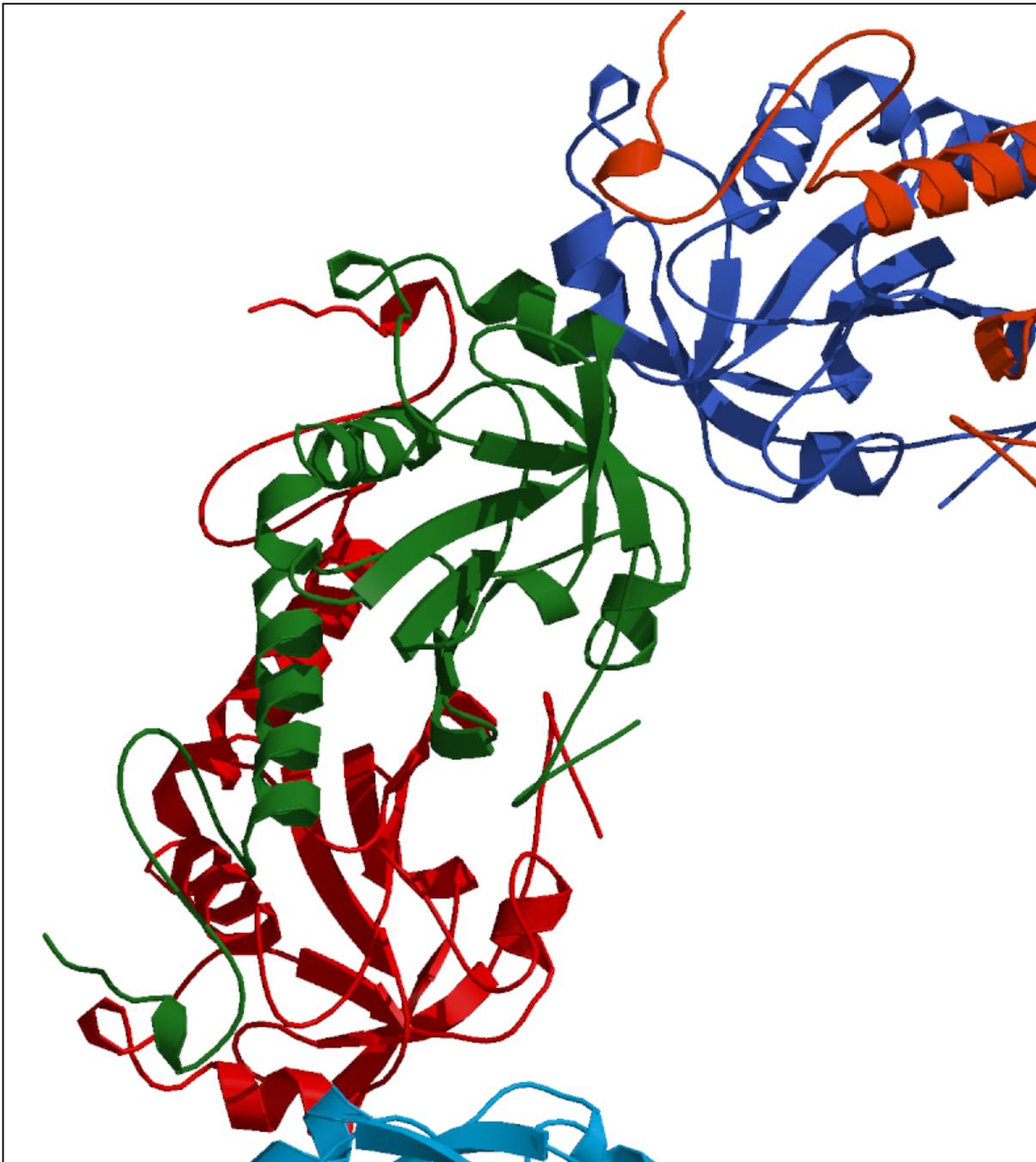


Caracterización de la Triparredoxina
Peroxidasa citosólica de Trypanosoma cruzi
en condiciones de oxidación-reducción.

MONICA GARDNER GARGIULO
AGOSTO DE 2009



Tesina de Grado: Licenciatura en
Biología
Opción Biología Molecular

Monica Gardner Gargiulo

Agosto 2009

Caracterización de la Triparredoxina
Peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi*
en condiciones de oxidación-reducción.

Unidad de Biología Molecular
Institut Pasteur de Montevideo

Tutora: Dra. Adriana Parodi-Tálice

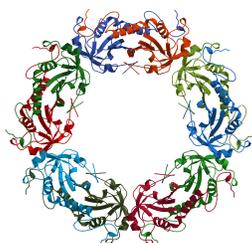


Figura de tapa: Estructura de la
Triparredoxina peroxidasa citosólica.
Extraída de Piñeyro, M.D., et al., 2005.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. LISTA DE ABREVIACIONES.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	11
3.1. Generalidades sobre el mal de Chagas (tripanosomiasis Americana).....	12
3.1.1. El curso de la enfermedad.....	13
3.2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.3. Metabolismo aeróbico, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS).....	16
3.4. Mecanismos de defensa del parásito frente al ataque oxidativo del hospedero.....	18
3.4.1. Sistema dependiente de Triparredoxina Peroxidasa	20
3.4.1.1. Peroxirredoxinas y Triparredoxina Peroxidasa.....	20
3.5. Sistema de defensa antioxidante y estrategias antiparasitarias.....	27
4. OBJETIVOS.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1. Expresión y purificación de las proteínas <i>TccTXNPx</i> y <i>TccTXNPxC52S</i> a partir de cepas transformadas de <i>E. coli</i>	32
5.1.1. Cultivo de bacterias y expresión de proteínas.....	35
5.1.2. Purificación de proteínas expresadas.....	37
5.1.3. Verificación de la presencia de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	38

5.2. Caracterización de <i>TccTXNPx</i> y <i>TccTXNPxC52S</i> en condiciones de oxidación-reducción por electroforesis bidimensional.....	40
5.2.1. Primera dimensión.....	41
5.2.2. Segunda dimensión.....	43
5.2.3. Fijación y revelado con Nitrato de Plata.....	44
5.3. Estudio por espectrometría de masa de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina de las proteínas de los geles bidimensionales.....	45
5.3.1. Protocolo para desteñir bandas provenientes de geles teñidos con plata.....	46
5.3.2. Digestión con tripsina.....	46
5.3.3. Extracción de péptidos.....	47
5.3.4. Análisis de péptidos.....	47
5.4. Inmunodetección del estado de oxidación de la cisteína peroxidática de <i>TccTXNPx</i> por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-PrxSO ₂ H.....	49
5.4.1. SDS-PAGE y transferencia a membrana.....	49
5.4.2. Bloqueo.....	50
5.4.3. Anticuerpo primario.....	50
5.4.4. Anticuerpo secundario.....	51
5.4.5. Revelado.....	51

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1. Expresión y purificación de las proteínas <i>TccTXNPx</i> y <i>TccTXNPxC52S</i> a partir de cepas transformadas de <i>E. coli</i>	53
6.1.1. Purificación de <i>TccTXNPx</i>	53
6.1.2. Purificación de <i>TccTXNPxC52S</i>	57
6.2. Caracterización de <i>TccTXNPx</i> y <i>TccTXNPxC52S</i> en condiciones de oxidación-reducción por electroforesis bidimensional.....	58
6.2.1. Análisis bidimensional de la proteína salvaje <i>TccTXNPx</i>	61
6.2.1.1. Incubación en ausencia de iodoacetamida.....	62
6.2.1.2. Incubación en presencia de iodoacetamida (IAA).....	66
6.2.2. Análisis bidimensional de la proteína mutante <i>TccTXNPxC52S</i>	67
6.3. Estudio por espectrometría de masa de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina de las proteínas extraídas de los geles bidimensionales.....	69
6.3.1. Identificación de péptidos de la proteína salvaje <i>TccTXNPx</i> : Análisis por MALDI-TOF.....	69
6.3.2. Resultados obtenidos del análisis de los espectros por MASCOT.....	70
6.3.3. Digestión virtual de la proteína <i>TccTXNPx</i>	71
6.3.4. Análisis de los espectros obtenidos por comparación con los péptidos resultantes de la digestión virtual con tripsina de la proteína.....	72
6.3.5. Estudios de espectrometría de masas para identificar cisteínas reducidas en la proteína salvaje y el estado de las cisteínas en la proteína mutante C52S luego de la incubación con peróxido de hidrógeno.....	77
6.4. Inmunodetección del estado de oxidación de la cisteína peroxidática en <i>TccTXNPx</i> por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-PrxSO ₂ H.....	79

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	82
8. AGRADECIMIENTOS.....	84
9. BIBLIOGRAFÍA.....	87

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, es una parasitemia cuyo estudio es de gran interés al ser endémica de América Latina. No existe, hasta el día de hoy, una terapia preventiva eficaz y los medicamentos empleados para el tratamiento de esta enfermedad son altamente agresivos. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos blancos de acción de fármacos y el desarrollo de posibles terapias es imperativo.

Durante su ciclo de vida *Trypanosoma cruzi* invade las células de sus hospederos vertebrados (entre los cuales se encuentra el hombre). Dentro de dichas células, el parásito está expuesto a especies reactivas de oxígeno (como H_2O_2 , por ejemplo), producidas por sus propios procesos de respiración celular o por mecanismos de defensa del huésped. Las especies reactivas de oxígeno pueden resultar perjudiciales para el parásito llevando, incluso, a su muerte. Sin embargo, los tripanosomátidos han desarrollado un sistema de enzimas antioxidantes, formado por la Triparredoxina y la Triparredoxina Peroxidasa, dependientes del tiol tripanotión, que eliminan el H_2O_2 y otros hidroperóxidos.

Este estudio se propuso caracterizar, desde un punto de vista proteómico, uno de los componentes de este sistema, la enzima Triparredoxina Peroxidasa. Dicha caracterización comprendió, en primer lugar, la expresión y purificación de la proteína Triparredoxina Peroxidasa citosólica salvaje (*TccTXNPx*) y de su forma mutante: *TccTXNPxC52S*.

Se caracterizaron los cambios en la movilidad electroforética de las proteínas por la adición de átomos de oxígeno, al ser incubadas en presencia y en ausencia de peróxido de hidrógeno y mediante la utilización de técnicas de electroforesis bidimensional. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína salvaje en las condiciones ensayadas sufre cambios en su estado de oxidación, evidenciados por cambios en su movilidad electroforética, mientras que la proteína mutada en la cisteína reactiva (*TccTXNPxC52S*) en las mismas condiciones, no presentó cambios en la movilidad electroforética. Por lo tanto, concluimos que la cisteína en la posición 52 parece ser el principal blanco para la sobreoxidación de la proteína.

Las proteínas resueltas por electroforesis bidimensional fueron analizadas por espectrometría de masa (MS) en un equipo MALDI-TOF/TOF. Se pudo evidenciar, en dos casos, la adición de 47 unidades m/z, lo que podría corresponder a 3 átomos de oxígeno, a los péptidos que contenían el residuo de cisteína reactivo. Sin embargo la presencia de esta modificación no pudo ser confirmada por no lograrse una buena fragmentación de los péptidos.

Por último, recurrimos al análisis por Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra la Triparredoxina Peroxidasa y contra ácido sulfinico (SO_2H), lo que nos permitió confirmar la presencia de cisteínas oxidadas en la proteína tras la incubación con peróxido de hidrógeno.

2. LISTA DE ABREVIACIONES

2DE: Electroforesis bidimensional

C-terminal: Extremo carboxilo terminal de una proteína (COOH)

C_P: Cisteína peroxidática (posición 52 de la cadena en TccTXNPx)

C_R: Cisteína resolutive (posición 173 de la cadena en TccTXNPx)

Cys: Residuo de Cisteína

DTT: Ditionitrotol

E. coli: *Escherichia coli*

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

IAA: Iodoacetamida

IEF: Isoelectroenfoque

m/z: Relación masa/carga de los iones producidos por espectrometría de masa.

MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization): Método de ionización utilizado en espectrometría de masa

Met: Residuo de Metionina

MS: Espectrometría de masa

N-terminal: Grupo amino terminal (NH₂)

O₂⁻: Anión superóxido

OH: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Peroxinitrito

pI: Punto isoeléctrico

Pro: Residuo de Prolina

Prx: Peroxirredoxina

Prx 1-Cys: Peroxirredoxinas de 1 cisteína

Prx 2-Cys: Peroxirredoxinas de 2 cisteínas

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

Ser: Residuo de Serina

Srx: Sulfirredoxina

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T. brucei: *Trypanosoma brucei*

TcCPX: Triparredoxina Peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi*

TccTXNPx: Triparredoxina Peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi*

TccH6TXNPx: Triparredoxina Peroxidasa citosólica con cola de 6 residuos de histidina

TccTXNPxC52S: Triparredoxina Peroxidasa citosólica con una sustitución en la posición 52 (sustitución de cisteína por serina)

Thr: Residuo de Treonina

TOF (time of flight): En espectrometría de masa, método de detección de iones según su tiempo de vuelo desde la fuente hasta el detector

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Generalidades sobre el mal de Chagas (tripanosomiasis Americana)

El Mal de Chagas, es una enfermedad infecciosa que fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909. Es endémica de América Latina, pero constituye un problema a nivel continental, ya que en los Estados Unidos existen 250 mil casos de inmigrantes afectados y se han encontrado casos de la enfermedad en Canadá y Europa ([Informe de la Presidencia de la República, 2007](#); [OMS, 2008](#)).

En América Latina es uno de los mayores problemas de salubridad; se distribuye desde México hasta el sur de Argentina y tiene mayor prevalencia en las zonas rurales más pobres. La enfermedad afecta alrededor de 18 millones de personas en el mundo entero, de las cuales mueren alrededor de 50 mil cada año ([OMS, 2008](#)).

En el Uruguay, la transmisión vectorial de la enfermedad fue detenida en 1989. De todos modos el mal de Chagas es, junto con la hidatidosis, una de las dos grandes endemias parasitarias que existen en nuestro país ([Presidencia de la República, 2007](#)).

El objetivo propuesto por la Organización Mundial de la Salud de eliminar la transmisión de la enfermedad de Chagas para 2010 no se alcanzará, y la enfermedad se está propagando más allá de las zonas en las que inicialmente era endémica ([OMS, 2008](#)).

3.1.1. El curso de la enfermedad

La enfermedad de Chagas es provocada por el parásito unicelular flagelado *Trypanosoma cruzi*, perteneciente al orden Kinetoplástida, y transmitida por insectos hematófagos triatominos, entre ellos, *Triatoma infestans*, más comúnmente conocido como vinchuca.

Presenta dos fases: una aguda y otra crónica, y si no se le trata, la infección dura toda la vida.

La enfermedad de Chagas aguda ocurre inmediatamente después de la infección, puede durar hasta varias semanas o meses. La fase aguda puede ser leve o asintomática. Puede haber fiebre o inflamación alrededor del sitio de inoculación.

Después de la fase aguda, la mayoría de las personas infectadas entran en una etapa prolongada y asintomática de la enfermedad (llamada "crónica indeterminada"), durante la cual se encuentran muy pocos (o ningún) parásitos en la sangre.

Con el pasar del tiempo, la infección puede llevar a la debilitación crónica provocada por la destrucción progresiva del tejido cardíaco y daños irreversibles al tracto digestivo. Como síntomas de la fase crónica se incluyen: anomalías del ritmo cardíaco, dilatación del corazón y dilatación del esófago o del colon, los cuales podrían llevar a la muerte ([Center for Disease Control and Prevention, 29/08/2008](#); [World Health Organization](#); [Moncayo, A., 2003](#)).

3.2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El taxón *T. cruzi* contiene dos grupos definidos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II.

T. cruzi I está asociado al ciclo de transmisión selvático y la infección de marsupiales; *T. cruzi* II está asociado al ciclo de transmisión doméstico y la infección de mamíferos placentarios (El-Sayed, N.M., et al., 2005).

A continuación nos referiremos al ciclo de vida doméstico que involucra al hombre (Figura 1).

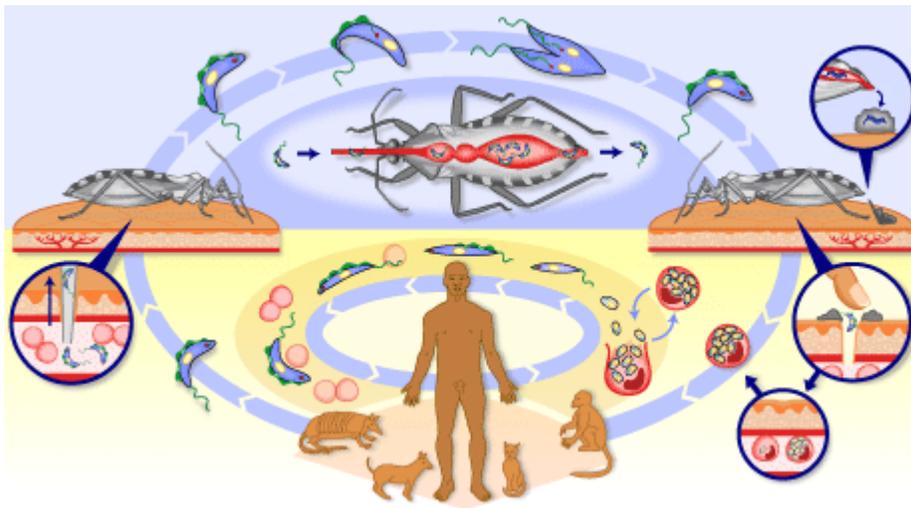


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. Tomada de www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm

El insecto triatómico reduído toma tripomastigotas (Figura 2) de la sangre cuando se alimenta de un mamífero infectado (hospedero, entre los cuales se encuentra el hombre). Los parásitos tripomastigotas luego pasan al intestino medio del vector dando lugar a epimastigotas, la forma replicativa del parásito (Tyler, K.M., et al., 2001; World Health Organization).

