



Desarrollo de método de captura de proteínas glutacioniladas

Tesina de Grado – Licenciatura en Bioquímica

Florencia Orrico

Orientador: Dr. Matías Möller

Co-orientadora: Dra. Leonor Thomson

**Laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Montevideo, 2017**

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Matías y Leonor.

A todos mis compañeros de los laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica.

A mis amigos de la facultad, y mis amigas de toda la vida.

A mi familia y a mi novio, Matías.

¡Gracias!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	6
1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Generalidades de glóbulos rojos	9
2.1.1. Hemoglobina	10
2.2. Especies reactivas y estrés oxidativo	12
2.2.1. Superóxido.....	12
2.2.2. Peróxido de Hidrógeno.....	14
2.2.3. Radical hidroxilo	15
2.2.4. Óxido nítrico y peroxinitrito	15
2.3. Sistemas antioxidantes en glóbulos rojos.....	17
2.3.1. Antioxidantes enzimáticos	17
2.3.1.1. Superóxido dismutasa	17
2.3.1.2. Glutación peroxidasa	18
2.3.1.3. Peroxirredoxinas	20
2.3.1.4. Catalasa	21
2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos	23
2.3.2.1. Vitaminas.....	23
2.3.2.2. Glutación.....	24
2.4. Daño molecular.....	25
2.5. Glutacionilación de proteínas	26
2.5.1. Glutacionilación de hemoglobina	29
2.5.2. Glutación S-transferasa	30
2.6. Hipótesis	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo general.....	34

3.2.	Objetivos específicos	34
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1.	Reactivos y equipos	35
4.2.	Obtención de muestras.....	35
4.3.	Purificación de hemoglobina	36
4.4.	Glutacionilación de proteínas	36
4.5.	Determinación de GSH por mBrB	37
4.6.	Control de calidad de proteínas.....	38
4.6.1.	Cuantificación de GST de <i>E. granulosus</i>	38
4.6.2.	Determinación de actividad enzimática de GST.....	39
4.6.3.	Electroforesis	39
4.7.	Captura por IMAC-Sefarosa	40
4.7.1.	Análisis de eficiencia.....	40
4.8.	Captura por sefarosa activada con CNBr	41
4.8.1.	Análisis de eficiencia.....	41
4.9.	Preparación de GST biotinilada de <i>Schistosoma japonicum</i>	42
4.9.1.	Purificación de GST de <i>S. japonicum</i>	42
4.9.2.	Biotinilación de GST.....	43
4.10.	Dot blot con GST biotinilada	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1.	Determinación de GSH por mBrB	46
5.2.	Control de calidad de proteínas.....	48
5.2.1.	Cuantificación de glutatión S-transferasa	48
5.2.2.	Determinación de actividad enzimática de GST.....	49
5.2.3.	Electroforesis	50
5.3.	Captura por IMAC-Sefarosa	51
5.4.	Captura por sefarosa activada con CNBr	56
5.5.	Preparación de GST biotinilada de <i>Schistosoma japonicum</i>	58
5.5.1.	Purificación de GST de <i>S. japonicum</i>	58

5.5.2. Biotinilación de GST.....	59
5.6. Dot blot con GST biotinilada	60
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	62
7. ANEXO.....	64
8. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CDNB	clorodinitrobencono
DTPA	ácido dietilentriaminopentaacético
DTT	ditiotreitól
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
Grx	glutarredoxina
GSH	glutación
GSSG	glutación disulfuro
GST	glutación S-transferasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
Hb-SG	hemoglobina glutacionilada
HO [•]	radical hidroxilo
HSA	albúmina sérica humana
HSA-SG	albúmina sérica humana glutacionilada
mBrB	monobromobimano
metHb	metahemoglobina
MPM	marcador de peso molecular
NHS	N-hidroxisuccinimida
•NO	óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	radical superóxido

oxiHb	oxihemoglobina
Prx	peroxirredoxina
ROS	especies reactivas del oxígeno
SOD	superóxido dismutasa
TR	tiorredoxina reductasa
Trx	tiorredoxina
βME	β-mercaptoetanol

1. RESUMEN

La glutationilación es una modificación post-traducciona que se da en las proteínas con tioles libres, principalmente como resultado del estrés oxidativo. Se ha observado un aumento en los niveles de proteínas glutationiladas en varias condiciones patológicas caracterizadas por desregulaciones redox (enfermedades cardiovasculares, pulmonares, inflamatorias, neurodegenerativas y cáncer), y en particular durante el proceso de envejecimiento. Resulta entonces relevante identificar las proteínas que sufren esta modificación y establecer su rol en la patología. Sin embargo, hasta el momento no existen métodos selectivos para capturar proteínas glutationiladas intactas con un procedimiento simple y fácilmente accesible.

En el presente trabajo se buscó capturar y detectar proteínas glutationiladas por medio de la enzima glutatión S-transferasa (GST), teniendo en cuenta que esta se utiliza normalmente como módulo en proteínas de fusión recombinantes para facilitar la purificación usando columnas con glutatión inmovilizado. Se realizaron ensayos de captura de albúmina y hemoglobina glutationiladas con GST de *Echinococcus granulosus* anclada a distintas resinas de sefarosa, obteniéndose en todos los casos resultados negativos. Un ensayo alternativo se realizó en forma de dot blot, empleándose como sonda de detección GST de *Schistosoma japonicum* biotinilada. Se observó una señal positiva de la GST con la hemoglobina glutationilada, pero no con el control. Si bien el objetivo inicial era muy ambicioso, se llegó a resultados preliminares interesantes que podrían ser explorados en mayor profundidad en otra etapa.

2. INTRODUCCIÓN

El disparador de este proyecto fue un trabajo recientemente realizado por el grupo de investigación, que involucró el análisis de proteínas glutationiladas del glóbulo rojo en el marco del estudio de cambios redox a nivel de los sulfhidrilos intracelulares y su correlación con las lesiones por almacenamiento en los concentrados de glóbulos rojos para transfusión [1]. En dicho trabajo se utilizó a la enzima glutatió S-transferasa (GST) de *Echinococcus granulosus* recombinante para aislar las proteínas glutationiladas mediante cromatografía de afinidad “en batch”, y se logró capturar mayoritariamente a la hemoglobina y en menor proporción a la albúmina sérica humana (HSA). Dados estos resultados, se planteó validar este método con sus controles pertinentes, teniendo en cuenta que no existen en la literatura métodos selectivos para capturar proteínas glutationiladas intactas sin reducir los enlaces disulfuro previamente.

2.1. Generalidades de glóbulos rojos

La sangre es un tejido conectivo líquido de vital importancia para el organismo. Está encargada, entre otras cosas, del transporte de gases, nutrientes, productos de desecho y hormonas, mantenimiento de la temperatura corporal, protección del organismo y mantenimiento de la homeostasis. Está compuesta en un 55% por plasma y en un 45% por diferentes tipos celulares.

Más del 99% de las células de la sangre está constituido por eritrocitos o glóbulos rojos, células así llamadas por su color característico. Los glóbulos rojos primitivos son generados en el saco vitelino durante las primeras semanas de gestación, y durante el segundo trimestre pasa a ser el hígado el órgano encargado de su síntesis, en conjunto con el bazo y los ganglios linfáticos. A partir del último mes de gestación y hasta los 5 años, la producción de glóbulos rojos ocurre en la médula ósea de casi todos los huesos del organismo, a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Más allá de los 20 años, la mayor parte de los eritrocitos se genera en la médula de huesos membranosos pero, incluso en estos huesos, la médula se vuelve cada vez menos productiva con el paso de los años [2].

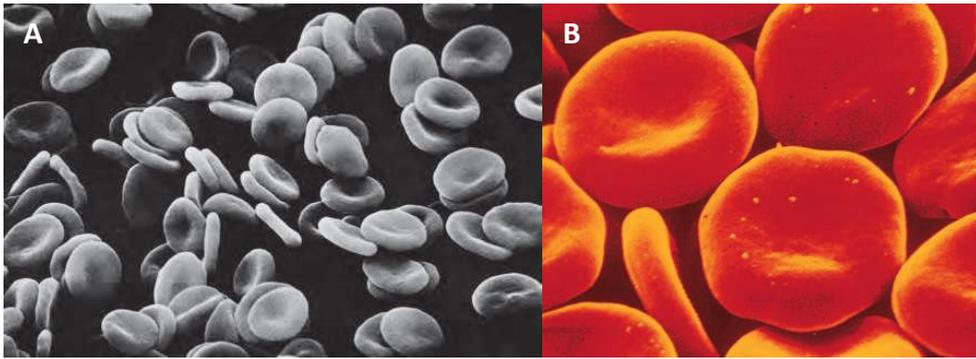


Figura 1: Glóbulos rojos vistos con microscopía electrónica de barrido. A. Imagen obtenida de [3]. **B.** Imagen obtenida de [4].

Los glóbulos rojos lucen como discos bicóncavos con hendiduras en la parte superior e inferior y son sumamente flexibles (*Figura 1*). Su membrana celular elástica les permite cambiar continuamente su forma para optimizar su paso por los capilares sanguíneos durante la circulación.

A diferencia del resto de las células, los glóbulos rojos carecen de la mayor parte de los organelos, en particular de núcleo celular y mitocondrias. Por esta razón, no tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos y ácidos grasos y presentan en general un metabolismo limitado, suficiente para sobrevivir durante su tiempo de vida [5]. El metabolismo presente está dado por enzimas citoplasmáticas capaces de degradar glucosa y formar pequeñas cantidades de ATP. Además, estas enzimas se encargan de mantener la flexibilidad de la membrana y el transporte de iones a través de ella, así como de prevenir la oxidación de las proteínas presentes en el glóbulo [2].

La función principal de los eritrocitos es el transporte de hemoglobina, proteína encargada de llevar el oxígeno (O_2) desde los pulmones a los tejidos, así como de unir y transportar dióxido de carbono (CO_2). Los glóbulos rojos presentan además anhidrasa carbónica, la enzima que cataliza la reacción reversible entre CO_2 y agua para formar ácido carbónico. La rapidez de esta reacción hace que el agua de la sangre pueda transportar enormes cantidades de CO_2 en forma de ión bicarbonato (HCO_3^-) desde los tejidos a los pulmones, donde será reconvertido a CO_2 y expulsado a la atmósfera [2].

2.1.1. Hemoglobina

La hemoglobina es la proteína mayoritaria de los eritrocitos, encontrándose en una concentración extraordinariamente alta, 20 mM [6].

