estar ancladas a la membrana citoplasmática y orientadas hacia el espacio extracelular.

La hipótesis de la que partió el grupo del Prof. Mateos fue que estas bacterias al ser patógenas intracelulares estarían sometidas a un intenso estado de estrés oxidativo, al ser reconocidas y fagocitadas por macrófagos del hospedador. Estos macrófagos constituyen la primera línea de defensa en pulmón y activan una serie de proteínas cuya principal función es la de generar estrés oxidativo en la bacteria fagocitada para destruirla. Sin embargo, muchos patógenos intracelulares son capaces de resistir ese estrés oxidativo y colonizar el medio intracelular, por lo que el grupo del Prof. Mateos se centró en el estudio de los sistemas de control Redox en actinobacterias.

Como modelo de infección el grupo se ha centrado en *R. equi*, que es un patógeno intracelular que afecta a potros y seres humanos, entre otros muchos hospedadores. Es por ello que este patógeno tiene importancia en salud humana, pero también genera pérdidas económicas relevantes en el ámbito de la ganadería equina, asociadas a la muerte de diferentes animales de cría. Este sector está valorado en 5.000 millones de euros en España según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Esta línea de investigación se basó en el estudio de la importancia de los sistemas de control Redox durante la infección de *R. equi*. El grupo del Prof. Mateos desarrolló mutantes por ingeniería genética en los que se deleccionaba los genes codificantes para cada una de las tres microrredoxinas que se han descrito hasta la fecha en el genoma de *R. equi*. Además, se generaron mutantes dobles y

un triple mutante, carente este último de las tres microrredoxinas, y por lo tanto desprovisto de los sistemas MSH/Mrx (Mourenza *et al.*, 2019).

Por otra parte, también se centró parte de la investigación del grupo en una tiorredoxina extracelular, denominada Etrx3 por la posición que ocupa en el genoma de *R. equi*; este gen también se ha deleccionado con el fin de estudiar su función durante la infección (Mourenza *et al.*, 2020a).

De forma global se analizó la sensibilidad de todas las cepas mutantes descritas anteriormente frente a compuestos oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno o el hipoclorito sódico. Posteriormente, se realizaron estudios de infección de macrófagos *in vitro*, que se desarrollaron en colaboración con investigadores de la Universidad de Roehampton (Londres). Estos ensayos permitieron demostrar que tanto la ausencia de las microrredoxinas o de la tiorredoxina Etrx3 provocaba una marcada atenuación de *R. equi*, generando cepas prácticamente avirulentas en ensayos *in vitro* (Mourenza *et al.*, 2019; Mourenza *et al.*, 2020a).

A continuación, el equipo estudió más en detalle el proceso de oxidación-reducción durante la infección intracelular causada por *R. equi*. Para ello emplearon el sensor de estrés oxidativo roGFP2 (Gutscher *et al.*, 2008), de forma que al fusionarlo a cada una de las microrredoxinas nos permitía evaluar el estado Redox del micotiol en cada momento de la infección. Así se pudieron identificar los puntos concretos de la infección en los que se producía un mayor estrés oxidativo. Por otro lado, también se puso en evidencia que el papel de una microrredoxina podía ser reemplazado por cualquiera de las otras dos presentes en el genoma, ya que la complementación con solo una de estas tres proteínas servía para restaurar el fenotipo silvestre en el triple mutante de *R. equi*. Además, se pudo observar un cierto papel secuencial en

la función de cada una de estas proteínas durante el proceso de infección.

Finalmente, dentro del estudio del estado Redox intracelular de *R. equi*, el equipo del Prof. Mateos ha comenzado a estudiar el papel de algunos antibióticos como moléculas que alteran el equilibrio Redox y los efectos de posibles sinergias de antibióticos generadores de estrés oxidativo con su mecanismo de acción antimicrobiano. Con este objetivo, se han encontrado sinergias entre antibióticos que podrían servir como nuevos tratamientos frente a *R. equi* (Mourenza *et al.* 2020b), en un momento en el que cada vez se aíslan más cepas de este patógeno que son resistentes a antibióticos. En base a lo indicado, consideramos que estos estudios podrán servir como punto de partida para la búsqueda de nuevos tratamientos frente a otros patógenos intracelulares multirresistentes a antimicrobianos cuya incidencia y mortalidad está incrementándose dramáticamente, tales como *Mycobacterium tuberculosis*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP.** (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature Methods*, 5: 553–559.
- Mourenza Á, Bravo-santano N, Pradal I, Gil JA, Mateos LM, Letek M.** (2019) Mycoredoxins are required for redox homeostasis and intracellular survival in the actinobacterial pathogen *Rhodococcus equi*. *Antioxidants* 8: 558.
- Mourenza Á, Collado C, Bravo-Santano N, Gil JA, Mateos LM, Letek M.** (2020a) The extracellular thiorredoxin Etrx3 is required for host cell infection in *Rhodococcus equi*. *Vet Res* 51: 1–7.
- Mourenza Á, Gil JA, Mateos LM, Letek, M.** (2020b) A novel screening strategy reveals ROS—Generating antimicrobials that act synergistically against the intracellular veterinary pathogen *Rhodococcus equi*. *Antioxidants* 9: 114.
- Pedre B, Young D, Charlier D, Mourenza Á, Rosado L.A, Marcos-Pascual L, Wahni K, Gonzalo de la Rubia A, Belousov V, Mateos LM, Messens J.** (2018) Structural snapshots of OxyR reveal the peroxidatic mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing. *Proc Nat Acad Sci USA* 115: E11623–E11632.