Los epimastigotas elongados se adhieren a la pared del intestino posterior antes de diferenciarse a formas metacíclicas (tripomastigotas metacíclicas), proceso conocido como metaciclogénesis.

Una vez formados, estos se liberan de la pared y son excretados con las heces del insecto. La contaminación de la herida dejada atrás por la picadura del insecto con este excremento, lleva a la infección del hospedero vertebrado. Los tripomastigotas metacíclicos están pre-adaptados a sobrevivir en el hospedero vertebrado; son altamente resistentes gracias a su habilidad de inhibir la activación de mecanismos inmunes del hospedero sobre su superficie (Hall, B.F., et al., 1993).

Una vez dentro del hospedero, invaden varios tipos de células, donde se diferencian a amastigotas, que proliferan en el citoplasma celular. Cuando la densidad de amastigotas es muy alta, luego de varios ciclos de división binaria, estos dan lugar a los tripomastigotas sanguíneos, que rompen las células escapando e invadiendo la sangre y la linfa y pudiendo invadir células nuevas. El ciclo se completa una vez que un insecto triatomino reduído se alimenta de un mamífero infectado (Tyler, K.M., et al., 2001; World Health Organization). Se ha demostrado también que los hospederos mamíferos pueden infectarse con tripomastigotas metacíclicos por vía oral, a través de alimentos contaminados (Coura, J.R., et al., 2002). El parásito puede también ser transmitido a través del transplante de órganos y durante el embarazo y parto (World Health Organization).

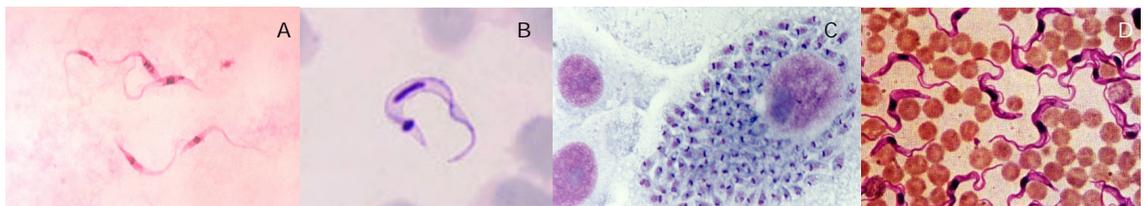


Figura 2. Etapas de desarrollo en el ciclo de vida de *T. cruzi*. En el vector invertebrado: (A) Epimastigotas; (B) Tripomastigotas metacíclicos. En el hospedero vertebrado: (C) Amastigotas y (D) tripomastigotas celulares. Tomado de WHO.

3.3. Metabolismo aeróbico, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS)

El metabolismo aeróbico utiliza el oxígeno molecular como aceptor de electrones en oxidaciones productoras de energía, el cual se reduce a agua. Además, el oxígeno molecular puede ser parcialmente reducido para formar el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Este, aunque no es muy reactivo por sí solo, es el precursor para la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, en presencia de metales de transición, el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido son responsables de la síntesis de radicales hidroxilo (OH^\cdot). Este último es un oxidante fuerte e inespecífico (Turrens, J.F., 2004). Además, existen evidencias que las ROS son utilizadas como segundos mensajeros en cascadas de señalización intracelular, (Poole, L.B., et al., 2008); por lo tanto los mecanismos antioxidantes deben estar muy precisamente regulados, para permitir la señalización pero prevenir el daño oxidativo (Budanov, A.V., et al., 2004).

Bajo condiciones normales, todas estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) son mantenidas a concentraciones intracelulares relativamente constantes por varias enzimas y antioxidantes de bajo peso molecular, que incluyen, en mamíferos, la superóxido dismutasa, las glutatión peroxidasas, catalasas y especialmente las peroxirredoxinas (Poole, L.B., et al., 2008). Una ruptura de este equilibrio conduciría a un estado de estrés oxidativo que puede ser deletéreo e incluso mortal para la célula (Turrens, J.F., 2004), ya que las ROS y RNS pueden dañar varios componentes de las células vivas como lípidos insaturados, proteínas o ácidos nucleicos (Turrens, J.F., 2004).

Además de las defensas enzimáticas, las células contienen antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión, moléculas que reaccionan directamente con radicales de oxígeno y previenen que estos oxiden biomoléculas importantes para el correcto funcionamiento de las células.

En una parasitemia, la invasión del hospedero por parásitos desencadena una serie de respuestas inmunes, entre las cuales se encuentran la activación del complemento y la activación de macrófagos.

Estos, al ser activados, sintetizan y liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales generan un estado de estrés oxidativo tras la formación de radicales libres ([Piacenza, L., et al., 2008](#)).

Los protozoos parásitos, por lo tanto, no solo tienen que eliminar sus metabolitos tóxicos endógenos, sino que tienen que enfrentarse a la respuesta oxidativa del sistema inmune de su hospedero ([Müller, S. et al., 2003](#)).

3.4. Mecanismos de defensa del parasito frente al ataque oxidativo del hospedero

Los parásitos protozoos presentan amplias diferencias en sus defensas antioxidantes cuando se comparan con sus hospederos mamíferos. En células de mamífero, y en la mayoría de los eucariotas, las enzimas antioxidantes incluyen: superóxido dismutasas de cobre y zinc; superóxido dismutasas de manganeso; glutatión peroxidadas dependientes de selenio y catalasas.

T. cruzi en particular, presenta superóxido dismutasas que contienen hierro; no presenta la enzima catalasa (que está ausente en todos los tripanosomátidos); no presenta ningún tipo de glutatión peroxidasa dependiente de Selenio, pero, en cambio, presenta dos glutatión peroxidadas independientes de Selenio (que reaccionan con peróxidos orgánicos pero no reducen peróxido de hidrógeno); una enzima similar a una hemo-peroxidasa de plantas (ascorbato-peroxidasa) y, dos peroxidadas de la familia de peroxirredoxinas de dos cisteínas (2-Cys) (Castro, H., et al., 2008; Krauth-Siegel, R.L., et al., 2008). Todas estas últimas enzimas se centran en el uso del tiol tripanotión, el principal tiol de bajo peso molecular en tripanosomátidos, y exclusivo del orden Kinetoplástida, que es un conjugado de glutatión y espermidina (Figura 3A).

Los equivalentes reductores son transferidos desde el dihidrotripanotión al hidroperóxido a través de una cascada de dos pasos, utilizando la triparredoxina y peroxirredoxinas, o el glutatión y la glutatión peroxidasa.

El tripanotión intracelular es mantenido en su forma reducida gracias a la tripanotión reductasa, una flavoproteína, y a expensas de NADPH (Müller, S., et al., 2003; Turrens, J.F., 2004; Wilkinson, S.R., et al., 2002; Wilkinson, S.R., Kelly, J.M., et al., 2003).

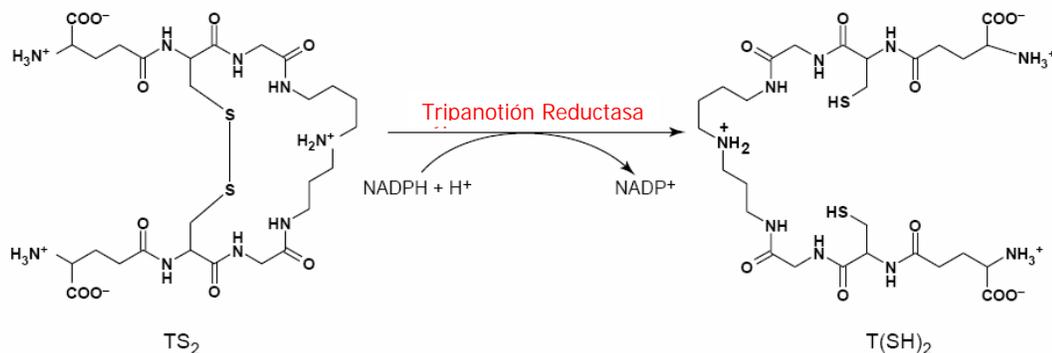


Figura 3A: El tripanotión [T(SH₂)] es sintetizado por la conjugación de dos moléculas de glutatión y una de espermidina. Una vez oxidado, el tripanotión disulfuro es reducido a tripanotión por la acción de la enzima tripanotión reductasa y a expensas de NADPH. Tomado de Müller, S., et al., 2003.

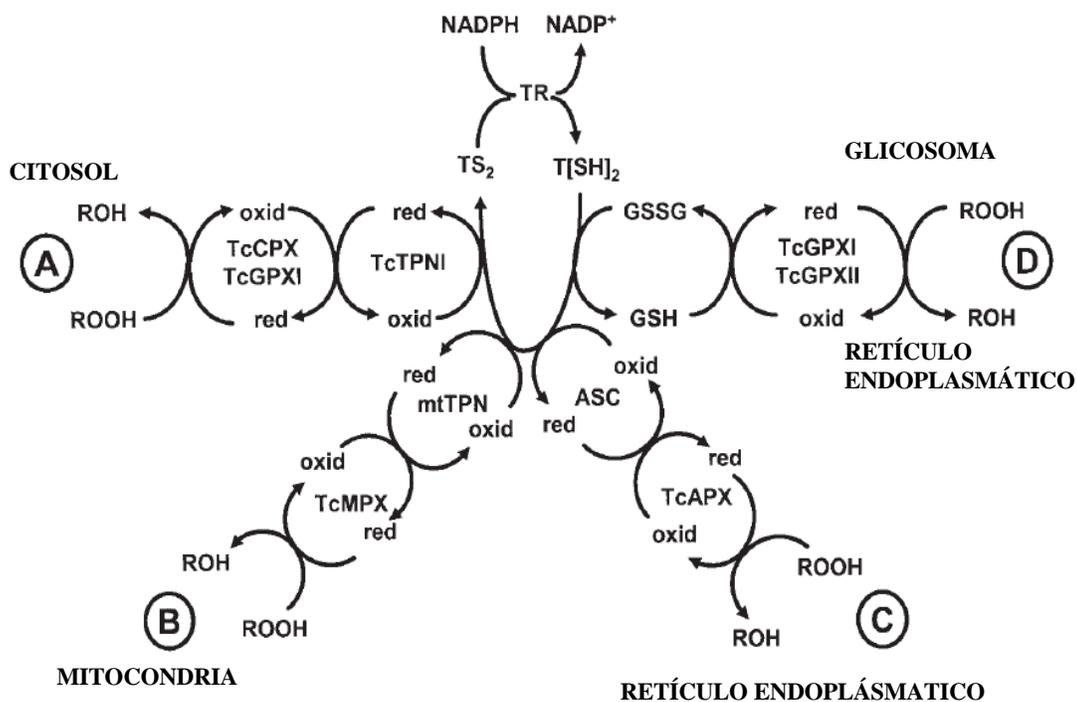


Figura 3B. Vías metabólicas del peróxido identificadas en *T. cruzi*.

Se muestran las cinco peroxidasas identificadas hasta el momento que participan de la detoxificación de hidroperóxidos en *T. cruzi*. Dos glutatión peroxidasas en el citosol, el glicosoma y el retículo endoplasmático (TcGPXI y TcGPXII); una peroxidasa que contiene un grupo hemo en el retículo endoplasmático (TcAPX); la Triparredoxina Peroxidasa mitocondrial (TcMPX); y la Triparredoxina Peroxidasa citosólica (TcCPX), objeto de este estudio, que utiliza a la Triparredoxina (TcTPNI) como donador de electrones. Tomada de Wilkinson, S., Kelly, J.M., et al., 2003

3.4.1. Sistema dependiente de Triparredoxina Peroxidasa

En *T. brucei*, la tripanotión reductasa, el Tripanotión, la Triparredoxina y la Triparredoxina Peroxidasa son esenciales para la sobrevivencia del parásito (Ariyanayagam, M.R., et al., 2005; Krieger, S., et al., 2000; Wilkinson, S.R., Horn, D., et al., 2003).

Además se cree que las peroxirredoxinas (Prx) son las responsables de determinar la virulencia en tripanosomátidos (Hofmann et al., 2002; Krieger, S., et al., 2000).

3.4.1.1. Peroxirredoxinas y Triparredoxina Peroxidasa

Las peroxirredoxinas (Prxs) son una familia de enzimas antioxidantes que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos y peroxinitrito, y cuya actividad depende de residuos de Cisteína (Cys) conservados.

Fueron inicialmente divididas en dos grupos según el número de residuos de cisteína conservados presentes en sus secuencias e involucrados en la catálisis: las peroxirredoxinas de una cisteína (Prx 1-Cys) y las peroxirredoxinas de dos cisteínas (Prx 2-Cys).

A su vez, las Prx 2-Cys fueron divididas en dos subgrupos según su estructura y mecanismo de acción: las típicas y las atípicas.

Las Prx 2-Cys típicas, forman homodímeros a través de un puente disulfuro intermolecular; las Prx 2-Cys atípicas forman homodímeros a través de un puente disulfuro intramolecular (Wood, Z.A., et al., 2003).

El sistema peroxidático más importante, común a todos los tripanosomátidos, se basa en la acción combinada de la Tripanotión Reductasa, el Tripanotión, la Triparredoxina y la Triparredoxina Peroxidasa, que facilitan el flujo de equivalentes de reducción desde el dihidrotripanotión hasta el hidropéroxido. Este sistema es vital para mantener una concentración baja de H_2O_2 (Figura 4) (Turrens, J.F., 2004).

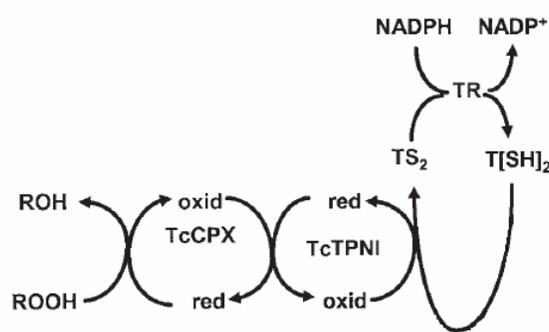


Figura 4. La flavoproteína dependiente de NADPH, Tripanotión reductasa (TR), convierte el Tripanotión (TS₂) en dihidrotripanotión (T[SH]₂). El dihidrotripanotión, a su vez, transfiere los equivalentes de reducción a la Triparredoxina (TcTPNI) que, a su vez, dona sus electrones a la Triparredoxina Peroxidasa permitiéndole reducir el hidropéroxido (ROOH) a su alcohol correspondiente (ROH).
Figura tomada de Wilkinson, S., Kelly, J.M., et al., 2003

La Triparredoxina Peroxidasa citosólica de *T. cruzi* (*TccTXNPx*) es una peroxirredoxina típica de dos cisteínas (2-Cys). Como tal posee actividad peroxidasa dependiente de residuos de cisteína reactivos.

La estructura cuaternaria de *TccTXNPx* es una unión de cinco homodímeros simétricos: dos subunidades idénticas, cada una de 25 kDa, interactúan para formar un dímero, y estos se asocian, formando un decámero (Figura 5).

Los monómeros se mantienen unidos formando dímeros, a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. La asociación entre monómeros es más fuerte que entre dímeros. Las interacciones entre dímeros son mayormente hidrofóbicas, pero existen algunos puentes de hidrógeno, como se observó para otras Prx (Piñeyro, M.D., et al., 2005).

TccTXNPx presenta dos residuos de cisteína reactivos y conservados en cada monómero: el residuo de cisteína peroxidático (C_P), en la posición 52; y el residuo de cisterna resolutivo (C_R), en la posición 173.

El residuo C_P está ubicado en la porción N-terminal, en un sitio activo formado mayormente por residuos aminoacídicos hidrofóbicos, entre ellos Pro45 y Thr49 (este último un residuo polar) que son residuos conservados en todas las Prx (Piñeyro, M.D., et al., 2005).

El otro residuo reactivo, C_R , también está ubicado en un ambiente hidrofóbico, que excluye el solvente. La exclusión del solvente en este ambiente es fundamental para mantener la actividad de la enzima, ya que evita la oxidación del residuo C_R .

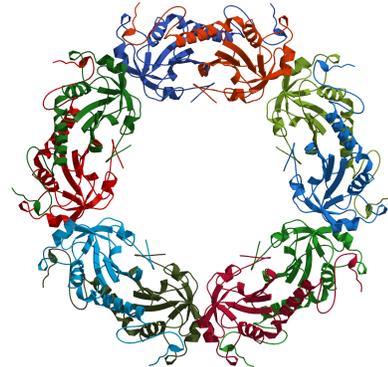


Figura 5. Estructura decamérica de la enzima Triparredoxina Peroxidasa. Representación en cinta del homodecámero, donde cada subunidad se representa con un color diferente. Tomada de Piñeyro, M.D., et al., 2005.

Las interacciones que tienen lugar entre estos residuos son críticas para la actividad catalítica de la enzima (Flohé et al., 2002).

En el ciclo catalítico se da la formación de un puente disulfuro entre la C_P de una unidad del dímero y la C_R de la otra unidad (a la que denominaremos C_{R'}).

El grupo tiol de la C_P ataca a su sustrato peróxido, y es oxidado, formándose el derivado ácido sulfénico (Cys-SOH). Este reacciona entonces con C_{R'}, para formar un puente disulfuro intermolecular. El desplegamiento local del sitio activo es esencial para la formación del puente disulfuro entre C_P y C_{R'} luego de la oxidación de la C_P a ácido sulfénico.

El puente disulfuro intermolecular es, luego, reducido por la triparredoxina (Wood, Z.A., et al., 2003).

La formación del puente disulfuro entre C_P y la C_{R'} depende del acercamiento de ambos residuos; las dos cisteínas se encuentran a una distancia considerable en el estado reducido, lo cual lo torna un proceso lento (Woo, H.A., et al., 2003; Piñeyro, M.D., et al., 2005). Es por eso que, cuando la concentración de H₂O₂ es elevada, la C_P puede reaccionar con una segunda e incluso una tercera molécula de H₂O₂, formándose los derivados sulfínico (Cys-SO₂H) y sulfónico (Cys-SO₃H), obteniéndose así dos formas de la enzima que carecen de actividad catalítica.