La mayor parte del O₂ es transportado en la sangre por la hemoglobina, llevándolo a las células de tejidos aeróbicos y permitiendo una eficiente producción de energía y el correcto funcionamiento de enzimas que catalizan transformaciones metabólicas dependientes de O₂ [7]. Además, juega un rol importante en el transporte de CO₂ e hidrogeniones, y por tanto en el control del pH de los fluidos corporales.

La hemoglobina humana es un tetrámero de dos pares de cadenas polipeptídicas diferentes, con un peso molecular aproximado de 16 kDa cada una (*Figura 2*), que experimentan una isomerización conformacional con la oxigenación. La hemoglobina, por lo tanto, tiene dos estructuras estables diferentes, oxihemoglobina (oxiHb) y desoxihemoglobina [6]. En el modelo propuesto por Monod, Wyman y Changeux, a los dos estados energéticos presentados por la hemoglobina se les llama conformación tensa (T) y relajada (R). Estas se diferencian por su afinidad por el ligando y la interacción entre subunidades. La unión del O₂ a la desoxihemoglobina en estado T ocurre con baja afinidad, y logra desestabilizar esta conformación promoviendo su cambio al estado R oxigenado de alta afinidad [8, 9].

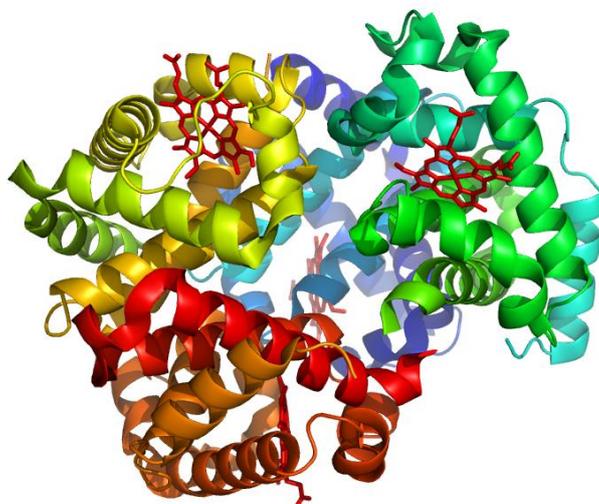


Figura 2: Estructura de la hemoglobina A humana. Se observan, representadas en diagrama de cintas, las cuatro subunidades proteicas coloreadas con gradiente de colores y los cuatro grupos hemo en rojo. Imagen creada en Pymol Molecular Graphics System [10], con información obtenida de RCSB Protein Data Bank (código 5UFJ) [11].

La molécula de hemoglobina A (la principal hemoglobina en adultos) tiene dos cadenas α y dos cadenas β . Cada una de ellas presenta un grupo hemo, lo cual le confiere a la proteína la capacidad de unir O₂. Este grupo hemo está formado por una parte orgánica llamada protoporfirina y un átomo de hierro en estado ferroso (Fe²⁺). Es solo en este estado que la hemoglobina puede unir O₂ [12].

Cuando el hierro del hemo es oxidado al estado férrico (Fe^{3+}) se obtiene metahemoglobina (metHb), la cual no puede unir O_2 y por tanto es funcionalmente inerte con respecto al transporte del mismo. Esta oxidación puede ocurrir de manera espontánea como resultado de la reacción con O_2 , a lo que se le llama autooxidación de la hemoglobina (*Figura 3*) [13]. La enzima dependiente de NADH, la citocromo b5-metahemoglobina reductasa (diaforasa I), es responsable de volver a reducir la metahemoglobina en hemoglobina.

2.2. Especies reactivas y estrés oxidativo

Se conoce como estrés oxidativo al desbalance entre los niveles de especies prooxidantes y antioxidantes a favor de las prooxidantes en células y tejidos [14]. Estas especies prooxidantes se engloban bajo los términos de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS). Estas especies reactivas pueden ser radicales libres, entendiendo por radical libre un átomo o molécula con un electrón desapareado, u otras especies no radicalares altamente oxidantes [15].

La mayor parte de los efectos tóxicos del O_2 pueden ser atribuidos a la formación de especies reactivas, y los radicales derivados del O_2 representan la clase más importante de especies radicalarias generadas en los organismos vivos [15]. Las ROS resultan típicamente de la excitación de O_2 a la forma oxígeno singulete, o de la transferencia de uno, dos o tres electrones para formar, respectivamente, radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) [16]. Estas pueden ser generadas de manera exógena o ser producidas intracelularmente. En general, son producto del metabolismo aerobio celular normal y presentan efectos beneficiosos a concentraciones bajas o moderadas, tomando parte en roles fisiológicos como la defensa frente a agentes infecciosos y la participación en sistemas de señalización celular [15]. Sin embargo, bajo condiciones patológicas pueden producirse en tasas altas y pasar a tener efectos deletéreos para las células.

2.2.1. Superóxido

El anión superóxido, generado por procesos metabólicos o por activación del O_2 por irradiación física, es considerado la especie reactiva del O_2 primaria. Este puede interactuar con otras moléculas para generar ROS secundarias [15]. Parte de este $\text{O}_2^{\bullet-}$

es producido deliberadamente por células fagocíticas activadas debido a acción enzimática (principalmente gracias a las NADPH oxidasas), o también puede ser producido por reacciones de autooxidación de moléculas como gliceraldeído, FMNH₂, FADH₂, adrenalina, noradrenalina y dopamina, y compuestos con tioles como cisteína. A pesar de esto, se estima que la mayor parte de la producción intracelular de O₂^{•-} en células no fagocíticas deriva de la mitocondria. Esta ocurre sobre todo en dos puntos discretos en la cadena de transporte de electrones, en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa). El complejo III es el principal sitio de producción de ROS en condiciones normales [17]. A medida que se da el ciclo de oxidación-reducción de la ubiquinona dentro de la cadena transportadora de electrones, existe la tendencia de que un electrón pase directamente al O₂ generando O₂^{•-}, en lugar de al siguiente transportador. De esta forma, del total de O₂ diario consumido por la mitocondria, un 1-2% es desviado hacia la formación de ROS [18, 19].

Los glóbulos rojos, aunque no tienen mitocondrias, presentan una elevada tasa de producción de ROS por la alta presión de O₂ en la sangre arterial. La fuente principal de ROS en eritrocitos es la hemoglobina, que puede generar O₂^{•-} durante el proceso de autooxidación mencionado anteriormente. Debido a que la concentración de hemoglobina oxigenada es 20 mM, incluso una pequeña tasa de autooxidación puede generar niveles elevados de O₂^{•-} [20]. Se estima que alrededor de un 3% de la hemoglobina sufre oxidación cada día [7].

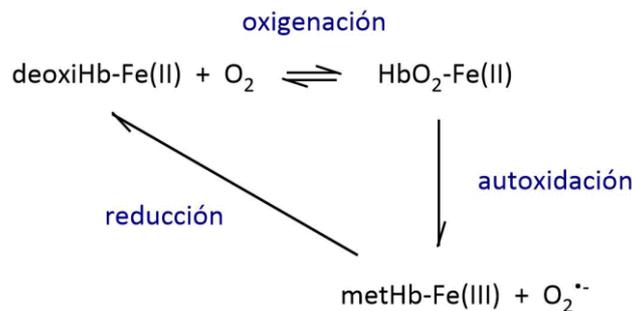


Figura 3: Procesos de oxidación y reducción de la hemoglobina. Esquema adaptado de [21].

2.2.2. Peróxido de Hidrógeno

Una vez formado, el $O_2^{\bullet-}$ es capaz de reaccionar con otra molécula de $O_2^{\bullet-}$ para formar H_2O_2 . Esta reacción puede ocurrir espontáneamente ($k=1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y a mucha mayor velocidad en presencia de alguno de los integrantes de la familia de superóxido dismutasas (SOD, $k \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Figura 4) [22]. El H_2O_2 puede ser sintetizado a su vez por varias otras enzimas *in vivo*, incluyendo la enzima monoaminoxidasa, localizada en la membrana mitocondrial externa. Esta se encarga de catalizar la desaminación oxidativa de aminas biogénicas, constituyendo una fuente importante de H_2O_2 [18].

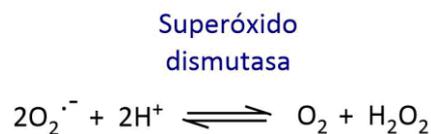


Figura 4: Reacción de formación de H_2O_2 a partir de $O_2^{\bullet-}$, catalizada por SOD. Esquema adaptado de [12].

Otras enzimas involucradas en la producción, tanto directa como indirecta, de H_2O_2 son las NADPH oxidasas y la xantina oxidasa. Esta última constituye una de las formas interconvertibles de la xantina oxidoreductasa, la cual es capaz de catalizar la oxidación de hipoxantina y xantina durante el metabolismo de las purinas [23]. Bajo condiciones relativamente fisiológicas (21% O_2 y pH 7.0), la xantina oxidasa cataliza la reducción de O_2 a H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ en una proporción 4:1 ($H_2O_2:O_2^{\bullet-}$) [24]. Tanto ésta como las NADPH oxidasas son especialmente importantes en el entorno vascular; su expresión y/o actividad se incrementa como consecuencia de factores de riesgo cardiovasculares y constituyen fuentes de ROS que luego potenciarán la disfunción endotelial [25].

El H_2O_2 es un precursor de radicales libres pero no es uno en sí mismo, por lo que es generalmente poco reactivo, siendo un oxidante y reductor débil. Presenta una estabilidad relativamente alta pero es rápidamente consumido por enzimas antioxidantes, como peroxirredoxina (Prx), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) [7].

2.2.3. Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es la especie derivada del O_2 más reactiva. A diferencia del radical $O_2^{\bullet-}$, que presenta una menor reactividad y mayor selectividad y vida media, no existe selectividad en las reacciones que involucran al radical HO^{\bullet} . Por esta razón, su vida media es extremadamente corta [14].

Su formación se puede dar a partir de múltiples reacciones. Una de ellas es la reacción de Fenton, en donde la transformación de H_2O_2 en HO^{\bullet} se cataliza por metales de transición, generalmente el Fe^{2+} . Las hemoproteínas, como la hemoglobina de glóbulos rojos, pueden ser degradadas por exceso de H_2O_2 para liberar hemo y iones hierro, que puede llevar a la generación de radical HO^{\bullet} y la oxidación de múltiples sustratos. La radiación ultravioleta también es capaz de generar radical HO^{\bullet} a partir de H_2O_2 , causando la fisión del enlace O-O. Otras fuentes incluyen las radiaciones ionizantes, la reacción entre ácido hipocloroso y $O_2^{\bullet-}$ y el ultrasonido [7].

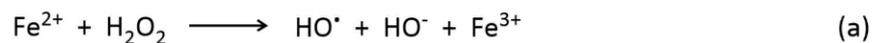


Figura 5: Formación de radical HO^{\bullet} catalizada por Fe. La reacción (a) corresponde a la reacción de Fenton y la (b) a la reacción de Haber-Weiss. Esquema adaptado de [26].

2.2.4. Óxido nítrico y peroxinitrito

El óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) es una molécula pequeña e hidrofóbica, capaz de atravesar membranas sin necesidad de canales o receptores [27-29]. Es sintetizado por tres tipos de óxido nítrico sintasa (NOS): el $^{\bullet}NO$ generado por la NOS endotelial (eNOS) en la vasculatura es un mediador importante de la vasodilatación dependiente del endotelio y está involucrado en la inhibición de la agregación plaquetaria, la expresión de moléculas de adhesión, la regulación del crecimiento celular y la diferenciación de las células vasculares. En condiciones de inflamación, es sintetizado también por la NOS inducible (iNOS), una isoforma que se encuentra presente en muchos tipos celulares, incluidas las células del endotelio vascular y las células inflamatorias. El tercer tipo es la NOS neuronal (nNOS), que produce $^{\bullet}NO$ en el tejido nervioso [30, 31]. Además, es

posible obtener $\cdot\text{NO}$ durante la combustión de tabaco y otros materiales orgánicos [32].

Al tratarse de un híbrido entre nitrógeno y oxígeno molecular, el $\cdot\text{NO}$ es menos reactivo que el O_2 . De todos modos, presenta un electrón desapareado que le permite unirse fuertemente, por ejemplo, al hierro de grupos hemo. Esto permite que sea removido al ingresar al interior de los glóbulos rojos, donde es convertido a nitrato por su reacción con oxiHb (*Figura 6, ecuación a*) [30, 33, 34].

El $\cdot\text{NO}$ también se asocia a la desoxihemoglobina (*Figura 6, ecuación b*), un hecho relevante en sangre venosa.

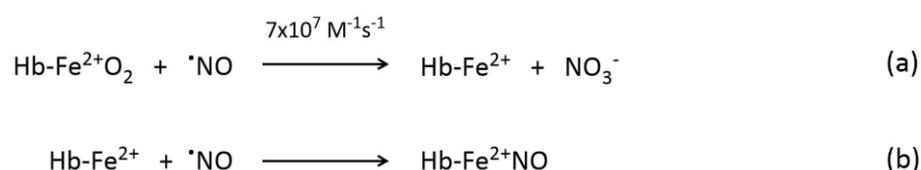


Figura 6: Reacciones entre el $\cdot\text{NO}$ y la hemoglobina. La ecuación (a) corresponde a la formación de nitrato como consecuencia de la reacción con oxiHb. La ecuación (b) muestra la asociación de $\cdot\text{NO}$ a la forma desoxigenada de la hemoglobina.

La asociación del $\cdot\text{NO}$ en el complejo hierro-nitrosilo es reversible, lo que preserva al vasodilatador. Sin embargo, las constantes de disociación son bastante bajas ($1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para el estado R y $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para el estado T). Por otro lado, se ha sugerido un rol de la hemoglobina como transportador de $\cdot\text{NO}$ bajo la forma de S-nitrosohemoglobina [35].

Además, el $\cdot\text{NO}$ es capaz de reaccionar con radicales libres, siendo en particular un buen blanco para el $\text{O}_2\cdot$. La tasa de reacción entre ellos es alta ($k=1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [36], y ambos compuestos pueden ser simultáneamente producidos por los mismos tipos celulares, favoreciendo la colisión bimolecular para dar peroxinitrito [37, 38].

El peroxinitrito es un prooxidante clave involucrado en múltiples mecanismos patogénicos, que presenta una baja vida media y puede reaccionar directamente con distintos compuestos biológicos como tioles, centros metálicos y CO_2 [31, 39, 40]. Se puede protonar para dar lugar a ácido peroxinitroso, una especie inestable que se descompone espontáneamente para generar $\text{HO}\cdot$ y $\cdot\text{NO}_2$, o puede sufrir reordenamiento molecular para generar nitrato [38].

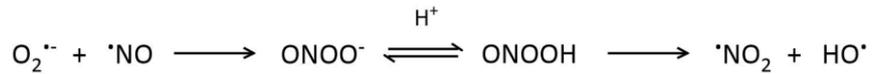


Figura 6: Formación del anión peroxinitrito y su descomposición a HO[•] y [•]NO₂. Esquema adaptado de [38].

Una importante fracción (alrededor de 40%) de peroxinitrito formado intravascularmente puede difundir a los glóbulos rojos antes de reaccionar con compuestos del plasma, ingresando a los mismos por medio de dos mecanismos principales: uno consiste en el transporte de su forma aniónica por el intercambiador HCO₃⁻/Cl⁻, y el otro consiste en la difusión pasiva de su forma protonada. Una vez dentro de los glóbulos rojos, una importante reacción del peroxinitrito será con oxiHb, dando metHb como producto final [31, 34]. Se formará una pequeña proporción (aprox 10%) de [•]NO₂ y otros radicales como productos secundarios que pueden promover el daño oxidativo y van a contribuir al proceso de envejecimiento de los eritrocitos [31, 39].

2.3. Sistemas antioxidantes en glóbulos rojos

La exposición a especies reactivas provenientes de diferentes fuentes llevó a los organismos a desarrollar una serie de mecanismos de defensa en orden de limitar los niveles de oxidantes y el daño que estos generan. Estos incluyen mecanismos preventivos, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes. Las defensas antioxidantes pueden consistir tanto en enzimas (SODs, catalasa y peroxidasas) como en componentes de bajo peso molecular (vitamina E, vitamina C, glutatión, beta-caroteno, etc.) [14].

2.3.1. Antioxidantes enzimáticos

2.3.1.1. Superóxido dismutasa

La SOD es una familia de enzimas que se encargan de proteger a las células del anión O₂^{•-}. Esta familia incluye tres clases principales, con plegamientos proteicos diferentes y diferentes metales catalíticos: Cu,ZnSOD, MnSOD/FeSOD y NiSOD [41].

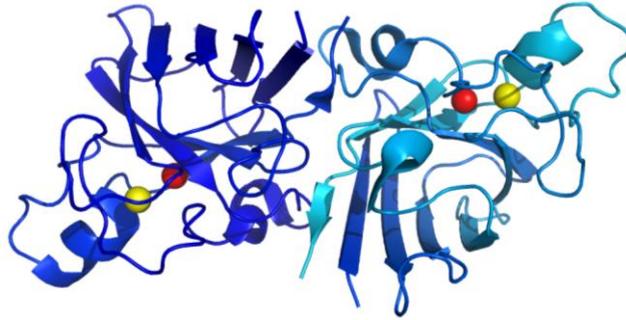


Figura 7: Estructura de la Cu,ZnSOD 1 humana. Se observan, representadas en diagrama de cintas, las dos subunidades proteicas coloreadas con gradiente de colores, los átomos de Cu en rojo y los de Zn en amarillo (código 4OH2) [10, 11].

Debido a su falta de mitocondrias, la Cu,ZnSOD (*Figura 7*) localizada en el citoplasma juega un rol muy importante en los eritrocitos. Esta reacciona con los radicales superóxido, previniendo la formación de metHb [20]. La Cu,ZnSOD tiene un peso molecular de ~32 kDa y está formada por dos subunidades proteicas, cada una de las cuales contiene un sitio activo con un átomo de cobre y uno de zinc [7]. Los iones metálicos se encargan tanto de conectar elementos estructurales como de proporcionar roles catalíticos.

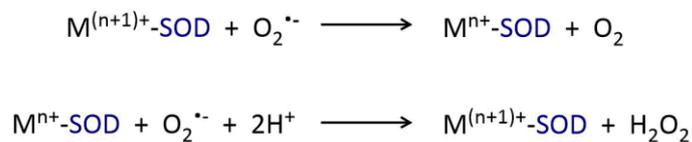


Figura 8: Reacción de dismutación del $O_2^{\bullet -}$ catalizada por SOD. El esquema de reacción muestra los cambios en el estado de oxidación del catión metálico de la enzima, donde M=Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2).

Las SOD protegen a las células del estrés oxidativo al catalizar la conversión de radicales $O_2^{\bullet -}$ a O_2 y H_2O_2 [41] (*Figura 8*). Al disminuir los niveles de $O_2^{\bullet -}$, la SOD puede entonces inhibir la formación de otras especies reactivas como el peroxinitrito [14].

2.3.1.2. Glutación peroxidasa

El H_2O_2 proveniente de la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ y demás fuentes será removido principalmente por tres sistemas enzimáticos. Uno de ellos se basa en la enzima GPx. Esta es una selenoproteína tetramérica con cuatro subunidades idénticas de ~22 kDa

(Figura 9), cada una conteniendo un átomo de selenio en forma de selenocisteína. Este residuo se encuentra involucrado en la actividad catalítica de la enzima [42].



Figura 9: Estructura de la GPx1 humana. Se observan, representadas en diagrama de cintas, las cuatro subunidades proteicas coloreadas con gradiente de colores (código 2F8A) [10, 11].

La GPx1 es uno de los miembros más abundantes de la familia de enzimas GPx. Está presente en todas las células y se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria y, en algunos tipos celulares, en los peroxisomas. En el glóbulo rojo, donde la concentración intracelular de la enzima es $7 \mu\text{M}$ [43], se le ha adjudicado un papel importante en proteger a la hemoglobina del daño oxidativo [44].

La GPx remueve H_2O_2 acoplando su reducción a agua con la oxidación de glutatión (GSH) ($k=1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Figura 10A) [45]. Estas enzimas son específicas para GSH como donador de electrones, pero pueden actuar en otros peróxidos aparte de H_2O_2 . Por lo tanto, pueden catalizar la reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos o colesterol. Estos peróxidos han de haber sido liberados previamente por la acción de una lipasa, dado que la GPx no puede actuar sobre peróxidos de ácidos grasos esterificados en lipoproteínas o membranas [7]. Una vez oxidado, el GSH es reducido nuevamente por acción de la enzima glutatión reductasa (GR), utilizando el poder reductor del NADPH [42] (Figura 10B).