Se pensaba que la sobreoxidación de las peroxirredoxinas a las formas sulfínico y sulfónico era irreversible, hasta el descubrimiento de las sulfirredoxinas (Srx) y sestrinas, enzimas reactivadoras de peroxirredoxinas sobreoxidadas (Prx-SO₂H) (Jönsson, T.J., et al., 2007; Poole, L.B., 2008). Las sulfirredoxinas se encuentran conservadas desde eucariotas inferiores a superiores. Estas proteínas catalizan la reducción de Prx-SO₂H a través de un mecanismo que implica la formación de un puente disulfuro entre la Prx y la Srx. La reacción de reducción involucra a los residuos de cisteína conservados en el sitio activo.

El residuo de Cys-84 de la Srx, al igual que su entorno aminoacídico, se encuentra altamente conservado entre los distintos organismos. La presencia de Cys-84 es crítica ya que es el residuo responsable de la actividad catalítica de la proteína puesto que su sustitución en levaduras impide la formación del puente disulfuro (Biteau, B., et al., 2003).

Como la inactivación de Prx podría representar una característica regulatoria facilitando la señalización mediada por H₂O₂ en eucariotas superiores, su reversión por la Srx podría representar un paso más de regulación en este proceso (Biteau, B., et al., 2003), y el nivel de Srx en un tejido podría ser un indicador de su capacidad de respuesta al estrés oxidativo (Jönsson, T.J., et al., 2007).

En una célula en reposo, las Prx de 2-Cys se encuentran en grandes números y mantienen niveles bajos de peróxido para asegurar que no se transmitan señales. Cuando hay un estallido de la concentración intracelular de peróxido de hidrógeno, este sería suficiente para inactivar las Prx, pudiendo el peróxido de hidrógeno actuar como mensajero interactuando con otras proteínas. (Wood, Z.A., et al., 2003).

El peróxido de hidrógeno sirve como mensajero intracelular a concentraciones bajas, pero induce la muerte celular cuando está presente en altas concentraciones (Woo, H.A., et al., 2003); entonces, el residuo C_p en las peroxirredoxinas puede ser visto como un "sensor" de concentración de peróxido de hidrógeno intracelular, y el ácido sulfénico proveería un interruptor que cambie de defensa antioxidante a apoptosis una vez que las concentraciones de peróxido hayan alcanzado límites no tolerables por la célula, como una forma de evadir la respuesta inmune del hospedero (Jacob, C., et al., 2004; Poole, L., et al., 2008).

Las peroxirredoxinas podrían actuar como una compuerta modulando la respuesta celular a incrementos intracelulares de peróxido. La producción endógena elevada de peróxido de hidrógeno resultaría en una rápida inactivación de las peroxirredoxinas abriendo la compuerta y permitiendo un incremento en la concentración de H_2O_2 , lo suficiente como para que se produzca señalización (Figura 6) (Georgiou, G., et al., 2003).

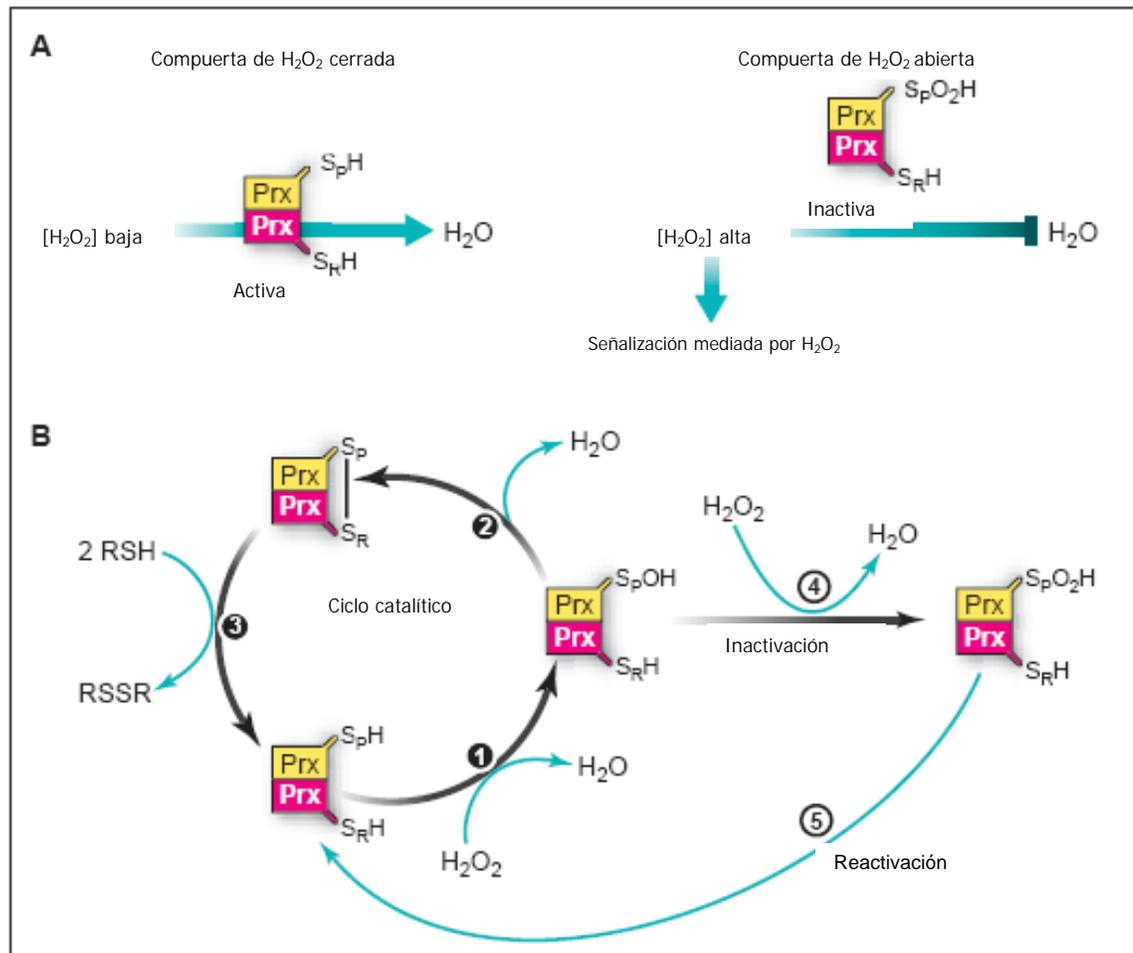


Figura 6. Modelo de compuerta para la catálisis en peroxirredoxinas.

A. A bajas concentraciones de H_2O_2 las peroxirredoxinas catalizan su reducción a agua y la molécula de alcohol correspondiente mediante la formación de un puente disulfuro entre sus cisteínas conservadas C_P (de una molécula) y C_R (de la otra molécula del dímero). Concentraciones altas de H_2O_2 provocan la sobreoxidación de las peroxirredoxinas, previniendo la reducción del peróxido y dando lugar a su acumulación en la célula y la señalización mediada por peróxido.

B. El ciclo catalítico de las peroxirredoxinas. 1. La cisteína peroxidática C_P se oxida a ácido sulfénico por H_2O_2 . 2. El ácido sulfénico es atacado por el grupo tiol de la cisteína resolutive C_R, resultando en la formación de un puente disulfuro. 3. El puente disulfuro es reducido por un agente reductor de tioles. En el paso 4. se ve la inactivación de la peroxirredoxina por sobreoxidación de la CP a ácido sulfínico (S_PO₂H) y luego la reactivación *in vivo* de la peroxirredoxina por la reducción del ácido sulfínico al tiol, en el paso 5.

Extraída de Georgiou, G., et al., 2003.

El hecho que la formación de ácido sulfinico sea un proceso reversible provee evidencia que apoya la noción de que la sobreoxidación de las peroxirredoxinas podría contribuir a la regulación de la señalización por H₂O₂ (Georgiou, G., et al., 2003).

Además de las cisteínas involucradas en la actividad peroxidasa, la enzima posee otros cinco residuos de cisteína. Dos de ellos se hallan expuestos al solvente: las Cys 57 y 111. Estos residuos de Cys podrían actuar también como sensores de niveles de peróxido en condiciones de estrés oxidativo.

3.5. Sistema de defensa antioxidante y estrategias antiparasitarias

Como los parásitos protozoos son células eucariotas, muchas vías metabólicas son similares a aquellas presentes en sus hospederos mamíferos. Como resultado, las enfermedades parasitarias son más difíciles de tratar que otras infecciones, y muchas de las drogas utilizadas para combatirlas tienen efectos secundarios severos.

La cadena de transporte de electrones de varios parásitos protozoos presenta grandes diferencias con respecto a su homóloga en los hospederos y por lo tanto constituye una vía potencial para el desarrollo de agentes farmacológicos que no interfieran con el metabolismo del hospedero, pudiendo llevar a cabo quimioterapias más efectivas (Turrens, J.F., 2004).

No existen, hasta el momento, vacunas disponibles para la prevención de la tripanosomiasis americana. Las drogas utilizadas para su tratamiento, Benznidazol y Nifurtimox, son altamente tóxicas y presentan eficacia variable, pueden causar fallas hepáticas y complicaciones en embarazos. Nifurtimox, por ejemplo, incluye los desórdenes psiquiátricos y neuronales entre sus posibles efectos secundarios (World Health Organization; Urbina, J.A., et al., 2003). Esta droga, al igual que otras, sufre ciclos redox, matando al parásito como resultado de la combinación de dos factores: la formación de radicales libres de oxígeno y por la relativa ineficiencia de las defensas antioxidantes encontradas en estos parásitos (Flohé, L., 1999; Giulivi, C., et al., 1988; Turrens, J.F., 2004). Otras drogas actúan de manera indirecta, afectando a los componentes que median la detoxificación de ROS (Viodé, C., et al., 1999).

Por el efecto que esta enfermedad tiene sobre la salud tanto en nuestro país como a nivel mundial, el estudio y la comprensión de los mecanismos involucrados en su progresión son de vital importancia, sobre todo para el desarrollo de nuevas drogas y terapias, ya que las utilizadas actualmente no son eficientes o provocan dañinos efectos colaterales en los pacientes.

Las respuestas antioxidantes de estos parásitos parecen ser de la mayor relevancia para asegurar un ciclo infeccioso exitoso puesto que las células hospedadoras generan ROS como parte de la respuesta de defensa a la infección. Los componentes del sistema antioxidante dependiente de tripanotión de *T. cruzi* han sido señalados como potenciales blancos quimioterapéuticos para el desarrollo de fármacos más específicos.

Existen evidencias en *T. brucei*, de que la reducción significativa de la concentración de la tripanotión reductasa por supresión génica, por ejemplo, impide el crecimiento de los parásitos *in vitro* (Krieger, S., et al., 2000); *in vivo*, la inyección de ratones con cepas de *Trypanosoma* con los genes para tripanotión reductasa suprimidos, no provoca infección (Krieger, S., et al., 2000), y que la expresión de cTXNPx por RNAi en *T. brucei* los vuelve inviables (Wilkinson, S.R., Horn, D., et al., 2003).

Por otra parte, parásitos que sobreexpresan la Triparredoxina Peroxidasa mostraron una mayor infectividad tanto en células fagocíticas como no fagocíticas (Piñeyro, M.D., et al., 2008).

Gracias al rol central del tripanotión en el metabolismo de hidroperóxidos en tripanosomátidos, Tcc TXNPx, junto con la tripanotión reductasa y las enzimas involucradas en la síntesis del tripanotión (Turrens, J.F., 2004), constituyen posibles blancos de acción de drogas, y la inactivación de su actividad o de su síntesis podría contribuir a una efectiva eliminación de la parasitosis.

4. OBJETIVOS

La Triparredoxina Peroxidasa citosólica (*TccTXNPx*) de *Trypanosoma cruzi* es un integrante clave en el mecanismo de defensa del parásito contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), y por lo tanto, dicha proteína puede constituir un buen blanco de acción de fármacos antiparasitarios.

Este trabajo propone realizar la caracterización de la *TccTXNPx* en condiciones de oxidación-reducción, incluyendo su estado de sobreoxidación, mediante el uso de herramientas propias de la proteómica. Además se propone verificar la importancia del residuo de Cisteína peroxidático, en la posición número 52, en el ciclo catalítico de la proteína.

Más concretamente, los objetivos propuestos son los siguientes:

- 1) Expresión de la proteína recombinante *TccTXNPx* y de la mutante *TccTXNPxC52S* y purificación cromatografía de afinidad.
- 2) Caracterización y comparación de los estados de oxidación-reducción de las proteínas (incluyendo la identificación del estado de sobre-oxidación) mediante electroforesis bidimensional.
- 3) Análisis por espectrometría de masa de los péptidos modificados en diferentes condiciones de oxidación.
- 4) Caracterización del estado de sobre-oxidación de la proteína *TccTXNPx* mediante Western Blot con anticuerpos anti-PrxSO₂H.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Expresión y purificación de las proteínas *TccTXNPx* y *TccTXNPxC52S* a partir de cepas transformadas de *E. coli*.

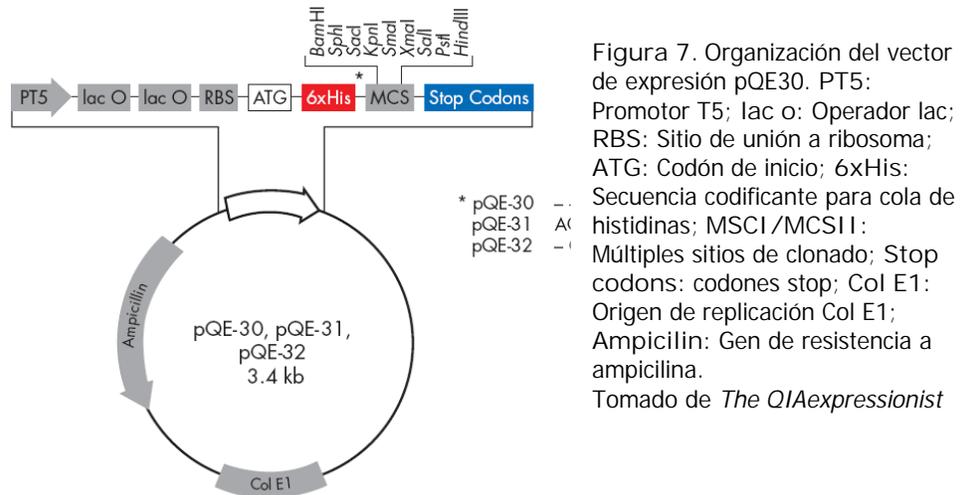
Se partió de una cepa M15 de *Escherichia coli* (*E. coli*) transformada con el vector de expresión pQE-30 (QIAGEN) conteniendo el gen correspondiente a la Triparredoxina Peroxidasa citosólica (*TccH6TXNPx*); y una cepa XL1 Blue conteniendo el vector de expresión pQE-30 con el gene *TccTXNPxC52S*, correspondiente a una proteína mutante de *TccH6TXNP*.

El vector de expresión pQE-30 está diseñado para la clonación directa de productos de PCR (polymerase chain reaction) y permite selección por ampicilina, ya que presenta resistencia a este antibiótico (la organización del vector se presenta en la Figura 7).

Se basa en el sistema de transcripción-traducción a partir del promotor T5, y utiliza al operón lac como regulador.

El operón lac regula el transporte y metabolismo de la lactosa en *E. coli*, y consiste de tres genes estructurales (que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de la lactosa), un promotor, un terminador, un regulador y un operador.

La alta tasa de transcripción iniciada en el promotor T5 solamente puede ser regulada y reprimida de manera eficiente por la presencia de altos niveles de la proteína lac represora. Esta proteína lac represora (ó represor lac) se une al operador, impidiendo la unión de la ARN polimerasa y, por lo tanto, el inicio de transcripción.



La cepa huésped M15 contiene el plásmido pREP4, que le confiere resistencia a kanamicina y expresa, de manera constitutiva, el represor *lac*.

La cepa XL1 Blue de *E. coli* presenta la mutación $lacI^q$, gracias a la cual sintetiza suficiente represor *lac* como para bloquear la transcripción de manera eficiente. Esta cepa no presenta resistencia a la kanamicina y es menos eficiente que la cepa M15 a la hora de expresar la proteína.

La expresión de proteínas recombinantes codificadas por los vectores pQE es rápidamente inducida por la adición de isopropil- β -D-tiogalactosidasa (IPTG), que se une al represor *lac* impidiendo su unión al operador, y permitiendo así la unión de la ARN polimerasa del huésped y la transcripción de las secuencias que se encuentren en dirección 3' del promotor (downstream), incluyendo la proteína recombinante. Los transcritos producidos son luego traducidos dando lugar a las proteínas a expresar.

El sistema especial de "doble operador" en los vectores de expresión pQE, en combinación con el alto nivel de la proteína *lac* represora generada por pREP4, o el gen $lacI^q$, aseguran un control implacable a nivel transcripcional.

El vector presenta una cola de seis residuos de histidina consecutivos en el extremo carboxilo-terminal (N-terminal). Esta cola, no resulta inmunogénica, es pequeña, sin carga y, por lo tanto, no interfiere con la estructura o función de la proteína purificada. La ventaja de la cola de histidinas es que permite la inmovilización de la proteína en superficies metal-quelantes (como columnas de níquel) utilizadas para purificación proteica (*The QIAexpressionist, 2003*).

En los sitios de clonado encontramos los sitios de restricción correspondientes a *Sac* I y *Hind* III (entre otros). Estos sitios de restricción fueron los utilizados para la clonación de los genes codificantes de las proteínas utilizadas en este trabajo (*Piñeyro, M.D., et al., 2005*).

5.1.1. Cultivo de bacterias y expresión de proteínas

Se realizó el siguiente procedimiento para las dos cepas:

Se cultivaron las bacterias en 25 ml de medio nutritivo LB (triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7.0).