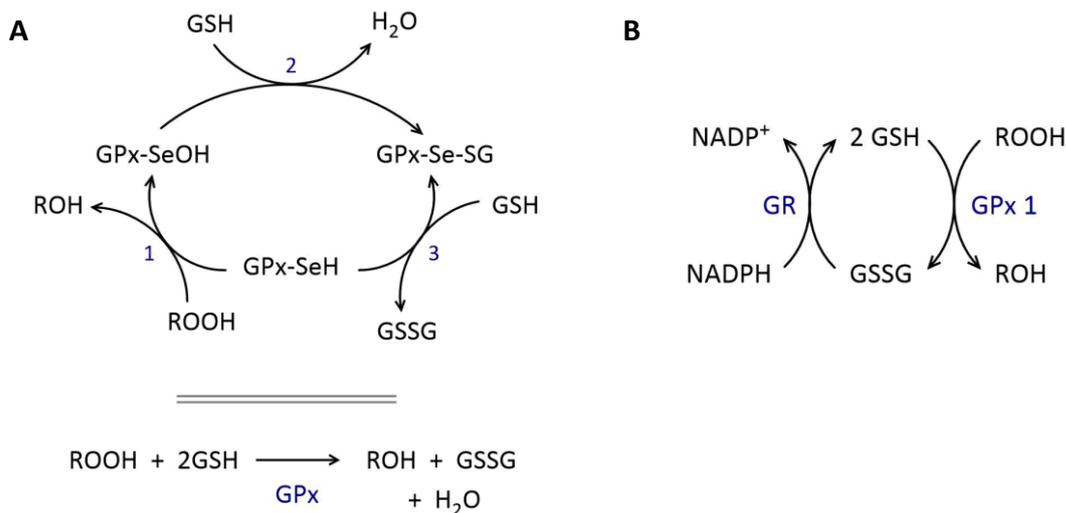


Figura 10: Mecanismos enzimáticos de la GPx 1. **A.** Reducción de peróxido por GPx1. 1, formación de ácido selénico en el sitio activo de la GPx por reacción con peróxido; 2, reducción por GSH y formación del intermediario Se-SG; 3, reducción por segunda molécula de GSH, resultando en la formación de glutatión disulfuro (GSSG). La reacción neta se muestra en la parte inferior de la figura. **B.** Vías redox para mantener los cofactores necesarios para la actividad de GPx. El GSSG es reducido por GR, siendo esta reducida por NADPH. Ambos esquemas fueron adaptados de [44].

2.3.1.3. Peroxirredoxinas

Las Prx son una clase ampliamente extendida de proteínas antioxidantes y de señalización. Estas peroxidases contienen en su sitio catalítico una cisteína peroxidática, que es oxidable a ácido sulfénico (Cys-OH) y rápidamente forma un disulfuro con otra Cys (la cisteína resolutive) durante el ciclo catalítico [19].

Las células de mamífero expresan seis isoformas de Prx, Prx I a VI, las cuales se clasifican en tres subgrupos (2-Cys, 2-Cys atípica y 1-Cys) en base al número y posición de los residuos de cisteína que participan en la catálisis [46]. La Prx II (*Figura 11*), en particular, tiene un rol fundamental como enzima antioxidante en los glóbulos rojos.

Esta constituye la tercera proteína más abundante del glóbulo con una concentración intracelular de 240 μM , es capaz de reaccionar extremadamente rápido con H_2O_2 ($k=1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), y también es una muy eficiente reductora de peroxinitrito ($k=1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [47].

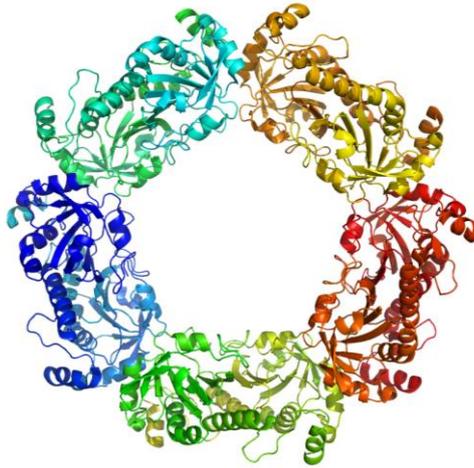


Figura 11: Estructura de Prx II humana. Se observan, representadas en diagrama de cintas, las diez subunidades proteicas coloreadas con gradiente de colores (código 1QMV) [10, 11].

Su capacidad de reducir hidroperóxidos está dada por el tiol reductor en su sitio activo. El ciclo catalítico de la enzima involucra la reducción de Prx oxidada por tiorredoxina (Trx) y el potencial reductor de NADPH vía NADPH-tiorredoxina reductasa (TR) [20] (Figura 12).

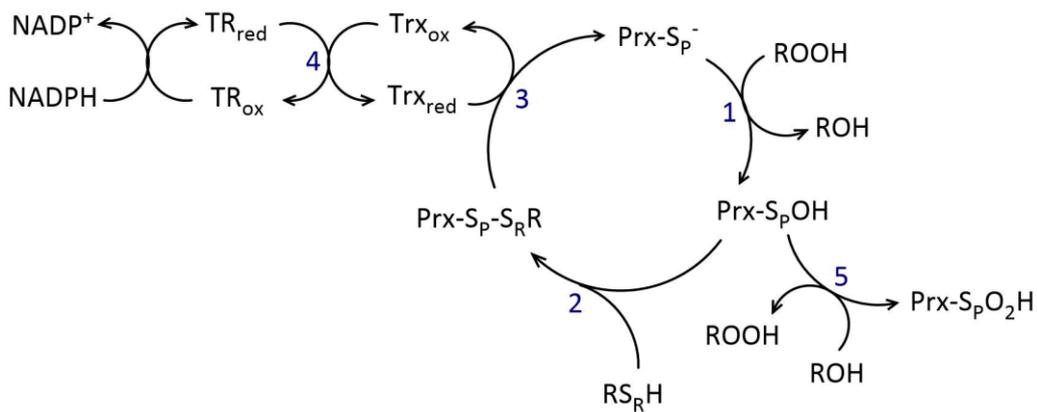


Figura 12: Ciclo catalítico de las Prx 2. 1, ataque nucleofílico de la cisteína peroxidática (S_p) al peróxido; 2, reacción del ácido sulfénico con la segunda cisteína, llamada resolutive (S_R); 3, reducción del enlace disulfuro; 4, regeneración de la Trx reducida; 5, oxidación del ácido sulfénico a ácido sulfínico. Esquema adaptado de [47].

2.3.1.4. Catalasa

La catalasa es otra enzima encargada de la remoción de H_2O_2 , y relativamente abundante en el citosol de los glóbulos rojos, donde la concentración es $3.4 \mu M$ [48].

Esta consiste en cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene un grupo hemo férrico en su sitio activo (*Figura 13*).

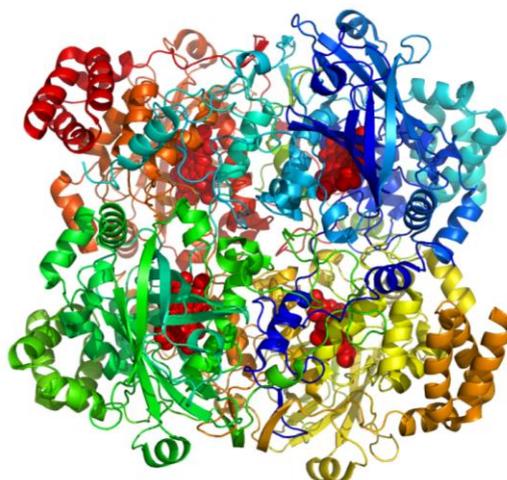


Figura 13: Estructura de catalasa humana. Se observan, representadas en diagrama de cintas, las cuatro subunidades proteicas coloreadas con gradiente de colores, y los cuatro grupos hemo en rojo representados con esferas (código 1DGF) [10, 11].

A diferencia de las peroxidasa, la catalasa cataliza directamente la descomposición de dos moléculas de H_2O_2 , en lugar de utilizarlo para oxidar otro sustrato [7]. Su mecanismo de acción es similar al de la SOD, siendo una molécula de H_2O_2 reducida a agua y la otra oxidada a O_2 [20] (*Figura 14*). La catalasa es reciclada durante su ciclo catalítico y es, por tanto, independiente de cualquier cofactor [49].

La tasa lenta de producción de H_2O_2 en los glóbulos rojos (vía hemoglobina y SOD) hace que casi todo el H_2O_2 sea removido por GPx y Prx, enzimas con una alta velocidad de reacción. Sin embargo, si se aumentan las concentraciones de H_2O_2 , la catalasa presentará una mayor contribución y se volverá más importante [7, 47].

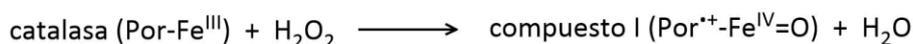


Figura 14: Mecanismo de reacción de la catalasa. En primer lugar reacciona con una molécula de H_2O_2 y se da la formación del compuesto I (intermediario con un Fe de alta valencia). Una vez formado, el compuesto I reacciona rápidamente con una segunda molécula de H_2O_2 para generar O_2 y agua. Esquema adaptado de [50].

2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

2.3.2.1. Vitaminas

Existe un amplio rango de constituyentes dietarios que presentan efectos antioxidantes *in vivo*, encontrándose entre ellos las vitaminas A, E y C (Figura 15).

La vitamina C o ácido ascórbico es un antioxidante primario en el plasma. Este puede ser oxidado por transferencia de dos electrones, dando lugar al producto dehidroascorbato (DHA). Este puede ser reducido o reciclado a ascorbato, proceso que se lleva a cabo en los glóbulos rojos y es dependiente de GSH. Esto permite reponer los niveles de ascorbato en plasma, manteniendo la capacidad antioxidante, y además puede proteger a los eritrocitos del estrés oxidativo transmembrana [51].

El ascorbato es capaz de atrapar virtualmente todos los radicales peroxilo en fase acuosa antes de que puedan difundir hacia los lípidos de la membrana plasmática, evitando la lipoperoxidación [52]. Protege además los lípidos de membrana de los eritrocitos, y tiene un rol en la conservación de tocoferoles [20].

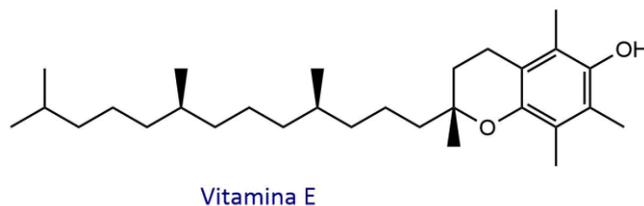
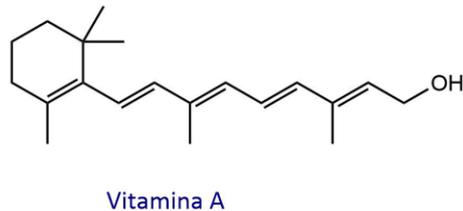
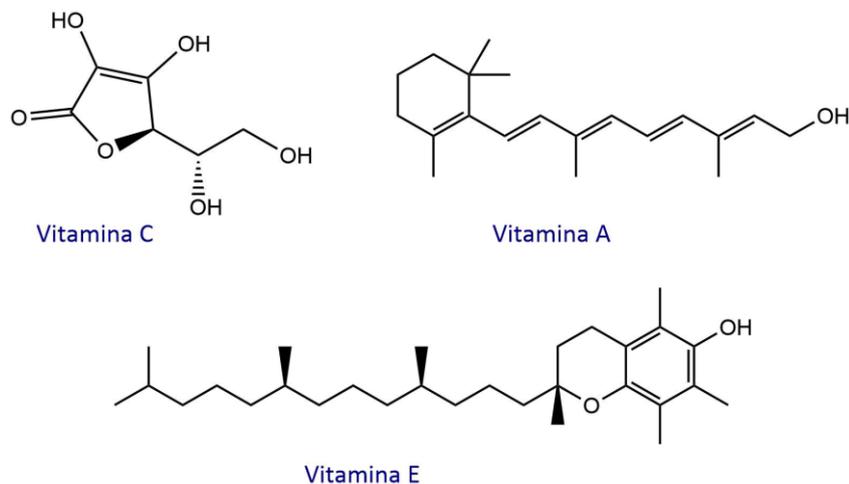


Figura 15: Fórmula química de vitaminas antioxidantes C, A y E. Figura realizada con ChemDraw Professional 15.0 [53].

En cuanto a la vitamina E, existen ocho sustancias en la naturaleza que presentan esta actividad, de tipo tocoferoles y tocotrienoles. Todas estas formas son capaces de actuar como antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica dado que son capaces de reaccionar con radicales peroxilo lipídicos más rápido de lo que estos radicales

pueden reaccionar con cadenas de ácidos grasos adyacentes o proteínas de membrana. Los tocoferoles pueden reaccionar también con oxígeno singulete y, lentamente, con $O_2^{\bullet-}$ y radical HO^{\bullet} para proteger a las membranas de estas especies.

Durante estos procesos, el tocoferol es consumido y convertido a su forma radical. Posteriormente podrá ser reciclado con la participación de ascorbato [7].

La vitamina A, por último, es también un potente atrapador de radicales libres. Los carotenoides, sus precursores, tienen también efectos antioxidantes y pueden desactivar el oxígeno singulete [20]. Si bien estas vitaminas antioxidantes liposolubles resultaron una importante promesa en base a su actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vitro*, los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos sobre el uso de estos compuestos en ensayos clínicos no dio los resultados esperados [54-57].

2.3.2.2. Glutación

En todos los tipos celulares, el GSH (*Figura 16*) es el regulador no enzimático de la homeostasis redox intracelular más importante. En particular, los glóbulos rojos funcionan como transportadores biológicos de GSH al generarlo por síntesis *de novo* y otorgan un sistema detoxificante en la circulación. La síntesis de GSH está limitada en los eritrocitos por la disponibilidad de aminoácidos, en particular de Cys. Esta se lleva a cabo por medio de dos reacciones sucesivas dependientes de ATP, catalizadas por γ -glutamylcisteina sintetasa y GSH sintetasa [20].

El GSH es el tiol libre más abundante en las células eucariotas, siendo su concentración intracelular de 1-10 mM [58-60]. La mayor parte del GSH en las células es utilizado por tres miembros de la familia de la GPx [61] y por una de las Prx (Prx6). Estas enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 por GSH en H_2O y glutatión disulfuro (GSSG). El GSSG puede aumentar considerablemente durante el estrés oxidativo, por lo que el cociente GSH/GSSG es representativo del estrés oxidativo en la célula. Normalmente, más del 90% del total de GSH se mantiene reducido debido a la síntesis *de novo* de GSH, a la captación de GSH exógeno y a la reducción enzimática de GSSG por la GSH reductasa [15, 19]. De este modo, el GSH participa en reacciones redox protegiendo a los grupos SH de las proteínas de la oxidación y el cross-linking por medio de la oxidación reversible de su tiol activo [20].

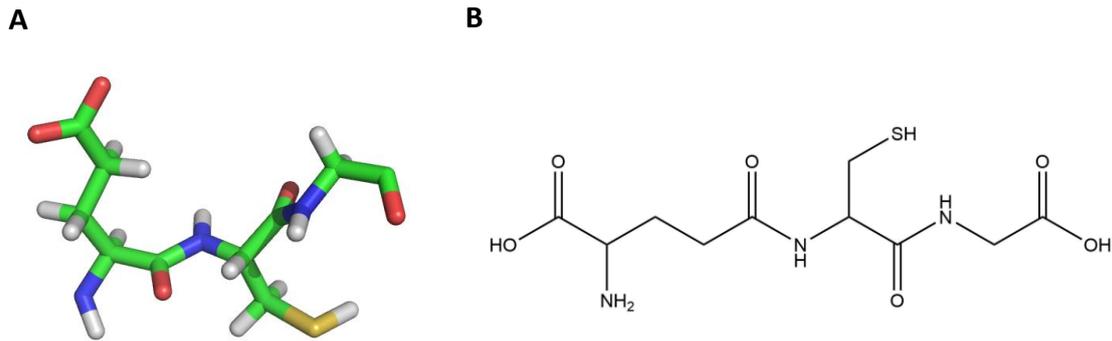


Figura 16: Fórmula química del GSH. A. Modelo tridimensional. **B.** Fórmula estructural.

Otros de los roles principales del GSH en la defensa en contra del estrés oxidativo incluyen ser cofactor de enzimas detoxificantes como GST, participar en transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática y atrapar radicales HO^\bullet y oxígeno singlete directamente [15]. Además, está involucrado en el metabolismo del ácido ascórbico y en la comunicación entre células, y puede formar complejos de coordinación con iones cobre y disminuir su habilidad para generar radicales libres. También tiene un rol en el plegamiento proteico y la degradación de proteínas con enlaces disulfuro, por ejemplo en el caso de la insulina. El primer paso de su remoción consiste en el corte de los enlaces disulfuro que une las cadenas peptídicas por medio de la enzima glutatión-insulina transhidrogenasa, en presencia de GSH [7, 62].

2.4. Daño molecular

Si un radical se genera en una solución aeróbica de biomoléculas se dará la oxidación de las mismas, generándose radicales peroxilo (ROO^\bullet) y alcoxilo (RO^\bullet) como intermediarios de la reacción en cadena que proseguirá. Entre los productos finales más abundantes se encontrarán peróxidos (ROOH y H_2O_2) y moléculas hidroxiladas (ROH) o carboniladas ($\text{HR}=\text{O}$) [63]. En particular, la formación de carbonilos es la modificación proteica más estudiada [17].

De este modo, los efectos de los radicales libres en las células llevan a modificaciones a nivel de las principales estructuras celulares, incluida (i) la membrana celular, alterando su fluidez al reaccionar con los lípidos que la conforman y el transporte de membrana, al modificar las proteínas transportadoras de membrana, los canales iónicos y receptores proteicos, entre otros, (ii) la señalización celular, a través de

modificaciones en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, por ejemplo, y (iii) el ADN, induciendo cambios en la expresión génica y en la velocidad de división celular y el aumento del riesgo de cáncer [63, 64]. Tal vez por su mayor proximidad a la fuente de oxidación o por su limitada capacidad de reparación, el ADN mitocondrial parece ser más sensible al estrés oxidativo que el nuclear [17]. Por todo esto, el estrés oxidativo está implicado en una gran variedad de enfermedades y también en el proceso de envejecimiento.

En el caso de los eritrocitos, el daño oxidativo comprometerá principalmente el transporte de O_2 . Además de inhabilitar la unión a O_2 , la oxidación de la hemoglobina causa la formación de disulfuros entre cadenas adyacentes de globina, distorsionando la estructura primaria de la proteína. Otras proteínas afectadas en los glóbulos rojos por las ROS son las que componen la parte del citoesqueleto de la membrana celular, que incluyen a la espectrina, anquirina y actina. Las ROS pueden causar la oxidación de las cadenas laterales de sus residuos aminoacídicos, el cross-linking entre proteínas y oxidación del segmento central de la proteína, resultando en la fragmentación de la misma y generación de otros productos proteicos oxidados [65].

2.5. Glutathionilación de proteínas

El estrés oxidativo inducido por condiciones tanto fisiológicas como patológicas lleva a un descenso en la relación GSH/GSSG. Como fue mencionado anteriormente, esta proporción entre el GSH y su disulfuro oxidado contribuye al potencial redox de la célula y, por tanto, a la homeostasis redox.

Las cisteínas proteicas presentan un grupo tiol libre normalmente reducido pero pueden existir bajo ciertos estados oxidados, incluyendo la formación de disulfuros mixtos con tioles de bajo peso molecular. Este es el caso de la glutathionilación, en la cual las cisteínas forman un enlace disulfuro con la cisteína del GSH [66]. Esta modificación ha sido considerada como una respuesta adaptativa celular para proteger a las proteínas de la pérdida de función permanente como consecuencia del estrés oxidativo.

De acuerdo a lo establecido por Thomas y colaboradores [67], el mecanismo de la glutathionilación proteica podría seguir dos caminos distintos. El primero de ellos involucra la modificación oxidativa de GSH a GSSG, que puede luego reaccionar con un tiol proteico reducido en un intercambio tiol-disulfuro. En este caso, la formación del

disulfuro mixto ocurriría en respuesta a cambios en la proporción GSH/GSSG. Según Gilbert [68], a pesar de que se cree que las interacciones específicas entre GSSG y las proteínas desplazan el equilibrio del disulfuro mixto hacia la glutationilación proteica, la constante de equilibrio (K_{mix}) para la mayor parte de las proteínas suele ser alrededor de 1. Esto indica que es poco probable que ocurra la glutationilación dependiente de GSSG en respuesta a cambios en la relación GSH/GSSG [69]. Una idea similar fue propuesta por Dalle-Donne y colaboradores [70] a partir del estudio de la glutationilación de actina. Según su trabajo, la concentración de GSSG requerida para que ocurra el intercambio de tiol-disulfuro dentro de la célula es mucho mayor que aquella presente en la célula.