Las cepas M15 fueron cultivadas en presencia de ampicilina (100µg/ml) y kanamicina (25µg/ml) (para selección del vector y del plásmido pREP4, respectivamente); mientras que las cepas XL1Blue fueron cultivadas solamente en presencia de ampicilina (100µg/ml) (para selección del vector).

El cultivo se realizó durante 18 horas y con agitación a 200 rpm y 37°C. Los cultivos resultantes se diluyeron en 450ml (volumen final) de medio nutritivo (LB) sin antibióticos (suponemos que la selección de bacterias deseadas se realiza en la etapa anterior). El cultivo se mantuvo en agitación a 200 rpm y 37°C durante una hora.

Luego de una hora, se midió la absorbancia a 600nm (A_{600}), y cuando la densidad óptica alcanzó las 0,6 unidades (punto óptimo para la inducción de la expresión proteica), se indujo la expresión de la proteína por incubación durante 5 horas con isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG) 0,5mM (Figura 8).

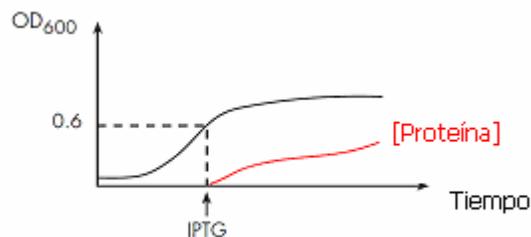


Figura 8. Tiempo óptimo para la inducción de expresión mediante la adición de IPTG. Tomado de *The QIAexpressionist*.

Las células fueron recolectadas por centrifugación a 4.000g por 25 minutos, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5ml de buffer de lisis (buffer fosfato: NaPi 50mM, NaCl 500mM e IMIDAZOL 10mM pH 7,6).

Luego las células fueron incubadas con 1mg/ml de lisozima, en hielo, por 30 minutos y finalmente fueron sonicadas por 1 minuto con pulsos cada 10 segundos. La fracción soluble fue separada por centrifugación a 15.000g por 20 minutos a 4°C.

5.1.2. Purificación de proteínas expresadas

Los sobrenadantes obtenidos en el procedimiento anterior fueron filtrados (con filtros de 0,22 μ m) y luego las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna HiTrap Affinity Column (Amersham Pharmacia Biotech) cargada con Ni²⁺, y con un flujo de 2ml/min.

Se realizaron tres corridas en blanco con 5 volúmenes de buffer fosfato con diferentes concentraciones de IMIDAZOL, 10mM, 50mM y 300mM respectivamente; se equilibró la columna con 10 volúmenes de buffer fosfato con IMIDAZOL 10mM y luego se hizo recircular el sobrenadante por una hora.

Finalmente se realizaron lavados con 5 volúmenes de buffer fosfato con IMIDAZOL 10mM, luego 5 volúmenes de buffer fosfato con IMIDAZOL 50mM (para eliminar cualquier material que estuviera unido de manera inespecífica) y finalmente se eluyó la proteína con buffer fosfato con IMIDAZOL 300mM.

5.1.3. Verificación de la presencia de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Se extrajeron muestras de cultivo previo a la adición del inductor de expresión (control sin inducir), luego de la inducción (control de inducción), de las fracciones soluble y precipitada luego del tratamiento con lisozima y centrifugación y finalmente, de las eluciones posteriores a la recirculación de la proteína.

La presencia de proteínas en la fracción soluble fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 12% (25ml) con un gel stacking al 3% (10ml) (Laemli, 1970). Se sembraron 15µl de cada uno de los extractos.

Luego de identificar la fracción en la que estaba presente la proteína de interés en su forma pura, se procedió a su diálisis y concentración.

Se dializó la proteína contra buffer fosfato, 50mM y con pH 7.4¹, centrifugándola a 3.200g en un centrífugo (Amicon Ultra-15 de MILLIPORE, con un tamaño de poro cutoff de 10KDa).

Para concentrar la proteína se centrifugaron las eluciones por 20 minutos a 3.200g y 4°C.

Finalmente se midió su concentración por ensayo colorimétrico de Bradford y por medida espectrofotométrica de la absorbancia a 280nm (A_{280}) (longitud de onda a la que absorben las proteínas), sabiendo que una solución de esta proteína a una concentración de 1mg/ml absorbe 0.97 DO (unidades de densidad óptica) (Aitken, A., et al., 1996).

¹ El buffer fosfato utilizado es una mezcla de buffer Na_2HPO_4 1M, buffer NaH_2PO_4 1M, y NaCl 100mM.

El ensayo colorimétrico de Bradford se basa en la observación que el compuesto Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma), cambia de color (de rojo a azul) cuando se une a proteínas, cambiando también su absorbancia (máximo en 465nm para rojo; máximo en 610nm para azul). La diferencia entre ambas formas es máxima a 595nm, por lo que esa es la longitud de onda óptima para medir la concentración del complejo Coomassie-proteínas.

Se realizan mediciones luego de una breve incubación a temperatura ambiente.

Como estándar, se realiza una curva con diluciones de BSA (sero-albúmina bovina) a diferentes concentraciones ([Bradford, M.M., 1976](#)).

5.2. Caracterización de TccTXNPx y TccTXNPxC52S en condiciones de oxidación-reducción por electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional es la combinación de dos procedimientos electroforéticos de alta resolución (isoelectroenfoque y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS).

En el gel de la primera dimensión, las proteínas solubilizadas, se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) por isoelectroenfoque (IEF).

Las proteínas son moléculas anfotéricas, pueden tener una carga neta positiva, negativa o cero, dependiendo del pH del medio. El pI es el pH específico en el que la carga neta de una proteína es cero. Las proteínas presentan carga positiva a valores de pH por debajo de su pI, y carga negativa cuando el pH es mayor a su pI.

La presencia de un gradiente de pH es imprescindible para la técnica del IEF. En un gradiente de pH, bajo la influencia de un campo eléctrico, una proteína se moverá a la posición en el gradiente en que su carga neta sea cero.

La resolución va determinada por el gradiente de pH y la intensidad del campo eléctrico. Por lo tanto el IEF se lleva a cabo a muy altos voltajes

El gel de la primera dimensión es luego aplicado en la parte superior de un gel de poliacrilamida-SDS y se realiza una corrida electroforética. Las proteínas del gel de la primera dimensión, migran hacia el gel de la segunda dimensión donde son separados de acuerdo a su peso molecular (Adams, L.D., 2004).

Para los ensayos de electroforesis bidimensional se utilizaron modificaciones de los protocolos propuestos por [Rabilloud et al., 2002](#), [Chevallet et al., 2003](#) y [Wagner, E., et al., 2002](#). Ellos proponen un mecanismo de estudio que comprende el tratamiento de cultivos celulares con agentes oxidantes, ensayos de electroforesis bidimensional para visualizar cambios en el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas y, posteriormente un análisis por espectrometría de masa (MS) para identificar aquellas modificaciones en las proteínas que fueran responsables del cambio en el pI. Se realizaron ajustes a dichos protocolos para utilizarlos sobre proteínas purificadas.

5.2.1. Primera dimensión

Se tomaron muestras de las proteínas obtenidas luego de la expresión y purificación detalladas en el paso 5.1 y se realizaron ensayos de electroforesis bidimensional comparando condiciones de oxidación y reducción para las proteínas *TccTXNPx* y *TccTXNPxC52S*.

Para la proteína salvaje se llevaron a cabo dos “escenarios” de tratamiento diferentes. Entre 10 y 15 μg de la proteína fueron incubados en las siguientes condiciones:

(1) Sin incubación con iodoacetamida

Condición oxidada: H_2O_2 500 μM y DTT 10mM durante 15 minutos

Condición reducida: DTT 10mM durante 15 minutos

(2) Incubación final con iodoacetamida (IAA; agente alquilante)

Condición oxidada: H_2O_2 500 μM y DTT 10mM durante 15 minutos

Condición reducida: DTT 10mM durante 15 minutos

Incubación con IAA 25 mg/ml durante 15 minutos en la oscuridad

Para el estudio con la proteína mutante, las condiciones de incubación utilizadas fueron solamente las que no incluyen IAA.

Luego de su incubación, se cargaron las proteínas en una cuba de isoelectroenfoque junto con 125 µl de buffer de rehidratación², 1.75 µl de DTT 20%, la cantidad recomendada de anfolitos³ (4-7 ó 3-10 NL, según corresponda de acuerdo al gel utilizado), y la tira de gel IPG (Immobiline DryStrip gels, de rango 4-7 ó 3-10 NL, de 3 mm de espesor y 7 cm de longitud).

Se eligieron tiras de gel con esos rangos de pH de acuerdo al valor de pI teórico de la proteína. Dicho valor, para la proteína purificada, incluyendo su cola de 6 residuos de Histidina es de, aproximadamente, 6.5 unidades.

La tira se insertó con el gel hacia abajo en la cuba, sin atrapar burbujas de aire, y con su extremo más ácido hacia el ánodo, se cubrió con aceite mineral (Dry Strip Cover Fluid), y se realizó el isoelectroenfoque (Görg, A., et al, 2000).

Se utilizó un equipo IPGphor II (GE Healthcare) y el siguiente protocolo: Rehidratación 12h; 500 V 0,5h; 1.000 V 1h; 2.000 V 1h y 5.000 V 7h.

Una vez finalizado el IEF, las tiras fueron sumergidas en buffer de equilibración⁴ con DTT (50µl/ml) durante 15 minutos.

² Buffer de rehidratación: Urea 8M, CHAPS 2% p/v y una traza de Bromophenol blue en agua doble destilada.

³ Anfolitos: moléculas anfotéricas pequeñas y solubles con una amplia capacidad de buffer en pH cercanos a su pI.

⁴ Buffer de equilibración: 50mM Tris-HCL (1.5M, pH8.8), 6M urea, 30% v/v de glicerol, 2% p/v SDS y una traza de Bromophenol blue en agua doble destilada.

5.2.2. Segunda dimensión

Una vez realizado el IEF y la etapa de equilibración, la segunda dimensión fue resuelta en un gel de poliacrilamida 12% con SDS.

Se armó un gel de poliacrilamida de 1.5mm de espesor. Una vez polimerizada la acrilamida, el gel de la primera dimensión se montó en la parte superior del gel de la segunda dimensión.

Se incluyó un marcador de peso molecular [Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); bandas: 120kDa, 86kDa, 47kDa, 34kDa, 26kDa y 20kDa] para identificar las bandas y se selló con solución selladora de agarosa (0.5% Agarosa, 0.002% Bromophenol blue diluidos en buffer de electroforesis-SDS).

El gel se corrió a 25 mA y con voltaje libre, sin dejar salir el frente de corrida (aproximadamente 1 hora 30 minutos), en buffer Tris-Glicina-SDS⁵.

⁵ Buffer Tris-Glicina-SDS: 25mM Tris, 192mM Glicina, 0.1% SDS. pH 8.3.

5.2.3. Fijación y revelado con Nitrato de Plata

Los geles fueron fijados en solución de fijación (etanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.05%) durante una hora en agitación suave.

Se realizaron 3 lavados de 5, 10 y 15 minutos en etanol 50% y luego se enjuagaron con solución de tiosulfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2gr/L).

Se realizaron 3 enjuagues breves con H_2O nano-Q (aproximadamente 20 segundos por lavado).

Luego se incubaron los geles en solución de nitrato de plata durante 20 minutos (AgNO_3 2g/L, formaldehído 0.75ml/L).

Nuevamente, se realizaron 3 enjuagues breves con H_2O nano-Q, y finalmente se incubaron los geles en solución de revelado hasta visualizar los spots [Na_2CO_3 30g/L, tiosulfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2gr/L) 20ml/L, formaldehído 37%].

5.3. Estudio por espectrometría de masa de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina de las proteínas de los geles bidimensionales.

La espectrometría de masa (MS) es una metodología ampliamente utilizada para identificar proteínas, ya que a partir del peso molecular y/o información parcial de secuencia pueden hacerse búsquedas en bases de datos.

Provee información de las masas independientemente de cualquier modificación estructural, y puede ser utilizada como una herramienta para identificar dichas modificaciones. Tiene una gran precisión y no requiere de grandes cantidades de material.

La técnica se basa en la formación de iones en fase gaseosa a partir de moléculas neutras e intactas, para luego determinar sus pesos moleculares.

Todos los espectrómetros de masa tienen tres componentes esenciales: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector.

Los iones son producidos a partir de la muestra en la fuente de iones; estos son separados en el analizador de masas, según su relación masa/carga (m/z) y luego son detectados, generalmente por un multiplicador de electrones. El sistema produce un espectro, que es un gráfico de abundancia de iones vs. m/z .

Para este estudio se utilizó un equipo MALDI-TOF/TOF. MALDI es un método de ionización láser asistida por matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization) que produce iones de una sola carga los cuales son detectados según su tiempo de vuelo (time of flight ó TOF).

El equipo se utilizó en modo reflector para eliminar la energía cinética inicial que presentan algunos péptidos, que provoca que miembros de la misma población iónica lleguen al detector con pequeñas diferencias de tiempo, produciendo un pico más ancho que el esperado si no existiera energía cinética inicial.

Un reflectrón corrige la variación inicial en energía cinética, retrasando los iones hasta que se detienen, y luego revirtiendo su dirección y acelerándolos hasta ser detectados.

Todo esto provoca que los iones que presentan una relación masa/carga determinada tengan tiempos de vuelo más similares, mejorando la resolución (Carr, S.A., et al., 1997).

Los spots resueltos por electroforesis bidimensional en el paso anterior, fueron extraídos de los geles con un bisturí y digeridos con la enzima tripsina para la posterior identificación de péptidos mediante MS.

5.3.1. Protocolo para desteñir bandas provenientes de geles teñidos con plata.

Se cubrió cada muestra con solución de decoloración⁶. Se agitó y se descartó el sobrenadante para repetir lo anterior. Se realizaron dos lavados con agua mili Q.

Se agregó, a cada muestra, la cantidad suficiente de bicarbonato de amonio 0,2% como para cubrir la banda y se agitó durante 20 minutos.

Se realizaron dos recambios más con acetonitrilo puro y las muestras se secaron bajo corriente de nitrógeno.

5.3.2. Digestión con tripsina.

Se agregaron, a cada muestra, 10 µl de una mezcla de bicarbonato de amonio 1/3 y tripsina 0,5 µg/µl.

Una vez que el gel estuvo hidratado, se cubrieron las muestras con bicarbonato de amonio 1/3 y se incubó durante la noche a 35°C.

⁶ Solución de decoloración: mezcla 1:1 de solución de ferrocianuro [$K_3(FeCN_6)$] 30mM y solución de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) 100mM.

5.3.3. Extracción de péptidos

Se preparó la digestión con 1% de ácido trifluoroacético (TFA).

El sobrenadante fue recuperado y luego se cubrió cada banda de gel con 0,1% TFA y 60% acetonitrilo, y se agitó durante una hora.

Se repitió el paso anterior y finalmente se concentró la muestra por centrifugación en vacío (Speed Vac) hasta que el acetonitrilo se hubiera evaporado (sin que se seque la muestra).

5.3.4. Análisis de péptidos

Los péptidos resultantes fueron procesados en un espectrómetro de masa MALDI-TOF/TOF (4800 Maldi Tof/Tof Analyzer, Applied Biosystem). Se realizó la calibración externa e interna del equipo (eliminando picos conocidos de queratina y auto-digestión de la tripsina) y los espectros resultantes fueron analizados mediante MASCOT, herramienta informática en línea (<http://www.matrixscience.com>).

Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes:

- Tipo de búsqueda: peptide mass fingerprint
- Enzima utilizada para la digestión: tripsina, permitiendo un corte salteado
- Modificaciones variables: oxidación de metionina

Se buscaron los valores monoisotópicos de péptidos con una carga de 1+, y con una tolerancia de $\pm 0.1\text{Da}$.

El peso monoisotópico de una molécula es la suma de las masas de los isótopos más abundantes de cada elemento presente (Carr, S.A., et al., 1997).

Además, los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados obtenidos de la digestión virtual de la proteína. Esta se llevó a cabo utilizando GPMaw (herramienta disponible en línea; <http://www.gpmaw.com>).

Las condiciones de la digestión virtual con tripsina fueron las siguientes: se permitieron modificaciones en los residuos de metionina (oxidación), no se permitió ninguna modificación en los residuos de cisteína, se permitió que la enzima se saltara un corte, y se utilizó la siguiente secuencia correspondiente a la proteína salvaje, obtenida de la base de datos del NCBI (en rojo y verde se muestran las cisteínas de interés, en las posiciones 52 y 173 respectivamente):

```
1   MSCGEAEDLH PAPDFNETAL MPNGTFKKVA LTSYKGKWL V LFFYPMDFTF
51  VCPTEICQFS DRVKEFSDIG CEVLACSMDS EYSHLAWTSI ERKRGGLGQM
101 NIPILADKTK CIMKSYGV LK EEDGVAYRGL FIIDPKQNL R QITVNDLPVG
151 RDVDEALRLV KAFQFVEKHG EVC PANWKPG DKTMKPDPEKSKEYFGAVAK
201 LP
```

5.4. Inmunodetección del estado de oxidación de la cisteína peroxidática de TccTXNPx por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-PrxSO₂H.

El Western Blot es un método de detección de proteínas mediante su reacción con anticuerpos específicos que luego son revelados y visualizados.

Se incubaron 5 µg de proteína en buffer HEPES⁷ 50mM, pH 7,0, con 1mM de DTT y concentraciones variables de peróxido de hidrógeno (0mM, 0,5mM y 2mM) durante 20 minutos y a temperatura ambiente.

Luego se incubó con IAA 0,6 µM durante 5 minutos y en la oscuridad.

Finalmente se realizó la electroforesis en gel con las muestras tratadas.

5.4.1. SDS-PAGE y transferencia a membrana

Las muestras se corrieron en el gel de poliacrilamida 12% (sembrado por duplicado) a 25 mA con voltaje libre y hasta dejar salir el frente de corrida (aproximadamente 2 horas).

Una vez finalizada la corrida se realizó la transferencia húmeda⁸ en una cuba de electrotransferencia (Amersham) a la membrana de nitrocelulosa (Amersham) durante 1 hora a 40mA y con voltaje libre.