El segundo mecanismo propuesto para la glutationilación de proteínas involucra la activación inicial del tiol proteico, pudiéndose llevar a cabo por modificaciones oxidativas o nitrosativas. Estas modificaciones pueden encontrarse estabilizadas o, de lo contrario, pueden reaccionar con GSH para formar los disulfuros mixtos en cuestión [71].

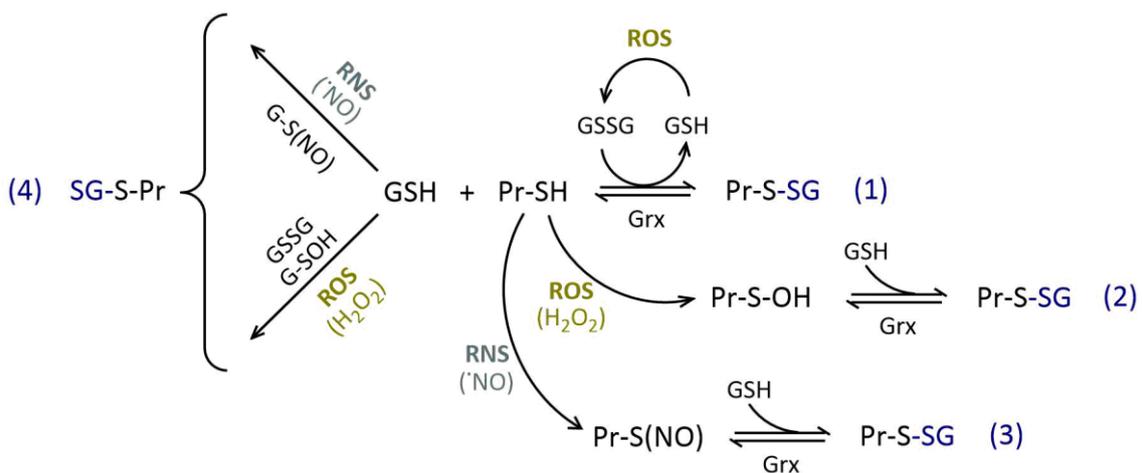


Figura 17: Vías de glutationilación proteica. (1) intercambio tiol-disulfuro entre tiol proteico y GSSG en respuesta a cambios en la relación GSH/GSSG; (2) activación del tiol proteico por modificaciones oxidativas (por ejemplo formación de ácido sulfénico) y (3) modificaciones nitrosativas previas a la reacción con GSH; (4) reacción de tioles proteicos con formas oxidadas o nitrosadas del GSH. Esquema adaptado de [72, 73].

No todas las ROS son oxidantes específicas de tioles proteicos, jugando un papel importante tanto la vida media del oxidante como la velocidad de reacción. El H_2O_2 , en particular, es suficientemente estable y reactivo para causar oxidación de tioles. Lo hace a partir de una reacción de sustitución nucleofílica; en primer lugar se desprotona el tiol para obtener la nucleofilicidad necesaria, teniendo las cisteínas en entornos

básicos (por ejemplo rodeadas de residuos de arginina, lisina o histidina) tasas de reacción más altas con H_2O_2 . Como resultado de esta oxidación se formará ácido sulfénico, el cual es altamente reactivo con el sulfhidrilo de GSH y puede facilitar la glutationilación proteica [72].

Alternativamente, los disulfuros mixtos pueden formarse por la reacción de GSH con tioles proteicos que han sido S-nitrosados por exposición a especies reactivas del nitrógeno (RNS). La exposición de células a $\cdot NO$ y otras RNS puede llevar también a la oxidación de GSH a GSSG y GSNO. La glutationilación mediada por $\cdot NO$ involucra GSNO como reactivo intermediario y ocurre bajo condiciones reductoras sin que sea necesaria la descomposición de GSNO o la formación de GSSG [69].

En cuanto a los sitios de glutationilación, no hay evidencia de secuencias aminoacídicas específicas que tengan este rol. Probablemente el requerimiento más importante de una cisteína para ser glutationilada sea su accesibilidad [66]. Cuando esta cisteína se encuentra en el sitio activo de una enzima, por ejemplo, la glutationilación suele resultar en la inhibición de la actividad de la proteína. Este es el caso de la mayor parte de las proteínas, aunque algunas de ellas sufren un aumento de su actividad o presentan una actividad diferencial regulada por cofactor [71, 74].

Además de constituir un mecanismo de resistencia al estrés oxidativo, se le han atribuido otros roles a la glutationilación proteica, entre ellos la modulación de vías de transducción de señales como la fosforilación de tirosinas, regulación de la transcripción, procesamiento proteolítico, ubiquitinación y degradación de proteínas [69].

La glutationilación tiene varias características requeridas para actuar como un mecanismo de señalización. En primer lugar, es rápida, normalmente ocurriendo unos pocos minutos luego de la exposición a un oxidante. En segundo lugar, es reversible bajo detiolación enzimática por glutarredoxina y también como consecuencia del potencial redox. Por último, es específica: las proteínas y sus diferentes cisteínas tienen diferente reactividad a los oxidantes, existe compartimentalización redox del interior celular, y existe especificidad en la detiolación enzimática. Se ha demostrado que el ditiotreitól (DTT) es menos selectivo que la glutarredoxina (Grx) 1 en la remoción de GSH, indicando que podrían existir proteínas glutationiladas que sirvan de sustratos específicos para la Grx. Es posible además que exista especificidad en la tiolación enzimática dado que, dependiendo de las condiciones, la Grx también puede facilitar la glutationilación [74].

Entre las proteínas que han mostrado ser sensibles a reacciones de glutacionilación se incluyen enzimas involucradas en el metabolismo central y periférico (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa, aldolasa, enolasa, anhidrasa carbónica), en la transducción de señales (5-lipooxigenasa y guanilato ciclasa), en el catabolismo proteico (colagenasa y tripsina), proteínas mitocondriales (citocromo c oxidasa), proteínas de heat shock (HSP-70), chaperoninas, Prx, y factores de transcripción (subunidad p50 de NF-KB). También están representadas algunas proteínas del citoesqueleto (actina, miosina, profilina y vimentina) [71, 75].

El nivel de proteínas glutacioniladas en células en reposo es al menos un orden de magnitud menor que aquel en células bajo estrés oxidativo. De esta manera, se generan patrones de glutacionilación alterados en situaciones de desregulación redox, como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, inflamatorias, o neurodegenerativas, que pueden ser utilizados como biomarcadores [72]. Algunos autores plantean que el análisis de proteínas glutacioniladas como indicadores de estrés oxidativo es ventajoso con respecto a la medida de GSH y GSSG, sobre todo teniendo en cuenta que estas son más estables que el GSSG al ser menos susceptibles a la reducción enzimática [76].

2.5.1. Glutacionilación de hemoglobina

Los glóbulos rojos han sido propuestos como los principales atrapadores de los oxidantes generados a nivel circulatorio [77, 78], y como la sangre puede ser estudiada como indicador del estado oxidativo general del organismo, se ha propuesto que la hemoglobina glutacionilada (Hb-SG), en particular, puede servir como marcador clínico [79]. Niwa y colaboradores [80] realizaron el primer estudio que demostró que los niveles de Hb-SG están incrementados en pacientes diabéticos, así como en pacientes con hiperlipidemia. En estos pacientes, el aumento de Hb-SG puede producir un descenso en el suministro de O₂ a los tejidos debido a que esta presenta una alta afinidad por el O₂ y baja cooperatividad, contribuyendo así a la hipoxia tisular. Además, aumentos significativos de Hb-SG han sido encontrados en ataxia de Friedreich y falla renal crónica, y se ha propuesto como marcador también en terapias crónicas sustitutivas como diálisis y trasplantes [81].

En cuanto al sitio de glutacionilación, múltiples autores proponen que la unión de la molécula de GSH a la hemoglobina se daría en alguna de sus cadenas β. La

hemoglobina contiene dos residuos de cisteína en cada cadena β , en las posiciones 93 y 112, y un residuo de cisteína en cada cadena α , en la posición 104. Mientras que el residuo β 93 se encuentra accesible en la superficie, los residuos β 112 y α 104 están orientados hacia el interior de la molécula, y aunque no forman enlaces disulfuro están involucrados en el contacto entre subunidades, por lo que no están disponibles para ser modificados. Por esto la modificación se generaría en el residuo β 93 [80, 82]. Sin embargo, existen estudios que indican la unión del GSH a otras de estas cisteínas. Mawatari y colaboradores [83] plantearon la formación de al menos tres tipos de Hb-SG en los eritrocitos. El primer tipo es un disulfuro mixto entre GSH y hemoglobina normal. El segundo tipo es un enlace disulfuro entre la cisteína β 93 de la metHb y GSSG, y el tercer tipo es un enlace disulfuro entre los otros residuos de cisteína de la cadena β de metHb y/o de la cadena α de la metHb y GSSG. Tsikas y colaboradores [84], por otro lado, demostraron la oxidación de hemoglobina a Hb-SG inducida por nitrito en las cisteínas β -93 y β -112.

Para la detección y estudio de proteínas glutationiladas, entre ellas la hemoglobina, se han utilizado sobre todo técnicas de proteómica como cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masa. Además, existen resultados en donde se empleó a la enzima GST como herramienta para detectar este tipo de proteínas modificadas [85].

2.5.2. Glutación S-transferasa

La familia de enzimas GST utiliza GSH en reacciones que contribuyen a la transformación de un amplio rango de compuestos, incluyendo carcinógenos, drogas terapéuticas y productos de estrés oxidativo [15]. La inducción de la expresión de GST es un mecanismo celular conservado a lo largo de la evolución en respuesta a la exposición a oxidantes y estrés oxidativo, así como distintos químicos dañinos producidos de manera endógena o por el medio ambiente [86, 87].

La mayor parte de las GSTs catalizan la conjugación de GSH a compuestos que presentan un centro electrofílico, por medio de la formación de un enlace tioéter entre el átomo de azufre del GSH y el sustrato [88]. Esta conjugación forma parte de las reacciones de la fase II del proceso de detoxificación de xenobióticos [89]. En la fase I del metabolismo de xenobióticos, por lo general miembros de la familia del citocromo P450 introducen un grupo funcional en el xenobiótico que proporciona un centro

electrofílico. Este centro electrofílico podrá ser atacado en la fase II por GSH y esto le permitirá al conjugado ser removido de la célula durante la fase III, proceso que requiere la participación de transportadores especiales. Una vez transportados fuera de la célula, la porción peptídica de los conjugados será sometida al ataque por una peptidasa y, en última instancia, será convertida en ácido mercaptúrico. Este es el metabolito final que es eliminado del organismo por la orina [88].