La transferencia fue confirmada por tinción con Ponceau 0,2% en ácido acético 10%. Esta solución tiñe las bandas de proteína de rojo y de este modo se confirma que las proteínas hayan sido transferidas desde el gel a la membrana.

Luego de confirmada la transferencia se lavó la membrana con PBS.

⁷ HEPES es un buffer orgánico cuya capacidad de buffer es cercana al rango de pH fisiológico (7,2 – 7,6)

⁸ Buffer de transferencia: Trizma Base (Sigma) 25mM, Glicina (Sigma) 192mM y EtOH 20% diluidos en H₂O, pH 8,3.

5.4.2. Bloqueo

Se bloqueó la membrana con PBS-Tween 20 0,1% y leche en polvo 5%. El bloqueo se realizó durante la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la membrana (2 lavados de 10 minutos) con PBS-Tween 20 0,1% para eliminar la solución de bloqueo y se realizó la incubación con el anticuerpo primario.

5.4.3. Anticuerpo primario

La membrana se cortó en dos trozos para separar las muestras que fueron sembradas por duplicado.

Uno de los duplicados fue incubado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-*TccTXNPx* (Piñeyro, M.D., et al., 2008) en una dilución 1:4.000 en PBS-Tween 20 0,1%-BSA 0,1%. Este anticuerpo identifica la presencia de la proteína *TccTXNPx*.

El segundo duplicado fue incubado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-PrxSO₂H (Labfrontier), en una dilución 1:2.000 en PBS-Tween 20 0,1%-BSA 0,1%. Este anticuerpo identifica la presencia de ácido sulfínico.

Ambas membranas se incubaron durante una hora y a temperatura ambiente.

Las membranas se lavaron (3 lavados de 5 minutos) con PBS-Tween 20 0,1% con agitación vigorosa.

5.4.4. Anticuerpo secundario

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa (DAKO) en una dilución 1:10.000 en PBS-Tween 20 0,1%-BSA 0,1%.

Las membranas se lavaron nuevamente (3 lavados de 5 minutos) con PBS-Tween 20 0,1% con agitación vigorosa.

5.4.5. Revelado

Para revelar las bandas se incubaron las membranas con una mezcla 1:1 de los reactivos incluidos en el kit supersignal (Thermo scientific) durante un minuto.

Luego, utilizando el G-BOX (Syngene), las membranas fueron expuestas por períodos de tiempo variables hasta lograr visualizar la quimioluminiscencia. Las imágenes visualizadas fueron registradas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Expresión y purificación de las proteínas *TccTXNPx* y *TccTXNPxC52S* a partir de cepas transformadas de *E. coli*.

Se contó con cepas transformadas de *E. coli* que expresan las proteínas de interés. Estas fueron crecidas en medio nutritivo LB durante la noche y, luego, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante la incubación durante 5 horas con IPTG 0.5 mM (ver sección 5.1.1).

Una vez expresadas las proteínas, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 4000g, lisadas y sonicadas. La fracción soluble (conteniendo las proteínas expresadas) fue obtenida por centrifugación a 15000g y filtrada con filtros con poros de 0.22 μ m.

Se extrajeron controles antes y después de la inducción de la expresión, de las fracciones soluble y precipitada luego del tratamiento con lisozima y centrifugación y de las eluciones realizadas y se sembraron en un gel SDS-PAGE al 12% para identificar las fracciones que contienen la proteína de interés.

6.1.1. Purificación de *TccTXNPx*

Las proteínas de interés se expresan con una cola C-terminal de 6 residuos de histidina, esto hace que sea posible su purificación, a partir de la fracción soluble obtenida como se indicó anteriormente, por cromatografía de afinidad en una columna de resina cargada con Níquel (Ni^{2+}). Una vez que la proteína se encuentra unida a la matriz de la columna (mediante interacciones entre los residuos de histidina de la cola y las moléculas de níquel presentes en la matriz), se eliminan uniones inespecíficas mediante lavados con buffer fosfato con bajas concentraciones de IMIDAZOL y, finalmente, la proteína es eluida con buffer fosfato con IMIDAZOL 300mM.

Al aumentar las concentraciones de IMIDAZOL, las proteínas con cola de 6 histidinas se disocian ya que no pueden competir por los sitios de unión a la resina (las proteínas también pueden ser eluidas mediante una disminución del pH, pero la elución con IMIDAZOL es recomendada para la purificación de proteínas en su estado nativo) (HiTrap affinity columns, Instructions, Amersham Pharmacia Biotech).

La purificación de *TccTXNPx* fue confirmada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % (Figura 9), observándose una banda correspondiente a la proteína de interés (de aproximadamente 25 kDa).

El gel fue cargado con los controles sin inducir y de inducción (extraídos anterior y posteriormente a la adición de IPTG y previo a la cromatografía de afinidad; carriles 1 y 2 respectivamente), el material no unido obtenido luego de la recirculación de la proteína (carril 3), las eluciones (carriles 5 a 9) y un marcador de peso molecular (carril 10).

La banda esperada fue observada en los carriles correspondientes al control de inducción, al material no unido y en los carriles correspondientes a las eluciones. La intensidad de la misma fue mayor en los carriles correspondientes al control de inducción y a la primera elución.

Por otra parte, encontramos bandas inespecíficas en los carriles correspondientes a los controles sin inducción y de inducción y en el carril correspondiente a la primera elución.

Los controles sin inducción y de inducción son extractos proteicos totales de *E. coli*, por lo tanto esperábamos la presencia de una gran cantidad de bandas; en cambio, en el carril correspondiente a la primera elución, donde se observan los contenidos de la fracción obtenida luego de la purificación, no esperábamos encontrar tantas bandas inespecíficas. Por lo tanto, aunque en el carril 5 se encuentra la mayor cantidad de proteína, se eligió la segunda elución (carril 6) para continuar el estudio (diálisis y concentración), dado que presenta menor cantidad de bandas inespecíficas contaminando la fracción.

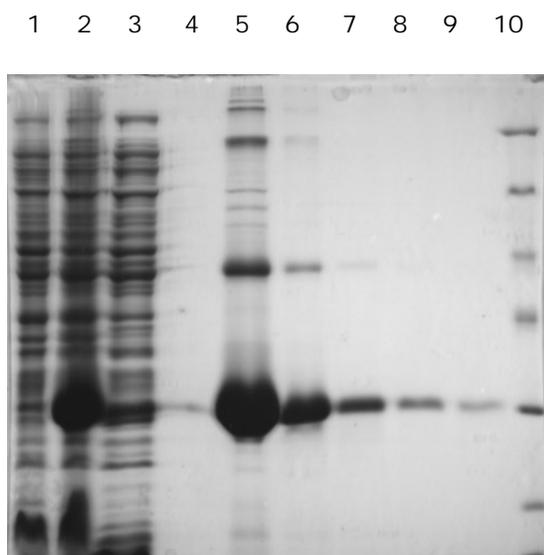


Figura 9. Gel de purificación de *TccTXNPx*. El gel (poliacrilamida al 12%) fue sembrado de la siguiente manera: Carril 1: control sin inducir; Carril 2: control de inducción; Carril 3: material no unido; Carriles 5-9: eluciones; Carril 10: marcador de peso molecular (Low Molecular Marker (Fermentas) 116kDa, 66.2 kDa , 45 kDa , 35 kDa , 25 kDa , 18.4 kDa y 14.4 kDa)

En los carriles correspondientes a la primera y segunda eluciones de la proteína purificada (carriles 5 y 6 de la Figura 9), se observa una banda nítida y de intensidad decreciente de aproximadamente 45 kDa que correspondería al dímero de la proteína. La banda que se encuentra cercana a los 116 kDa, (que también se encuentra presente en el carril 5 y es menos visible en el carril 6) podría corresponder a algún oligómero de la proteína, que por su tamaño posiblemente sea un tetrámero. Esta es una observación común en geles de purificación de proteínas de la familia de las peroxirredoxinas (Flohé, L., et al., 1999; Guerrero, S.A., et al., 2000, Montemartini, M., et al., 1999).

Además, evidencias recientes de estudios llevados a cabo (en bacterias y mamíferos) con peroxirredoxinas de 2-Cys típicas parecerían revelar una íntima conexión entre el estado de oligomerización de las proteínas y su estado de oxidación; las formas reducida y sobreoxidada de estas proteínas favorecerían el estado decamérico; mientras que la forma de puente disulfuro existiría predominantemente como dímero (Wood, ZA et al., 2003).

Para confirmar que se trata de oligómeros de la misma proteína y no de una proteína contaminante, podríamos llevar a cabo un ensayo de Western Blot de las eluciones con un anticuerpo anti-cTXNPx. De todos modos ya ha sido demostrado que la proteína TcH6TXNPx forma dímeros estables que pueden ser detectados en geles reductores SDS-PAGE ([Piñeyro, M.D., et al., 2005](#)).

La presencia de la banda esperada en el carril correspondiente al material no unido (carril número 3), recolectado luego de la recirculación de la proteína, puede deberse a la saturación de la columna utilizada durante la purificación gracias a la elevada producción de proteína recombinante. Podemos afirmar que el proceso de expresión fue realizado con éxito a juzgar por la cantidad de proteína obtenida (7,0 mg/ml en promedio).

6.1.2. Purificación de *TccTXNPxC52S*.

El gel correspondiente a la purificación de la proteína mutante *TccTXNPxC52S* fue sembrado de la siguiente manera: marcador de peso molecular (carril 1), eluciones (carriles 2 a 6) y material no unido (carril 7) (Figura 10).

En el gel notamos la presencia de una banda del tamaño esperado (aproximadamente 25kDa) que va disminuyendo en intensidad con las sucesivas eluciones (Figura 10). En los carriles correspondientes a la primera y segunda eluciones, encontramos bandas de aproximadamente 45 y 116 kDa de peso molecular que podrían corresponder al dímero y tetrámero de la proteína (como se vio en el caso de la proteína salvaje).

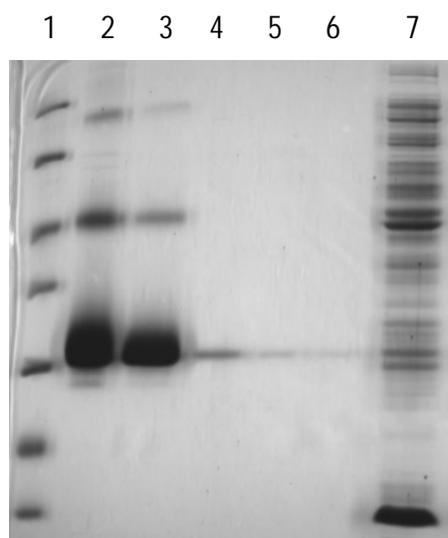


Figura 10 Purificación de *TccTXNPxC52S* (mutante).

El gel (poliacrilamida al 12%) fue sembrado de la siguiente manera:

Carril 1: marcador de peso molecular (Low Molecular Marker (Fermentas) 116kDa, 66.2 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18.4 kDa y 14.4 kDa); Carriles 2-6 eluciones; Carril 7: material no unido.

En este caso no se incluyeron los controles de inducción y sin inducir.

En la proteína salvaje, el dímero se forma cuando se da la formación de un puente disulfuro entre el átomo de azufre de la cisteína peroxidática (C_p) de una subunidad (posición 52) y el átomo de azufre de la cisteína resolutive (C_R) de la otra subunidad (posición 173). En la proteína mutante, el residuo C_p , de la posición 52, está sustituido por un residuo de Serina.

La Serina no contiene átomos de azufre y, por lo tanto, es incapaz de participar de la formación de puentes disulfuro. De todos modos, en la figura 10 hay clara evidencia de la presencia de dímeros y oligómeros (que podrían ser tetrámeros) de la proteína, aunque no están presentes todos los residuos necesarios para formar los puentes disulfuro.

Esto es contrario a lo publicado por [Wilkinson, et al., 2000](#), donde afirma que la capacidad de las peroxirredoxinas de formar dímeros está mediada por los residuos de cisteína presentes en los dos dominios conservados.

En este caso se escogió la segunda elución (carril 3) para continuar con el proceso de purificación.

Comparando las figuras 9 y 10 se evidencia una gran diferencia en cuanto a la cantidad de proteína expresada por ambas cepas. Habiendo partido desde cultivos de igual tamaño y habiendo realizado la inducción de la expresión al mismo momento para los dos cultivos (densidad óptica de aproximadamente 0.6 unidades), la cantidad de proteína purificada a partir de la cepa M15 de *E.coli* fue superior a la cantidad de proteína purificada a partir de la cepa XL1 Blue. Esto confirmaría lo dicho anteriormente respecto a que la cepa XL1 Blue es menos eficiente que la cepa M15 a la hora de expresar proteínas, aunque deberíamos comparar las fracciones sin inducir e inducida poder afirmarlo a modo concluyente.

Una vez purificada y cuantificada la proteína, esta puede almacenarse en un freezer a -80°C en buffer HEPES, hasta ser utilizada.

6.2. Caracterización de *TccTXNPx* y *TccTXNPxC52S* en condiciones de oxidación-reducción por electroforesis bidimensional

Los tioles presentes en la Triparredoxina Peroxidasa pueden sufrir oxidación por la adición de uno, dos o tres átomos de oxígeno a la C_p , dando lugar a los ácidos sulfénico, sulfinico y sulfónico respectivamente.

El ácido sulfénico, al igual que el puente disulfuro, tiene una vida muy breve ya que es susceptible a la reducción por DTT (presente en el medio de incubación). Los ácidos sulfinico y sulfónico son formas de la proteína DTT-resistentes (Wagner, E., et al., 2002), no pueden ser reducidas por DTT (al contrario del ácido sulfénico y el puente disulfuro), representan formas inactivadas de la proteína y presentan modificaciones que provocan cambios en la movilidad de la misma.

La adición de átomos de oxígeno agrega cargas negativas, un cambio que puede ser puesto en evidencia mediante electroforesis bidimensional. Una proteína con mayor carga negativa, tiene un pI menor, por lo tanto su posición final luego de un ensayo de isoelectroenfoque será diferente a la posición de la misma proteína sin cargas negativas adicionales.

Mediante la incubación de las proteínas de interés en medios oxidativos y reductores, y a través de la utilización de esta técnica, el objetivo fue el de identificar los estados de oxidación de las proteínas *TccTXNPx* y *TccTXNPxC52S*.

Para este estudio se utilizaron las proteínas purificadas utilizando el procedimiento descrito en la sección 5.2.

Entre 10-15 μ g de proteína fueron incubados en condiciones reductoras (en presencia de DTT 10mM) o condiciones oxidativas (en presencia de H_2O_2 500 μ M y DTT 10mM) durante 15 minutos.

Se incluyó DTT en ambos medios de incubación para permitir la sobreoxidación de las proteínas. En presencia del agente oxidante, solamente, se formarían puentes disulfuro entre monómeros de la proteína y los tioles quedarían protegidos, imposibilitando la formación de los ácidos sulfinico y sulfónico. En cambio, en presencia del agente oxidante y el reductor, permitimos que la proteína ingrese en un ciclo de oxidación-reducción que en última instancia posibilitará la sobreoxidación de la misma.

En el tratamiento de la proteína salvaje, *TccTXNPx*, se realizó el estudio con dos condiciones de incubación diferentes. En una de las condiciones se agregó un paso de incubación con iodoacetamida 25mg/ml, agente alquilante, durante 15 minutos y en la oscuridad.

Posteriormente se realizó una electroforesis bidimensional.

Para la primera dimensión se utilizaron geles de rango 3-10 NL (no lineal) o 4-7, tomando en cuenta el valor de pI teórico de la proteína que es de 6.5.

El IEF constó de los siguientes pasos: rehidratación 12h; 500 V 0,5h; 1.000 V 1h; 2.000 V 1h y 5.000 V 7h.

Para la segunda dimensión se corrió un gel SDS-PAGE de poliacrilamida 12%.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata para su visualización (Ver sección 5.2.3). Los resultados pueden observarse en las Figuras 11 a 14.

Al realizar los estudios de electroforesis bidimensional se logró una alta reproducibilidad en el método.

El IEF se llevó a cabo durante 24 hs, hasta alcanzar los 27.000 V/h aproximadamente, en todas las corridas.

6.2.1. Análisis bidimensional de la proteína salvaje *TccTXNPx*

Para la proteína salvaje, el análisis bidimensional se hizo en dos etapas.

En una primera instancia, se siguió el procedimiento descrito en el paso anterior (mismo procedimiento que luego fue utilizado para llevar a cabo el análisis bidimensional de la proteína mutante).

En una segunda instancia, se incorporó la incubación con IAA luego de la incubación en las condiciones oxidativas o reductoras y previo al isoelectroenfoque. Los geles fueron incubados en presencia de IAA 25 mg/ml durante 15 minutos en la oscuridad.

La IAA es un agente alquilante, alquila las cisteínas que se encuentran en su estado reducido, uniéndose a ellas de manera covalente y previniendo la formación de puentes disulfuro. En este caso se incorporó al medio de incubación para "congelar" las condiciones en que se encontraba la proteína luego de la misma. Pudiendo así visualizar, exclusivamente, los efectos producidos por dicha incubación y no permitiendo que la oxidación continúe más allá de ese período.