En cuanto a la detoxificación de productos de estrés oxidativo, algunas isoenzimas de GST muestran actividad GPx independiente de selenio, pudiendo reducir hidroperóxidos lipídicos de membrana, tanto de colesterol como de ácidos grasos [86]. En un primer paso de la reacción se da la reducción del peróxido a un alcohol, con la producción de GSH sulfénico (GSOH) (*Figura 18A*), y en un segundo paso se da la reacción espontánea del GSOH con una molécula de GSH para generar agua y GSSG (*Figura 18B*) [88].

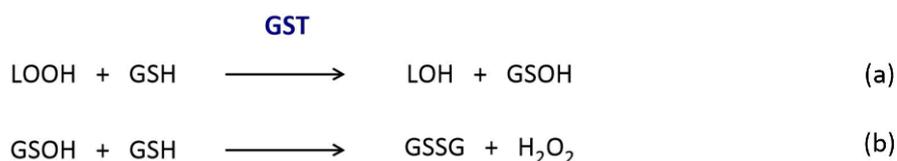


Figura 18: Reducción de hidroperóxidos lipídicos catalizada por GST. El esquema (a) corresponde al primer paso de la reacción y el esquema (b) al segundo paso.

Además de esto, los productos de la peroxidación lipídica y de la oxidación de nucleótidos y catecolaminas pueden ser conjugados a GSH mediante la acción de la GST previniendo la continuación de ciclos redox [86].

Además de su función enzimática, se ha sugerido que las GSTs pueden servir también como transportadores intracelulares de algunas moléculas orgánicas, como el grupo hemo, bilirrubina, pigmentos biliares y esteroides [7, 90].

Las distintas formas de GST se expresan diferencialmente dependiendo del tejido y de la etapa de desarrollo del individuo, modificándose la expresión durante la transición de feto a adulto. Las GSTs purificadas de hígado humano originalmente fueron designadas como α , β , γ , δ , ϵ , y fueron colectivamente llamadas como transferasas básicas o transferasas (α - ϵ). Posteriormente, se encontró una nueva GST denominada μ , y un tercer tipo, la GST π , que corresponde a la GST encontrada en placenta, pulmones y riñones, entre otros órganos. En consecuencia, se clasifica a las varias GST citosólicas de mamífero en tres clases diferenciadas por su estructura: las clases α , μ y π [90].



Figura 19: Estructura de la GST μ 2 humana. Se observan, representadas en diagrama de cintas, las dos subunidades proteicas coloreadas con gradiente de colores (código 3GUR) [10, 11].

Las enzimas citosólicas son dímeros, formadas por subunidades idénticas o diferentes pero siempre de la misma familia (*Figura 19*) [7]. La GST dimérica funcional presenta un sitio de unión para GSH y uno para el sustrato electrofílico por cada subunidad. El sitio de unión a GSH presenta una alta especificidad, aunque algunos derivados como homoglutatión y γ -glutamilcisteína pueden funcionar como sustratos alternativos [90]. GSTs estructuralmente similares muestran actividades específicas altas con ciertos compuestos característicos. Por ejemplo, la clase μ es altamente reactiva con epóxidos [90]. En esta clase de enzimas se han identificado dos residuos de tirosina en el sitio activo que participan en la catálisis. La tirosina 6 estabiliza el tiolato nucleofílico GS⁻ mientras que la tirosina 115 actúa como electrófilo en las reacciones de apertura de anillos de epóxido. Además, esta última juega un papel estructural en el sitio activo [91].

2.6. Hipótesis

Debido a la alta afinidad que presenta la enzima GST por el GSH, esta es utilizada normalmente como módulo en proteínas de fusión recombinantes al permitir una fácil purificación por cromatografía de afinidad en resinas de glutatión inmovilizado. El gen de GST utilizado en el desarrollo de vectores pGEX para la expresión de estas proteínas de fusión fue originalmente clonado del helminto *Schistosoma japonicum*, cuya GST está relacionada a la clase μ de mamíferos (ver *Anexo*).

Considerando que la GST sirve para purificar proteínas recombinantes por unión selectiva a una fase estacionaria con GSH inmovilizado, se plantea que podría ser posible alternar su rol y utilizarla como fase estacionaria que interaccione con el GSH de proteínas glutationiladas que se encuentren en la fase móvil. Es nuestra hipótesis que distintas GST pertenecientes a la clase μ pueden ser entonces utilizadas para capturar proteínas glutationiladas, y en particular hemoglobina, destacada por su calidad de indicador de estrés oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Capturar proteínas glutacioniladas selectivamente utilizando como herramienta a la enzima GST.

3.2. Objetivos específicos

Producción de proteínas glutacioniladas y determinación de su glutacionilación. Se trabajará sobre todo con hemoglobina y alternativamente con albúmina. Los niveles de glutacionilación obtenidos se determinarán por medio de técnicas de HPLC.

Captura de proteínas glutacioniladas utilizando GST proveniente del parásito *Echinococcus granulosus*. Esta GST, relacionada a la clase μ de mamíferos, será anclada a diferentes resinas de sefarosa para intentar capturar las proteínas glutacioniladas en un ensayo en batch.

Detección de Hb-SG por medio de GST biotinilada proveniente del parásito *Schistosoma japonicum*. Una vez biotinilada, esta GST también relacionada a la clase μ de mamíferos se empleará a modo de sonda de detección de proteínas glutacioniladas en ensayos de dot blot.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y equipos

Se utilizaron reactivos obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EEUU) y Applichem (Darmstadt, Alemania). Las resinas empleadas para cromatografía de intercambio iónico y ensayos de captura, así como las columnas de gel filtración, provinieron de GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Reino Unido). Los filtros utilizados se obtuvieron de Corning Inc. (Corning, Nueva York, EEUU) y GE Healthcare. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent, Santa Clara, California, EEUU). En todos los geles de poliacrilamida realizados se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) See Blue Plus 2 de Thermo-Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU), a menos que se especifique lo contrario, y en todos los casos se reveló con Coomassie Colloidal Blue.

4.2. Obtención de muestras

Los concentrados de glóbulos rojos se obtuvieron del Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas de la Universidad de la República, previo consentimiento informado de los donantes. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de dicho Hospital. Para la obtención de los concentrados de sangre total donada se mezcla en el momento de la extracción con una solución de citrato, fosfato y dextrosa (CPD) (3.27 g/L ácido cítrico, 26.3 g/L citrato trisódico, 2.51 g/L fosfato de sodio y 25.5 g/L glucosa), para evitar su coagulación. Posteriormente se centrifugaron a 2200 rpm en una centrífuga de bolsas de transfusión Roto Silenta 63RS (Hettich, Alemania) a 20 °C, para separar el plasma y las plaquetas de los glóbulos rojos, los cuales se almacenan a una densidad de 8.77 g/L en una solución denominada SAGM (NaCl 8.8 g/L, glucosa 8.2 g/L, manitol 5.2 g/L y adenina 0.3 g/L; OPTISOL, Terumo Corporation, Tokio, Japón). Procedimiento realizado por el personal del Hospital de Clínicas.

4.3. Purificación de hemoglobina

Se partió de sangre humana, de la cual se separaron los glóbulos rojos por centrifugación a 800 g, por 10 minutos. El enriquecido de glóbulos rojos fue lavado con solución isotónica (NaCl 150 mM) y luego fue suspendido en la misma, con posterior centrifugación y descarte del sobrenadante. Esto se llevó a cabo un total de 3 veces. Para lisar los glóbulos rojos, se agregó un volumen equivalente de agua destilada, y luego se disolvió en buffer Tris 50 mM pH 8.3 con EDTA 0.1 mM (buffer de inicio).

Para la purificación de hemoglobina a partir del lisado de glóbulos rojos se utilizó una resina DEAE Sepharosa CL-6B montada en una columna para cromatografía. Esta fue previamente equilibrada con buffer de inicio.

Se utilizó buffer de inicio para eluir todo el material que no quedó retenido en la columna, y posteriormente se eluyó la muestra con un gradiente de pH entre 8.3 y 7.0, alcanzado este último con el agregado de buffer Tris 50 mM pH 7.0 con EDTA 0.1 mM (buffer final).

Una vez recolectadas las fracciones eluidas, se determinó la concentración de hemoglobina en las mismas. Esto se realizó a través de la medición de absorbancia a $\lambda=630$ nm y $\lambda=577$ nm, dado que para una solución formada por una mezcla de oxiHb y metHb, las concentraciones se pueden obtener a partir de las siguientes fórmulas:

$$[\text{oxiHb}] (\mu\text{M}) = 66 \text{ Abs}_{577} - 80 \text{ Abs}_{630}$$

$$[\text{metHb}] (\mu\text{M}) = 279 \text{ Abs}_{630} - 3 \text{ Abs}_{577}$$

4.4. Glutacionilación de proteínas

Se preparó una solución de GSSG 200 mM en agua con adición de NaOH 400 mM para promover la solubilización. La glutacionilación de hemoglobina se llevó a cabo incubando 200 μM de la misma con 20 mM de GSSG en buffer fosfato 100 mM pH 7.4 con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 100 μM . Esto se dejó reaccionando toda la noche a 4 °C [92].

Se trabajó además con HSA. Esta fue reducida previamente a realizar la glutacionilación. Se incubó 1 mM de proteína con 10 mM de β -mercaptoetanol (β ME) en buffer fosfato con DTPA, por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se separó la proteína del reductor por medio de una gel filtración en

columna PD10, durante la cual se cambió el buffer en el que estaba disuelta la proteína a un buffer acetato 100 mM pH 4.5 con DTPA 100 μ M. Se determinó la concentración proteica de las fracciones recolectadas por medición de absorbancia a $\lambda=279$ nm ($\epsilon=0.531$ (g/L) $^{-1}$ cm $^{-1}$) [92, 93].

La glutationilación de la HSA se realizó de manera similar que para la hemoglobina, pero en buffer acetato con DTPA a pH 4.5. En general, cuanto más alcalino sea el pH de la mezcla más rápido se dará el intercambio tiol-disulfuro (de ahí el pH 7.4 utilizado para la hemoglobina), pero en el caso de la HSA se encuentra puesta a punto la reacción a pH más ácidos [92].