6.2.1.1. Incubación en ausencia de iodoacetamida

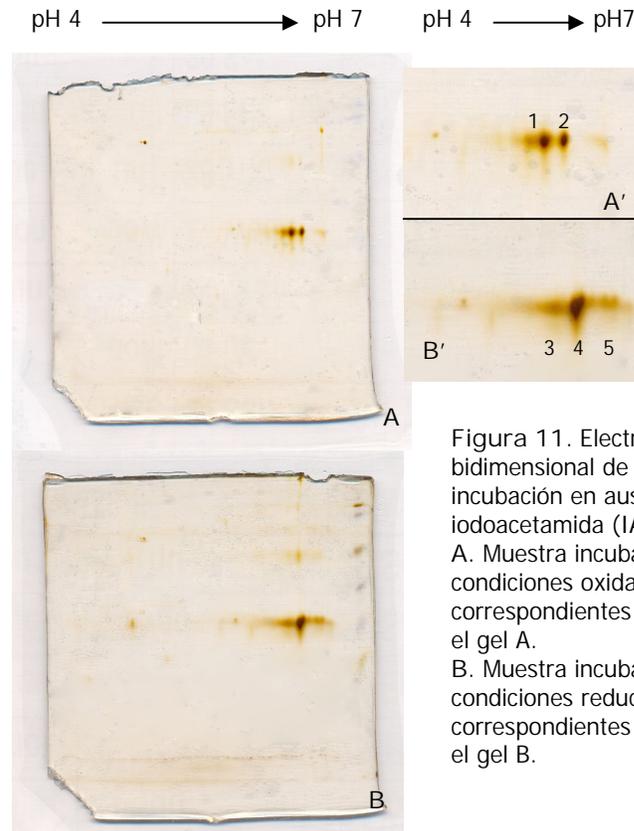


Figura 11. Electroforesis bidimensional de *TccTXNPx* con incubación en ausencia de iodoacetamida (IAA).
 A. Muestra incubada en condiciones oxidativas. A'. Spots correspondientes a la proteína en el gel A.
 B. Muestra incubada en condiciones reductoras B'. Spots correspondientes a la proteína en el gel B.

En el caso de la muestra incubada en ausencia de IAA, se observaron dos o tres spots de aproximadamente 26kDa en el gel correspondiente a la proteína incubada en condiciones reductoras (en este caso se observa un spot bien definido con "colas" a los lados; Figura 11). En los geles corridos con la muestra incubada en condiciones oxidativas, también pudieron distinguirse dos o tres spots en todas las ocasiones, también de tamaño aproximado de 26kDa (Figura 11).

Por superposición de imágenes con herramientas de informática (Adobe Photoshop), se confirmó que, para todos los casos, los spots presentes en el gel con la muestra oxidada presentan un corrimiento hacia la región más ácida del gel con respecto a los spots presentes en el gel con la muestra reducida.

El corrimiento de las proteínas hacia el extremo más ácido del rango de pH en el gel evidencia un pI más ácido como consecuencia de una ganancia de cargas negativas (las cargas negativas podrían reflejar la ganancia de átomos de oxígeno o deberse a alguna otra modificación que acidifique la proteína, esto debe ser confirmado por MS; ver sección 6.3).

Además confirmamos que, el spot más ácido del gel con la proteína en condiciones de reducción (Figura 11 B', Spot 3) coincide en posición con el spot más básico del gel con la proteína en condiciones de oxidación (Figura 11 A', Spot 2) (esto se confirmó para todos los casos), lo cual significa que su pI es igual y que estarían en igual estado de oxidación.

Estos resultados están de acuerdo con lo esperado. Esperábamos obtener un corrimiento de la proteína cuando la misma fuera incubada en condiciones oxidativas.

Por otra parte, el hecho de que se presente más de un spot en todos los casos, para la proteína incubada en condiciones oxidativas, podría estar indicando que, no toda la proteína fue oxidada durante el período de incubación (y uno de dichos spots corresponde a la proteína en su forma reducida), ó que, si bien toda la proteína fue oxidada lo que observamos son estados de oxidación diferentes.

En el caso de la proteína incubada en condiciones reductoras, la presencia de más de un spot, puede deberse a que parte de la proteína permaneció totalmente reducida, y parte de la misma, aun en condiciones reductoras, sufrió oxidación. Esto sugiere que aún cuando la proteína es incubada en condiciones reductoras, el proceso de oxidación de los tioles sigue ocurriendo (gracias a la presencia de O₂ en el medio).

De todos modos, otras modificaciones post-traduccionales como la oxidación de metioninas o la fosforilación de otros residuos, por ejemplo, también provocan la adición de cargas negativas, modificando la carga neta de las proteínas, su punto isoeléctrico y, por lo tanto, su movilidad electroforética.

Para poder afirmar que se trata de oxidaciones y descartar cualquier otro tipo de modificación post-traducciona, esta información debería ser confirmada por MS.

En este caso, al igual que ocurrió con los geles de purificación discutidos anteriormente (ver sección 6.1) pueden distinguirse spots a la altura de los 47 KDa en ambos geles, dos en el gel A y uno en el gel B (Figuras 12a y b), que corresponderían al dímero de la proteína.

En el caso de la Figura 12a, tomada de la figura 11, los spots son más tenues en el gel correspondiente a la muestra incubada en condiciones oxidativas, pero igualmente pueden ser visualizados.

La Figura 12 b corresponde a un gel de rango 4-7, en que se utilizó una gran cantidad de proteína (20 •g), por lo que no se visualiza un spot bien resuelto, sino más bien un manchón en la región donde este debería encontrarse. De todos modos, a la altura de los 47KDa pueden visualizarse spots más distinguibles que corresponderían al dímero de la proteína.

Esta observación permite afirmar que en condiciones de oxidación la proteína aún se encuentra formando dímeros.

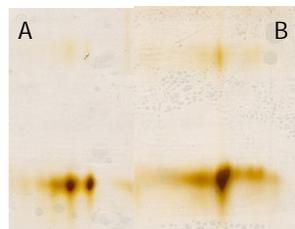


Figura 12a. Spots de 47 KDa de los geles A y B de la figura.

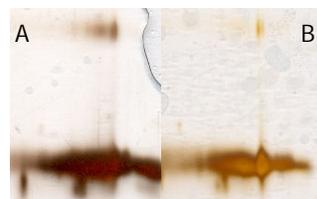


Figura 12b. Tomada de un gel con rango 4-7 donde se ven los spots de 47 KDa.

6.2.1.2. Incubación en presencia de iodoacetamida (IAA)

En el caso de la muestra incubada en presencia de IAA, se obtuvieron resultados comparables a los descritos anteriormente. Pudieron distinguirse dos spots en el gel con la proteína en condiciones de oxidación y uno o dos spots en el gel con la proteína en condiciones de reducción (en ambos casos los spots fueron del mismo tamaño) (Figura 13). En este caso también se observó un corrimiento de los spots hacia el extremo más ácido del rango de pH en el gel cuando la muestra fue incubada en condiciones oxidativas.

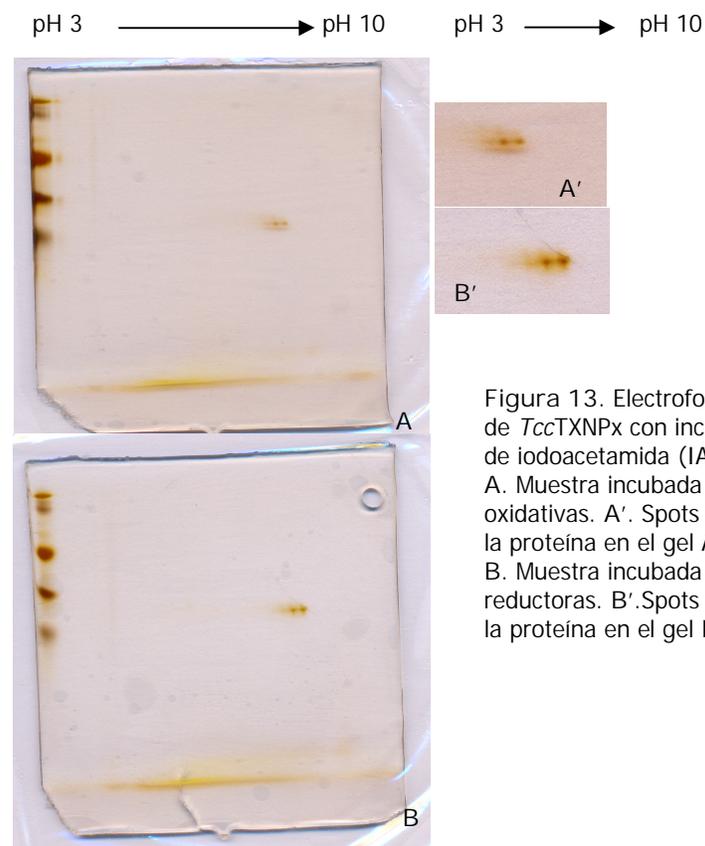


Figura 13. Electroforesis bidimensional de *TccTXNPx* con incubación en presencia de iodoacetamida (IAA).

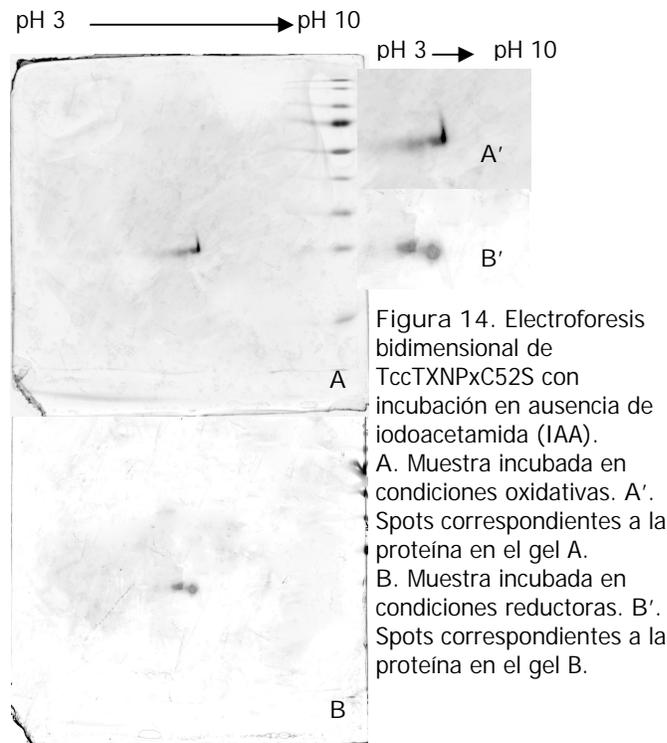
A. Muestra incubada en condiciones oxidativas. A'. Spots correspondientes a la proteína en el gel A.

B. Muestra incubada en condiciones reductoras. B'. Spots correspondientes a la proteína en el gel B.

El cambio en el pI de las proteínas podría ser producto de fosforilación y no oxidación, por lo tanto, la presencia de residuos de cisteína sobreoxidados debe ser confirmada por MS.

6.2.2. Análisis bidimensional de la proteína mutante *TccTXNPxC52S*

En el caso de los geles bidimensionales obtenidos con la proteína mutante *TccTXNPxC52S*, se distinguieron dos spots en ambos geles (proteína incubada en condiciones oxidativas y en condiciones reductoras) (Figura 14).



Siendo las cisteínas los residuos que, oxidados, forman los ácidos sulfénico (SOH), sulfínico (SO₂H) y sulfónico (SO₃H), esperaríamos que la proteína mutante *TccTXNPxC52S* (al tener el residuo de cisteína de alta reactividad de la posición 52 sustituido por un residuo de serina) presente una susceptibilidad menor a la sobreoxidación. Así, al presentar menor número de átomos de oxígeno, presentaría una carga negativa menor (que la que veríamos en el caso de la proteína en su estado salvaje) y, por lo tanto su pI no se vería tan disminuido.

En otras palabras, esperábamos que no existiera corrimiento de la proteína mutante hacia el extremo más ácido del rango de pH en el gel de electroforesis bidimensional.

Como puede verse en la figura 14, donde se muestran los geles bidimensionales de la proteína mutante, prácticamente no hay corrimiento de los spots.

El hecho de que la proteína no haya presentado corrimiento al ser incubada en condiciones de oxidación significa que, aún en presencia de exceso de peróxido, la proteína no se sobreoxidó. Entonces, podemos afirmar que la sustitución del residuo de C_p imposibilita la sobreoxidación de la proteína. La presencia de dos spots en ambos geles puede explicarse porque aún cuando la cisteína más reactiva no está disponible para oxidarse, existen otras modificaciones que pueden afectar el pI de la proteína, como ser la oxidación de otros residuos de Cisteína, Metionina o la fosforilación de otros residuos.

Lo importante en este caso es que la incubación con peróxido de hidrógeno no alteró el estado de la proteína ya que, ambos geles, en condiciones reductoras y oxidativas, presentan el mismo número de spots y en la misma posición.

De todas maneras, recurrimos al análisis por espectrometría de masa de los spots extraídos de este gel, para corroborar los resultados observados (ver sección 6.3.5.).

6.3. Estudio por espectrometría de masa de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina de las proteínas extraídas de los geles bidimensionales

6.3.1. Identificación de péptidos de la proteína salvaje *TccTXNPx*: Análisis por MALDI-TOF

Se extrajeron por escisión los spots obtenidos en uno de los ensayos de electroforesis bidimensional según la figura que se muestra a continuación:

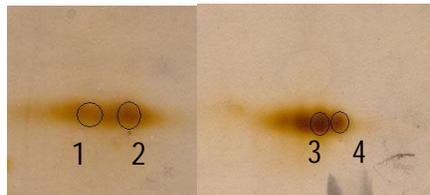


Figura 15. Geles bidimensionales de *TccTXNPx* incubada en condiciones reductoras y oxidativas (en ausencia de IAA). 1 y 2: spots obtenidos con la proteína en condiciones de oxidación; 3 y 4: spots obtenidos con la proteína en condiciones de reducción.

Se realizó la digestión con tripsina y el análisis por MALDI-TOF como se indica en Materiales y Métodos (ver sección 5) y se obtuvieron cuatro espectros, uno para cada spot (no se muestra la figura).

6.3.2. Resultados obtenidos del análisis de los espectros por MASCOT

El análisis en línea utilizando el programa MASCOT consiste en ofrecer una lista de masas peptídicas (provenientes de los espectros suministrados) y un análisis de coincidencias en las bases de datos, a los cuales les asigna un valor numérico o "score". Son significativos los scores mayores a 75, para los que puede descartarse que la coincidencia (entre el valor de masa obtenido experimentalmente y el que se encuentra en la base de datos) sea por azar.

Este análisis es utilizado para identificar las proteínas que forman los spots en un gel bidimensional a partir de las secuencias obtenidas por MS y su comparación con las secuencias que se encuentran en las bases de datos.

En nuestro caso, al estar trabajando con una proteína recombinante purificada, utilizamos esta herramienta solamente a modo de confirmación que los spots visualizados en los geles no eran producto de ninguna proteína contaminante.

A continuación se muestra el resultado para uno de los spots a modo de ilustración.

SPOT 1	gi17224953 Mass: 22246 Score: 87 Expect: 0.0043 Queries matched: 6
	tryparedoxin peroxidase [Trypanosoma cruzi]

Tabla 1. Resultado obtenido del análisis de uno de los spots por MASCOT. Se muestra la coincidencia con mayor score encontrada para el spot 1. En azul se encuentra el resumen de la búsqueda. Además se indican: la masa del péptido, el "score" y el número de coincidencias. Debajo se indica la proteína (y el organismo del cual proviene) que coincide con el péptido suministrado.

6.3.3. Digestión virtual de la proteína *TccTXNPx*

La digestión virtual de la proteína *TccTXNPx* (realizada bajo las condiciones indicadas en la parte 5.3.4) arrojó como resultado una serie de péptidos posibles. En la Tabla 2, se muestran aquellos que contienen las cisteínas de interés (C_P y C_R), con sus respectivas masas monoisotópicas y posibles modificaciones.

	m/z (mi)	Modificaciones	Inicio	Fin	Cortes salteados	Secuencia
1	1.537,7216		169	182	0	(K) HGEV C PANWKPGDK (T)
2	2.387,1601		162	182	1	(K)AFQFVEKHGEV C PANWKPGDK (T)
3	2.464,1748		169	190	1	(K)HGEV C PANWKPGDKTMKPDPEK (S)
4	2.480,1697	1Met-ox	169	190	1	(K)HGEV C PANWKPGDKTMKPDPEK(S)
5	3.104,4395		38	62	0	(K)WLVLFYPMDFTFV C PTEICQFSDR (V)
6	3.120,4344	1Met-ox	38	62	0	(K)WLVLFYPMDFTFV C PTEICQFSDR(V)
7	3.331,6029		38	64	1	(K)WLVLFYPMDFTFV C PTEICQFSDRVK (E)
8	3.347,5978	1Met-ox	38	64	1	(K)WLVLFYPMDFTFV C PTEICQFSDRVK(E)

Tabla 2. Péptidos que contienen las cisteínas de interés (C_{52} , indicadas en rojo y C_{173} , indicadas en verde) obtenidas por digestión virtual de la proteína *TccTXNPx* con tripsina. En la segunda columna se muestra la masa monoisotópica (mi); en la tercera columna las modificaciones en el péptido; en la cuarta y quinta columnas el sitio de inicio y el sitio de terminación del péptido en la secuencia de la proteína; a continuación el número de cortes salteados y, por último, la secuencia del péptido resultante.

Los péptidos obtenidos por digestión virtual se encuentran en tres rangos de masa diferentes: alrededor de las 1.530 unidades; entre las 2.380 y las 2.480 unidades; y entre las 3.100 y las 3.350 unidades.

Hicimos un acercamiento en dichas regiones en los espectros obtenidos, para buscar masas que coincidieran con los valores mostrados en la tabla y así identificar aquellos péptidos que contuvieran las cisteínas de interés.

6.3.4. Análisis de los espectros obtenidos por comparación con los péptidos resultantes de la digestión virtual con tripsina de la proteína.

Esta parte del estudio fue realizada para poder visualizar aquellos péptidos que llevaran las cisteínas peroxidática y resolutive, y posiblemente ver cambios en su valor m/z , por la adición de moléculas de oxígeno resultante del proceso de oxidación por peróxido de hidrógeno.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la digestión virtual de la proteína *TccTXNPx*, los péptidos que contienen cisteína deberían encontrarse en tres regiones en los espectros obtenidos del análisis por MS: alrededor de las 1.537 unidades; entre las 2.380 y las 2.481 unidades; y entre las 3.104 y las 3.348 unidades (Tabla 2, Sección 6.3.3).

Estudiando la región cercana a las 1.537 unidades y la región comprendida entre las 2.380 y las 2.481 unidades en los espectros, no se encontró ningún valor similar a los obtenidos de la digestión virtual para aquellos péptidos que llevan cisteína.

Se prosiguió al análisis de la región comprendida entre las 3.104 y las 3.348 unidades (Figuras 16A-D).

Espectros resultantes del análisis por MALDI-TOF

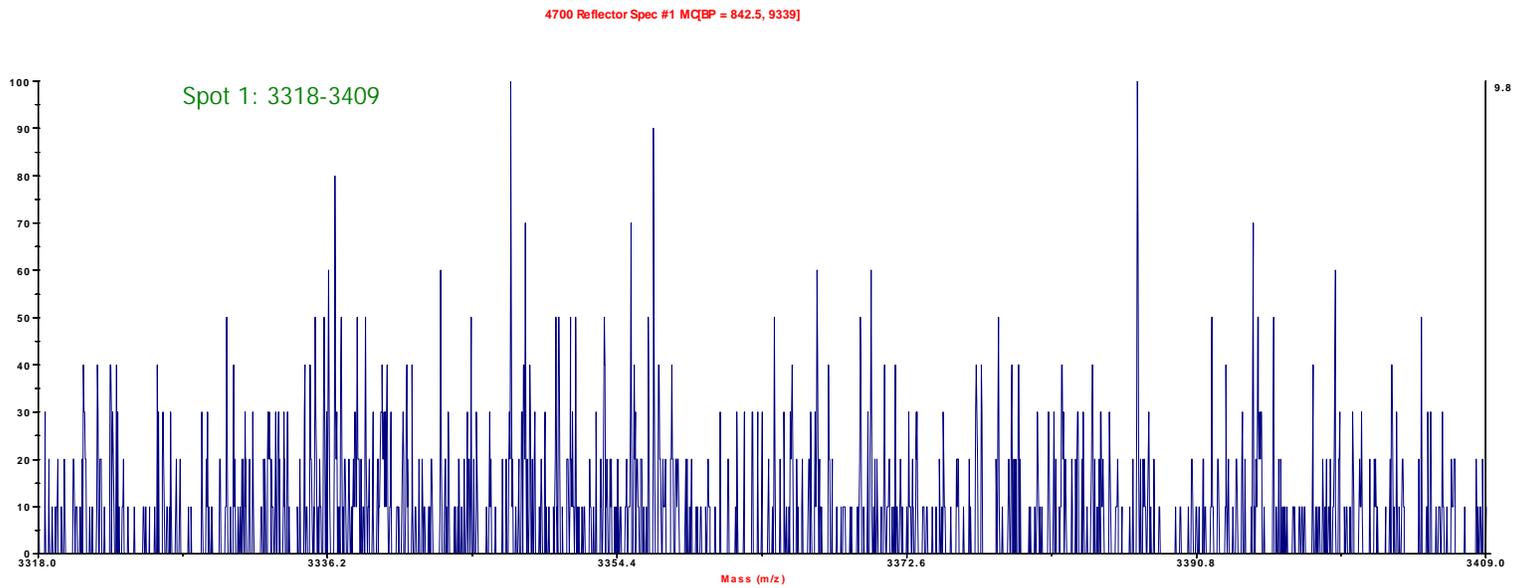


Figura 16 A Espectro en el rango 3318-3409 unidades (m/z) del spot número 1.

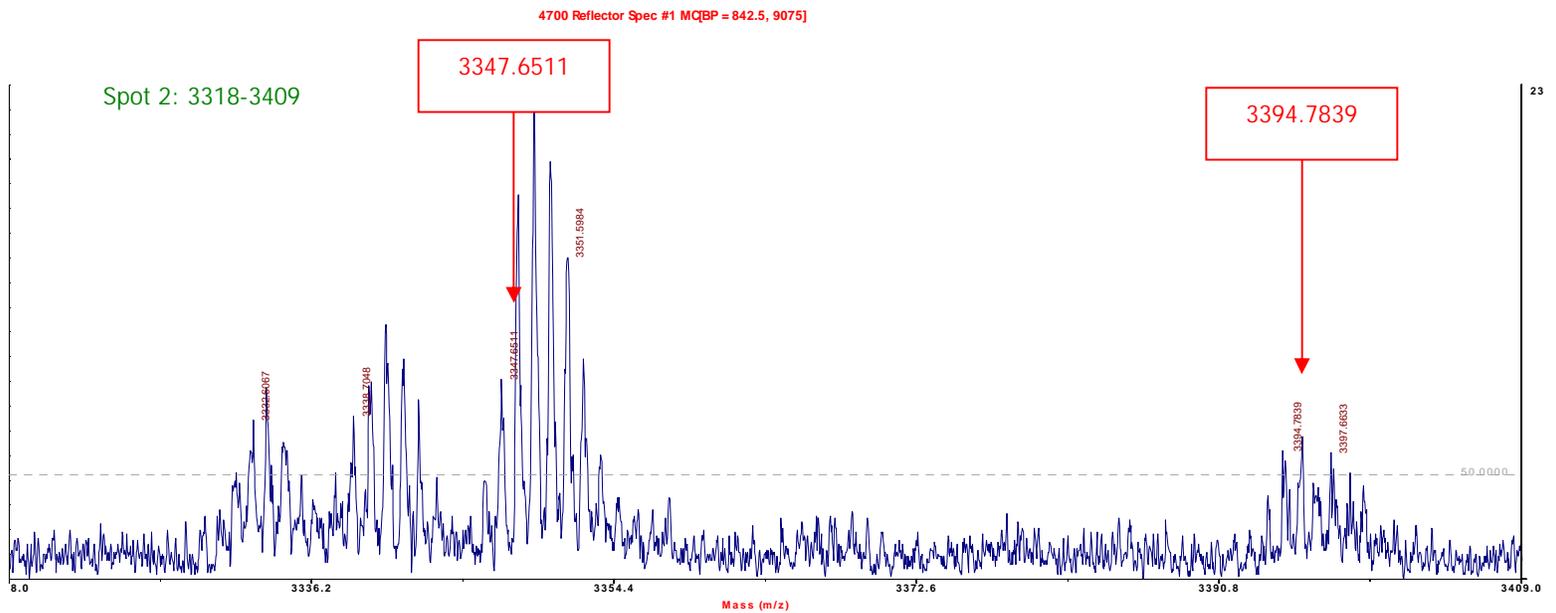


Figura 16 B. Espectro en el rango 3318-3409 unidades (m/z) del spot número 2.

Caracterización de la Triparredoxina Peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi* en condiciones de oxidación-reducción.

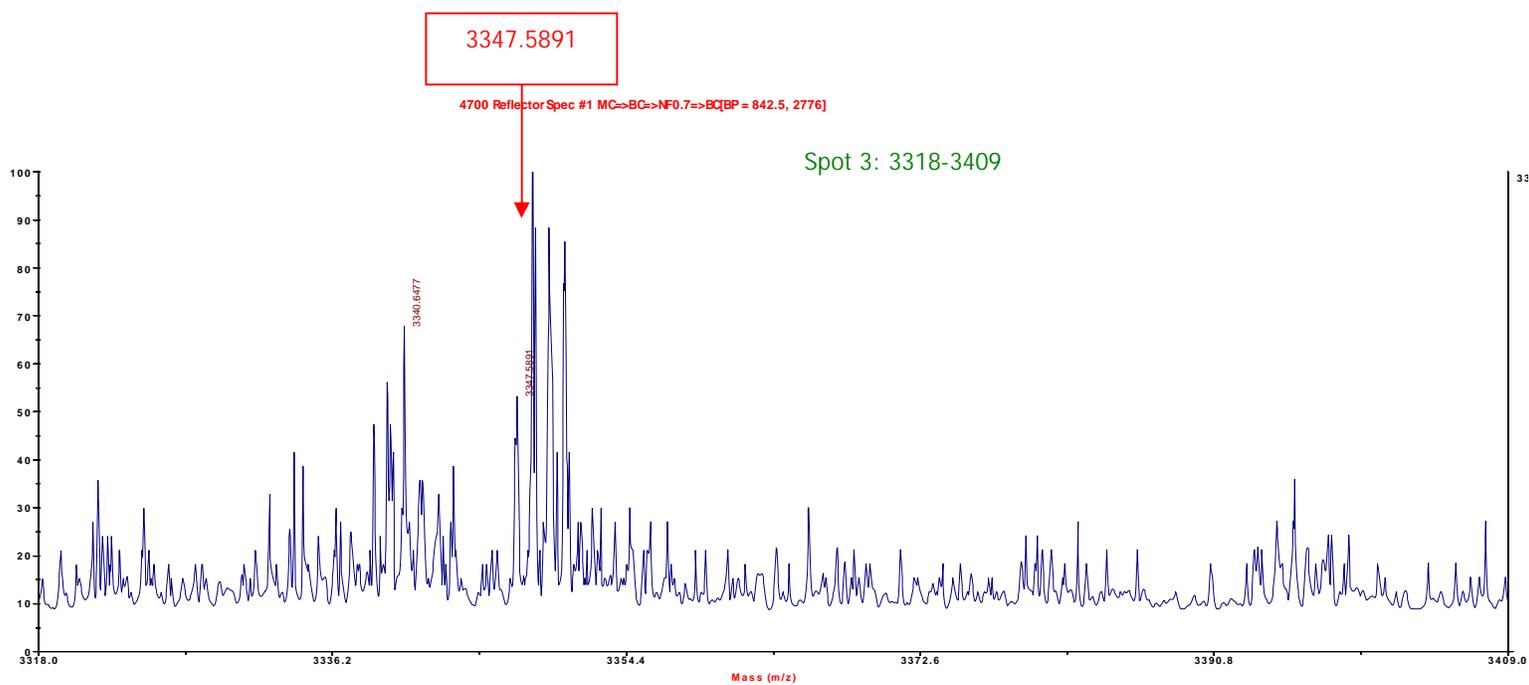


Figura 16 C. Espectro en el rango 3318-3409 unidades (m/z) del spot número 3.

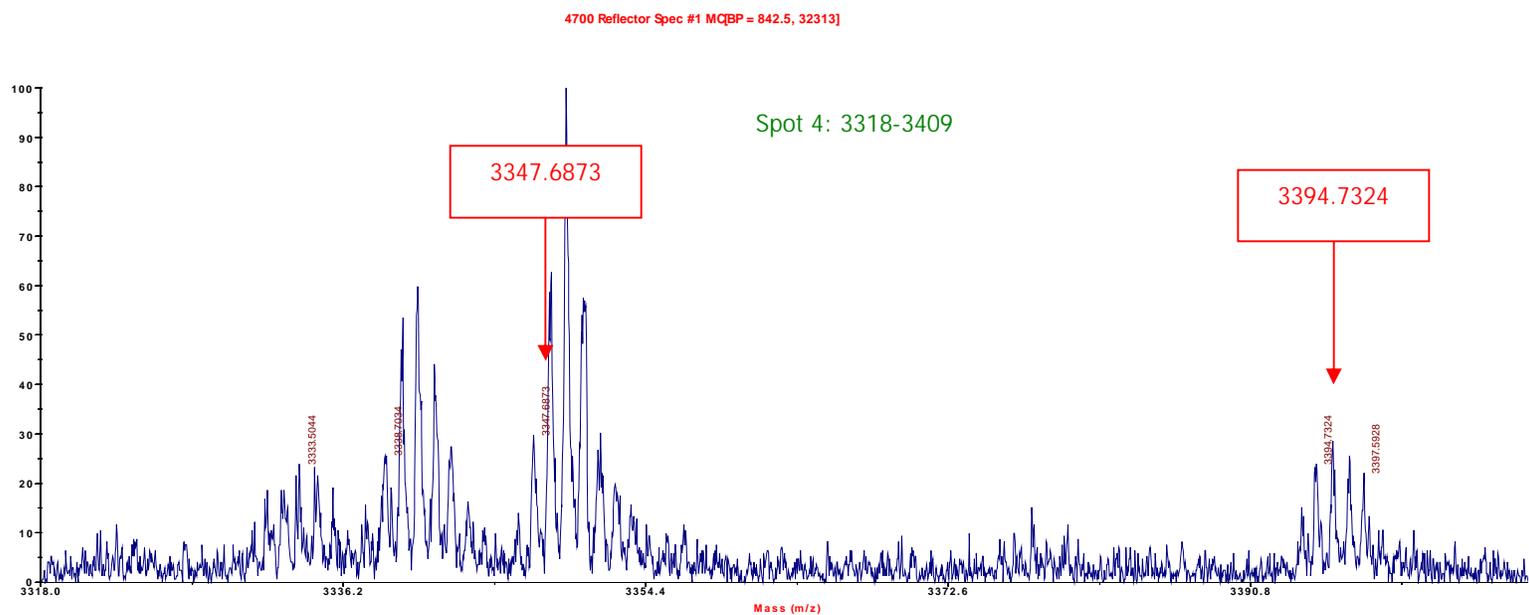


Figura 16 D. Espectro en el rango 3318-3409 unidades (m/z) del spot número 4.

Para la región 3.318-3.409 se confirmó que el análisis del spot 1 no arrojó resultados analizables, ya que dio como resultado un espectro con muy baja resolución y mucho ruido de fondo.

En cambio, los espectros obtenidos de los análisis de los spots 2, 3 y 4 presentaron mayor resolución y permitieron un análisis exhaustivo. (Figuras 16B-D).

En los espectros correspondientes a los spots 2, 3 y 4 se identificaron péptidos de valor de m/z de aproximadamente 3.347,5978 unidades (péptido señalado en rojo en la Tabla 2 y marcado con una flecha y su correspondiente valor m/z en cada uno de los espectros, Figuras 16B-C). Dichos péptidos, según los resultados de la digestión virtual con tripsina de la proteína, contendrían la cisteína peroxidática en estado reducido.

Además, en los espectros correspondientes a los spots dos y cuatro, encontramos otro pico (indicado en las figuras 16B y D) separado del anterior por 47 unidades m/z .

Siguiendo el razonamiento planteado por [Rabilloud, T., et al., 2002](#), y analizando los valores m/z , podríamos decir que ese péptido sería el péptido 3.347,5978, con una metionina oxidada y un corte salteado, y tres átomos de oxígeno adicionales (cada átomo de oxígeno tiene un valor adicional de 16 unidades, por lo que tres átomos de oxígeno sumarían 48 unidades m/z).

Ya que los péptidos que contienen la C_p contienen otros residuos de cisteína y de metionina que pueden ser oxidados, estos resultados no nos permiten realizar ninguna afirmación, pero podrían estar indicando que en el spot 3 encontramos la C_p en su estado reducido y, tanto en el spot 2 como en el 4, encontramos la C_p en sus estados reducido y sobreoxidado (oxidación a ácido sulfónico, SO_2H).

Esto sugeriría que Triparredoxina Peroxidasa citosólica (peroxirredoxina de 2-Cys) sí puede ser sobreoxidada a ácido sulfónico en condiciones in vitro y no necesariamente en presencia de todos los integrantes del ciclo catalítico in vivo, contrariamente a lo planteado por [Yang, K-S., et al., 2002](#) para la peroxirredoxina humana I (Prx I).

Estos resultados obtenidos podrían esperarse para el caso del spot 2 (ya que corresponde a la muestra incubada en condiciones oxidativas), pero es contrario a lo que esperaríamos para el spot 4 (muestra incubada en condiciones reductoras).

A partir de estos resultados, podríamos decir que, a pesar de no adicionar H_2O_2 al medio de incubación, no es posible mantener la muestra en condiciones de reducción absolutas.

Para el caso del spot 1, donde esperábamos encontrar los tioles en su estado de oxidación máximo (tiol en su estado sobreoxidado), no logramos obtener un espectro interpretable. Esto puede deberse a que la cantidad de proteína presente en el spot 1 no fuera suficiente, además de la dificultad de volatilizar péptidos que contienen residuos de cisteína, que se ve agravada cuando estos presentan cargas negativas adicionales por oxidación.

6.3.5. Estudios de espectrometría de masas para identificar cisteínas reducidas en la proteína salvaje y el estado de las cisteínas en la proteína mutante C52S luego de la incubación con peróxido de hidrógeno.

Para identificar aquellas cisteínas, de la proteína salvaje, que permanecieran en un estado reducido aún luego de su incubación con peróxido de hidrógeno se adicionó una etapa de incubación con iodoacetamida previo al isoelectroenfoque. La iodoacetamida se uniría a aquellas cisteínas que aún se encontraran reducidas, alquilándolas, e impidiendo así su oxidación durante el isoelectroenfoque.

En esta etapa se procuró identificar, por espectrometría de masas, aquellas cisteínas que estuvieran alquiladas, las cuales representarían residuos que se encontraban reducidos aún luego de la incubación.

El procedimiento realizado con la proteína mutante C52S, fue el mismo que el llevado a cabo con la proteína salvaje (ver sección 5.2); se incubó en medios reductor y oxidativo, se realizó el isoelectroenfoque y la segunda dimensión fue resuelta en un gel de poliacrilamida. Luego se procedió al análisis de los péptidos obtenidos del gel mediante MS (ver sección 5.3).

Ambos estudios apuntaban a detectar, mediante espectrometría de masas, cambios en los péptidos que contienen residuos de cisteína. La imposibilidad de volatilizar y detectar dichos péptidos, por su gran tamaño y peso nos impidió extraer conclusiones de este experimento.

Una alternativa a los ensayos realizados sería digerir los péptidos obtenidos del gel con una proteína diferente a la tripsina. Por ejemplo la enzima AspN (peptidil-Asp metaloendopeptidasa de *Pseudomonas fragi*, Roche). Esta enzima, utilizada por [Wagner, E., et al, 2002](#), es una metaloproteasa que hidroliza enlaces peptídicos del lado amino del ácido aspártico (Asp), pero además también es susceptible a la sobreoxidación de las cisteínas, introduciendo un sitio de corte en el lado amino de una cisteína sobreoxidada.

Utilizando esta enzima no solo identificaríamos los puntos de sobreoxidación en la proteína sino que, obtendríamos péptidos más cortos, de menor peso molecular que, por lo tanto, serían más fáciles de volatilizar e identificar por espectrometría de masa.

6.4. Inmunodetección del estado de oxidación de la cisteína peroxidática en *TccTXNPx* por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-PrxSO₂H

Se incubaron 5 •g de la proteína *TccTXNPx* purificada en buffer HEPES con 1mM de DTT y concentraciones variables de peróxido de hidrógeno (0mM, 0,5mM y 2mM) durante 20 minutos (ver sección 5.4).

Luego a las muestras se les agregó buffer de carga y se sembraron en dos geles de poliacrilamida al 12% en el siguiente orden: proteína incubada en DTT 1mM; proteína incubada en H₂O₂ 0.5mM y DTT 1mM; proteína incubada en H₂O₂ 2mM y DTT 1mM.

Tras la corrida electroforética, ambos geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante el método de transferencia húmeda (ver Sección 5.4.1).

Posteriormente, una de las membranas fue incubada con anticuerpo anti-*cTXNPx*, para corroborar que la cantidad de proteína en todos los carriles fuera la misma. En esta membrana esperamos encontrar bandas de igual intensidad en todos los carriles sembrados, ya que el anticuerpo reconoce la proteína, independientemente de su estado de oxidación.

La segunda membrana fue incubada con un anticuerpo anti-PrxSO₂H (anti sulfínico), con el objetivo de identificar las especies producidas durante la oxidación de la muestra (confirmar la formación de ácido sulfínico). Para el caso de esta membrana esperaríamos encontrar bandas de intensidad creciente a medida que aumenta la concentración de H₂O₂ utilizada durante la incubación, y ausencia de banda en el caso en que la proteína fue incubada solamente en presencia de DTT.

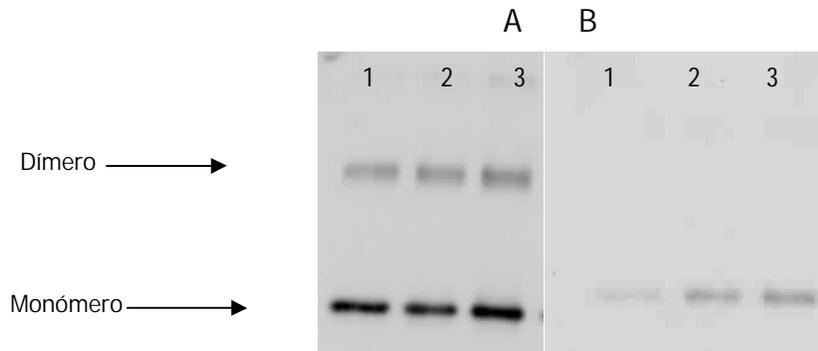


Figura 17. Ensayos de Western Blot.
 A. TccTXNPx incubada con anticuerpo anti- cTXNPx.
 B. TccTXNPx incubada con anticuerpo anti-PrxSO₂H.
 Carriles: 1. cTXNPx incubada con DTT 1mM 2. cTXNPx incubada con H₂O₂ 0.5mM y DTT 1mM 3. cTXNPx incubada con H₂O₂ 2mM y DTT 1mM

En la membrana A, Figura 17 reconocemos bandas de dos tamaños diferentes. Las superiores tienen un tamaño aproximado de 45kDa, y las inferiores un tamaño aproximado de 25kDa (igual que como se observó en los ensayos de purificación y electroforesis bidimensional).

Las bandas encontradas no son de igual intensidad en todos los carriles sembrados; las bandas de los carriles 1 y 2 son de intensidad comparable, mientras que la banda correspondiente al carril número 3, parece ser un poco más intensa. Esto podría estar indicando que la cantidad de proteína sembrada fue un poco mayor en comparación con los otros carriles.

Identificamos las bandas superiores (45kDa), mas tenues, como las correspondientes al dímero de la proteína, y las inferiores (25kDa), más intensas, como las correspondientes al monómero de la proteína.

Las bandas correspondientes al dímero, se muestran con menor intensidad probablemente porque en las condiciones desnaturalizantes y reductoras en que se corrió el gel, habría menor cantidad de dímero que de monómero.

En el caso de la membrana B, en la cual la muestra fue incubada con un anticuerpo anti-PrxSO₂H, se distingue una banda de 25KDa en cada carril sembrado. Estas, además, van aumentando en intensidad, siendo la banda del carril 3, que corresponde a la proteína incubada con H₂O₂ 2mM, la de mayor intensidad.

En el carril 1 la muestra fue incubada sin peróxido de hidrógeno, por tanto no esperábamos ver una banda reconocida por el anticuerpo anti- PrxSO₂H. Una vez más estaríamos confirmando que la oxidación de la muestra puede darse por la simple presencia de reactivos oxidantes en el medio y que no es posible mantenerla en condiciones de reducción absoluta.

Los resultados confirman que, la oxidación del tiol de la C_p a ácido sulfinico es mayor a medida que aumenta la concentración de H₂O₂ en el medio de incubación de la proteína.

No se distingue una banda a la altura que correspondería al dímero (aproximadamente 45kDa). Esto puede deberse a que, en esa conformación los epitopos reconocidos por el anticuerpo no estén expuestos al solvente y, por lo tanto, no sean accesibles; o porque la cantidad de dímero es tan pequeña que, con la sensibilidad del método, no es suficiente como para que distingamos una banda en el gel.

Una explicación alternativa a las propuestas es que, simplemente, los dímeros no sufran sobreoxidación. Esta es una posibilidad ya que, al estar en su conformación de dímeros, las cisteínas se encontrarían formando puentes disulfuro y, por lo tanto, no estarían disponibles para sobreoxidarse.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se expresaron y purificaron las enzimas *TccTXNPx* y *TccTXNPxC52S*, que luego fueron caracterizadas mediante herramientas propias de la proteómica.

A partir del análisis bidimensional de las proteínas, podemos concluir que, mientras que la proteína salvaje muestra una clara capacidad de sobreoxidación al ser incubada en un medio con exceso de peróxido de hidrógeno, la proteína mutante *TccTXNPxC52S* (que carece del residuo de cisteína peroxidático) es incapaz de sobreoxidarse. Este sería un claro indicativo de que el residuo de cisteína en la posición 52 es imprescindible para la sobreoxidación de la proteína en las condiciones ensayadas.

El análisis por espectrometría de masa probó ser una técnica de alta complejidad, debido a que los péptidos de interés en este estudio son difíciles de volatilizar por la presencia de residuos de cisteína modificados. De todos modos pudimos obtener resultados valiosos a partir de este estudio que sugieren la adición de átomos de oxígeno en las cisteínas de interés aunque esto no pudo ser confirmado debido a la imposibilidad de obtener una buena fragmentación de los péptidos.

Finalmente se confirmó por western blot utilizando un anticuerpo específico, la sobreoxidación del residuo de cisteína a ácido sulfónico (SO_2H) al incubar la proteína salvaje en presencia de concentraciones de peróxido de hidrógeno tan bajas como 0.5 mM. También, en el western blot (Figura 17), quedó demostrada la formación de dímeros de la proteína.

Contrariamente a lo publicado por [Yang, K-S., et al., 2002](#) respecto a la peroxirredoxina humana I, demostramos que la Triparredoxina Peroxidasa citosólica de *T. cruzi* puede ser sobreoxidada a ácido sulfónico en condiciones in vitro, lo cual es importante para el estudio del ciclo de oxidación-reducción de la misma.

Como perspectivas futuras de este trabajo nos planteamos la caracterización proteómica de la triparredoxina peroxidada en condiciones "in vivo", utilizando cultivos de parásitos incubados en presencia de peróxido de hidrógeno y otros agentes oxidantes.

Para la identificación de cisteínas modificadas por espectrometría de masa, nos planteamos la utilización de una enzima diferente a la tripsina para la digestión de los péptidos obtenidos del gel como, por ejemplo, la enzima AspN de *Pseudomonas fragi*, que al ser susceptible a la sobreoxidación de las cisteínas, podría facilitar la obtención de resultados nuevos y, tal vez, más concluyentes para este análisis.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi madre, por darme siempre todo, apoyarme en todos mis emprendimientos y por presionarme cuando lo necesitaba, aunque a veces un poquito más de lo necesario, pero bueno...gracias Ma!

A mi tío y mi abuela, por su apoyo; y a mi abuelo, que aunque ya no está, me enseñó muchísimas cosas y se que se sentiría orgulloso de este logro.

Un agradecimiento especial a mi novio, Nicolás, también por su apoyo incondicional, por enseñarme millones de cosas y por estar siempre ahí cuando lo necesité y cuando no, también. Por amarme, darme confianza y hacerme sentir que los límites no existen y por tener fuentes inagotables de paciencia. Gracias mi amor!

A mis amigas, que mas que amigas son hermanas, por estar en las buenas y en las malas, por darme su apoyo y por tener siempre las palabras justas.

Quisiera agradecerle profundamente a Adriana, mi tutora en esta pasantía, por darme la oportunidad de trabajar junto a ella, por haberme enseñado todo lo que se, porque fue un verdadero placer trabajar a su lado y, sobre todo, por su paciencia sin fin. Adriana, muchas gracias! Espero que sigamos trabajando juntas mucho tiempo!

También quisiera agradecer a las chicas de la UBM, Gabriela, María Laura y Talia, por hacer más divertidas las horas de trabajo, por brindarme su amistad y por haberme dado una mano siempre que lo necesité. Y espero seguir trabajando por mucho tiempo con ustedes también!

A todos los compañeros del Pasteur que siempre me hicieron sentir como en casa. Gracias a Malón por permitirme hacer uso de sus instalaciones e invitarme a la SUB donde pudimos presentar un poster junto con Talia!

Gracias a Dolores por prestarme la imagen de la enzima para usar en la carátula de este trabajo.

Gracias a Madelón por su ayuda en la parte de espectrometría de masa y por enseñarme algo de todo lo que sabe.

A todos los amigos que conocí durante mi carrera, por hacer más llevaderas tantas interminables sesiones de estudio. A todos, gracias!

Y a tanta otra gente que no nombré, pero que me ayudaron a hacer que esto fuera una realidad.

Muchas gracias!

Monica

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, L., Gallagher, S.R., (2004). *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 67. 10.4, 1-23.
- Aitken, A., Learmonth M., *Protein Determination by UV absorption*. In *The protein protocols handbook*, J. Walker, 1996, p. 1-3. Editor: Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Ariyanayagam, M.R., Oza, S.L., Guther, M.L., Fairlamb, A.H. (2005). *Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome*. *Biochem J.*,391:425-432.
- Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., (2003). *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin*. *Nature*, 425, 980-984.
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Budanov, A., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M. (2004). *Regeneration of Peroxiredoxins by p53-Regulated Sestrins, Homologues of Bacterial AhpD*. *Science*, 304, 596-600.
- Carr, S. A., Annan, R. S. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*, 10.21, 1-27.
- Castro, H., Tomás, A.M. (2008). *Peroxidases of Trypanosomatids*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1-14.
- Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T. (2003). *Regeneration of Peroxiredoxins during Recovery after Oxidative Stress*. *J. Biol. Chem.* 278 (39), 37146-37146.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Boia, M.N., Fernandes, O., Bonfante, C., Campos, J.E., Santos, L., Devera, R. (2002). *Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. A new cross-sectional study*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 44 (3): 159-165.
- El-Sayed, N.M., et al., (2005). *The genome Sequence of Trypanosoma cruzi, Etiologic Agent of Chagas Disease*. *Science*, 309, 409-415.
- Flohé, L., Hecht, H.J., Steinert, P., (1999). *Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism*. *Free Radic. Biol. Med.* 27 (9-10), 966-984.
- Flohé, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., Hecht, H.J., (2002). *Tryparedoxin peroxidase of Leishmania donovani: molecular*

cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. Arch. Biochem. Biophys. 397 (2), 324–335.

- Georgiou, G., Masip, L., (2003). *An Overoxidation Journey with a Return Ticket.* Science, 300, 592-594.
- Giulivi, C., Turrens, J.F., Boveris, A., (1988). *Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in Trypanosoma cruzi.* Mol. Biochem. Parasitol. 30, 243-252.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000). *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.* Electrophoresis 21, 1037-1053.
- Guerrero, S.A., Lopez, J.A., Steinert, P., Montemartini, M., Kalisz, H.M., Colli, W., Singh, M., Alves, M.J., Flohé, L., (2000). *His-tagged tryparedoxin peroxidase of Trypanosoma cruzi as a tool for drug screening.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 53 (4), 410-414.
- Hall, B.F., Joiner, K.A. (1993). *Developmentally-regulated virulence factors of Trypanosoma cruzi and their relationship to evasion of host defenses.* J. Eukaryot. Microbiol. 40(2): 207-213.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., Flohé, L. (2002). *Peroxiredoxins.* Biol. Chem. 383, 347-364.
- Jacob, C., Holme, A.L., Fry, F.H. (2004). *The sulfinic acid switch in proteins.* Org. Biomol. Chem. 2, 1953-1956.
- Jönsson, T.J., Lowther, W.T. (2007). *The Peroxiredoxin Repair Proteins.* Subcell Biochem. 44: 115-141.
- Krauth-Siegel, R.L., Comini, M.A. (2008). *Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism.* Biochimica et Biophysica Acta, 1780, 1236-1248.
- Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M.R., Fairlamb, A.H., Krauth-Siegel, R.L., Clayton, C. (2000). *Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress.* Mol. Microbiol. 35(3): 542-552.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227: 680-685.

- Moncayo, A. (2003). *Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98, 577-591.
- Montemartini, M., Kalisz, H.M., Hecht, H.J., Steinert, P., Flohé, L. (1999). *Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type tryparedoxin peroxidase of *Crithidia fasciculata**. Eur. J. Biochem. 264 (2), 516-524.
- Müller, S., Liebau, E., Walter, R.D., Krauth-Siegel, R.L. (2003). *Thiol-Based redox metabolism of protozoan parasites*. Trends in Parasitology. 19, 320-328.
- Organización Mundial de la Salud, 27 de Noviembre de 2008. *Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de la Secretaría*. CONSEJO EJECUTIVO EB124/17.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R., Radi, R. (2008). *Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage – and endogenously – derived peroxynitrite*. Biochem. J. 410(2): 359-368.
- Piñeyro, M.D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., Robello, C. (2008). *Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?* Gene 408, 45–50.
- Piñeyro, M.D., Pizarro, J.C., Lema, F., Pristch, O., Cayota, A., Bentley, G.A., Robello, C. (2005). *Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi**. J. Struct. Biol. 150 11-22.
- Poole, L.B., Nelson, K.J. (2008). *Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation*. Curr. Opin. Chem. Bio.12(1)18-24.
- Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., Lunardi, J. (2002). *Proteomics Analysis of Cellular Response to Oxidative Stress*. J. Biol. Chem. 277 (22), 19396-19401.
- Turrens, J.F. (2004). *Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa*. Mol. Asp. of Med. 25, 211-220.
- Tyler, K.M., Engman, D.M. (2001). *The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited*. International Journal of Parasitology. 31, 472-481.
- Urbina, J.A., Docampo, R., (2003). *Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances*. Trends Parasitol. 19, 495-501.

-
- Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R.L., Chauvière, G., Bakalara, N., Périé, J. (1999). *Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles*. *Biochem. Pharmacol.* 57 (5): 549-557.
 - Wagner, E., Luche, S., Penna, L., Chevallet, M., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T. (2002). *A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress*. *Biochem. J.*, 366, 775-785.
 - Wilkinson, S.R., Horn, D., Prathalingam, S.R., Kelly, J.M. (2003). *RNA Interference Identifies Two Hydroperoxide Metabolizing Enzymes That Are Essential to the Bloodstream Form of the African Trypanosome*. *JBC*, 278, 31640-31646.
 - Wilkinson, S.R., Kelly, J.M. (2003). *The Role of Glutathione Peroxidase in Trypanosomatids*. *Biol. Chem.* 384, 517-525.
 - Wilkinson, S.R., Meyer, D.J., Taylor, M.C., Bromley, E.V., Miles, M.A., Kelly, J.M. (2002). *The Trypanosoma cruzi Enzyme TcGPXI Is a Glycosomal Peroxidase and Can Be Linked to Trypanothione Reduction by Glutathione or Tryparedoxin*. *J. Biol. Chem.*, 277 (19). 17062-17071.
 - Wilkinson, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, A., Kelly, J.M. (2000). *Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 275 (11). 8220–8225.
 - WHO-World Health Organization (2002). *Control of Chagas disease*, WHO: Technical Report Series 2002, 905: 82.
 - Woo, H.A., Chae, H.Z., Hwang, S.C., Yang, K.S., Kang, S.W., Kim, K., Rhee, S.G. (2003). *Reversing the Inactivation of Peroxiredoxins Caused by Cysteine Acid Formation*. *Science*, 300, 653-656.
 - Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003). *Structure, mechanisms and regulation of peroxiredoxins*. *Trends in Biochemical Sciences*. 28 (1), 32-40.
 - Yang, K-S., Kang, S.W., Woo, H.A., Hwang, S.C., Chae, H.Z., Kim, K., Rhee, S.G. (2002). *Inactivation of Human Peroxiredoxin I during Catalysis as the Result of the Oxidation of the Catalytic Site Cysteine to Cysteine-sulfinic Acid*. *J. Biol. Chem.* 277 (41), 38029-38036.

Otros materiales consultados:

1. Centers for Disease Control and Prevention
<http://www.cdc.gov/chagas/sp/enfermedad.html>
2. GPMaw (General Protein/Mass Analysis for Windows)
(<http://www.gpmaw.com>)
3. HiTrap affinity columns. Instructions. Amersham Pharmacia Biotech.
4. Mascot
(<http://www.matrixscience.com>)
5. Presidencia de la República Oriental del Uruguay
(http://www.presidencia.gub.uy/_web/noticias/2007/08/2007080103.htm)
6. *The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xtagged proteins.* Fifth Edition, June 2003.
(<http://www1.qiagen.com/>)