Luego de la incubación se separó el GSSG de la proteína por medio de gel filtración en PD10. Para esta se utilizó buffer fosfato pH 7.4. Se midió posteriormente la concentración de proteína en las fracciones eluidas. Esto se realizó tanto para la hemoglobina como para la HSA.

4.5. Determinación de GSH por mBrB

Para confirmar la glutationilación de las proteínas se las hizo reaccionar con DTT en orden de reducir el enlace disulfuro que las une al GSH. Este luego puede ser detectado por medida de fluorescencia si se lo conjuga a monobromobimano (mBrB), al dar lugar a un compuesto con un máximo de absorción a 396 nm y un máximo de emisión a 482 nm (Figura 20). Para llevar esto a cabo se preparó una solución de mBrB de 20 mM en acetonitrilo.

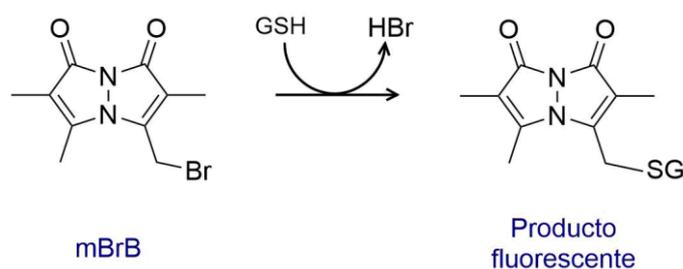


Figura 20: Reacción de mBrB con GSH. El producto obtenido presenta un máximo de emisión a $\lambda=482$ nm [53].

Se incubó, por un lado, 44.5 μ M de Hb-SG con 0.2 mM de DTT, y por otro 50 μ M de HSA glutationilada (HSA-SG) con 0.2 mM de DTT. En ambos casos se dejó reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se filtró durante 10 minutos a 15000 g

usando filtros Spin X UF de tamaño de poro de 5 kDa para obtener la fracción conteniendo al GSH.

En el caso de la hemoglobina, se diluyó lo obtenido 1:2.5, y se tomó 20 μ l para reaccionar con mBrB 0.2 mM. Se realizó lo mismo con la HSA sin la dilución previa.

A modo de control, se filtraron las proteínas sin ser reducidas y se tomaron 20 μ l de la fracción filtrada para reaccionar con 4 μ l de DTT 1 mM. Luego de incubar 30 minutos a temperatura ambiente se le agregó mBrB 0.2 mM. Con esto se buscó determinar el contenido de GSSG residual para evitar sobreestimar el porcentaje de glutationilación.

Las muestras fueron analizadas por medio de un HPLC 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent), utilizando una columna de fase reversa C18 y un flujo de 0.8 ml/min. Las fases móviles utilizadas fueron A: ácido acético 0.25% en agua y B: metanol. El método empleado consistió en 10% de B durante 0-2 minutos, 100% de B durante 18-21 minutos y 10% de B durante 22-28 minutos. El volumen de muestra inyectado fue de 5 μ l. La detección se hizo mediante medición de fluorescencia a λ_{ex} =396 nm y λ_{em} =482 nm, con un blanco consistiendo en mBrB en ausencia de GSH [58].

La curva de calibración se realizó utilizando diferentes concentraciones de GSH en un rango de 0-50 μ M, haciéndolo reaccionar, al igual que las muestras, con 0.2 mM de mBrB y fue analizado en las mismas condiciones.

4.6. Control de calidad de proteínas

4.6.1. Cuantificación de GST de *E. granulosus*

Se partió de GST recombinante de *Echinococcus granulosus* expresada en una cepa BL21(DE3) transformada con el plásmido O16058_ECHGR y purificada en el laboratorio como descrito [94]. Previamente a la cuantificación se centrifugó la proteína por 10 minutos a 10000 g para sedimentar fracciones agregadas.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford. Para la curva de calibración se emplearon diluciones en un rango de 0-60 μ g/ml de un estándar de lisozima 0.1 mg/ml.

Las muestras analizadas consistieron en triplicados de tres diluciones diferentes de GST: una de ellas con una concentración estimada de 30 μ g/ml, otra 5 veces más concentrada, de 150 μ g/ml, y otra 5 veces más diluida, de 6 μ g/ml. Estas concentraciones estimadas se calcularon a partir de la medición de absorbancia a

$\lambda=280$ nm, considerando un coeficiente de extinción molar teórico $\epsilon= 41400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ProtParam, ExpASY Bioinformatics Resource Portal) [95].

Tanto las muestras como la curva de calibración se incubaron con 200 μl de reactivo de Bradford en una placa de 96 pocillos, y se midió la absorbancia de todas ellas a $\lambda=595$ nm en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo-Fisher Scientific).

4.6.2. Determinación de actividad enzimática de GST

Para la medida de actividad se utilizó 1 μl de GST con 2 mM de GSH en buffer fosfato 100 mM pH 6.5. La reacción fue iniciada con el agregado de 2 mM de clorodinitrobencono (CDNB), compuesto que es capaz de conjugarse a GSH mediante reacción catalizada por GST, formando un producto que absorbe a $\lambda=340$ nm ($\epsilon= 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [94] (Figura 21). Para determinar la actividad de la GST, se midió la absorbancia a esta longitud de onda cada 10 segundos durante 2 minutos.

Se llevó a cabo un control de la reacción en ausencia de catálisis enzimática en las mismas condiciones, sin el agregado de GST.

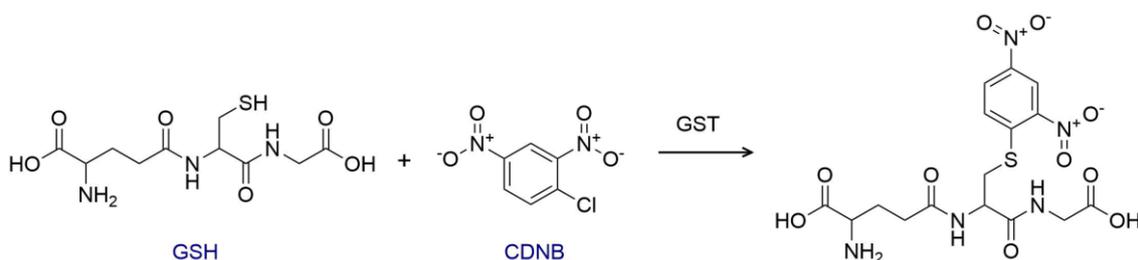


Figura 21: Reacción de CDNB y GSH catalizada por GST. El producto obtenido presenta un máximo de absorbancia a $\lambda=340$ nm [53].

4.6.3. Electroforesis

Se corrió un gel de poliacrilamida, con gel de resolución 15% y stacking 5%, en condiciones desnaturizantes y no reductoras. Se sembró tanto la GST, para evaluar su pureza e integridad, como hemoglobina glutationilada y sin glutationilar. Las muestras fueron incubadas previamente con buffer de muestra (Tris-HCl pH 6.8 con 34.7 mM SDS) y fueron corridas a 30 mA en buffer de electrodo (Tris-glicina pH 8.3) [96].

4.7. Captura por IMAC-Sefarosa

Para la captura de proteínas glutationiladas se utilizó una resina Ni Sepharose Fast Flow 6 en batch acomplejada con GST. De manera de obtener esta unión se incubaron 50 μ l de resina con 500 μ l de GST en buffer fosfato 50 mM pH 8 con NaCl 500 mM (buffer de unión), durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, para eliminar toda la GST no unida, se hicieron 3 lavados con buffer de unión. Resultados previos mostraron que la EgGST se une completamente en estas condiciones [94].

En general, la proteína a ser capturada se agregó en conjunto con buffer de unión, asumiendo una unión 1:1 con la GST. Se dejó establecer la interacción por 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Una vez pasadas las 2 horas, se hicieron 5 lavados con buffer de unión para eluir todos los componentes de la muestra que no establecieron una interacción específica con la enzima, recolectando dichas fracciones. La elución se realizó a través del agregado de GSH 10 mM en buffer de unión, con una incubación de 10 minutos en agitación a temperatura ambiente.

La hemoglobina fue previamente gel filtrada en columna PD10, utilizando buffer de unión. Se realizó, además, un control del ensayo en las mismas condiciones con hemoglobina reducida con β ME para determinar si existen interacciones con la GST no relacionadas con el GSH.

En el caso de la HSA, se realizó el ensayo con proteína glutationilada, y también con HSA reducida con β ME y HSA sin reducir.

4.7.1. Análisis de eficiencia

La fracción no unida a la GST, los lavados y el eluido se corrieron, en todos los ensayos, en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no reductoras.

En los ensayos realizados con HSA la composición del gel de resolución fue de poliacrilamida 12.5% y stacking 5%, y en los realizados con hemoglobina se utilizó un gel de resolución 15% y stacking 5%. En todos los casos las muestras fueron incubadas previamente con buffer de muestra y fueron corridas a 30 mA en buffer de electrodo.

4.8. Captura por sefarosa activada con CNBr

Para este ensayo de captura alternativo se usó una resina CNBr-activated Sepharose 4B en batch. Se utilizaron 50 mg de resina (previamente lavada con HCl 1 mM) que se incubaron con 400 μ l de GST en buffer NaHCO_3 0.4 M pH 8.3 con NaCl 2 M, llegando a un volumen final de 600 μ l. Se hicieron sucesivos lavados para desprender toda la GST no unida alternando pH 8.3 y pH 4, usando el buffer NaHCO_3 y ácido acético/acetato de sodio 0.1 M pH 4 con NaCl 0.5 M. Por último se lavó con buffer fosfato 100 mM pH 7.5 con DTPA 0.1 mM y NaCl 500 mM.

Una vez acoplada la GST a la resina, se agregaron 200 μ L de Hb-SG 94 μ M en buffer fosfato y se dejó incubando toda la noche en cámara fría. Los lavados para eluir la hemoglobina no unida se realizaron también con buffer fosfato, y la elución de la hemoglobina unida específicamente a la GST se llevó a cabo con 10 mM de GSH disuelto en buffer NaHCO_3 , dejándolo reaccionar con la GST 10 minutos a temperatura ambiente.

Este procedimiento se realizó además, a modo de control, con hemoglobina reducida con β ME, no glutationilada.

Se llevó a cabo, en paralelo, un ensayo en las mismas condiciones pero con una resina control. En este caso, la resina se incubó con un volumen equivalente de agua y buffer NaHCO_3 , en lugar de GST, para determinar si se establecen interacciones entre la hemoglobina (glutinationilada o no glutationilada) y la fase estacionaria.

4.8.1. Análisis de eficiencia

Al igual que en los ensayos de captura por IMAC-Sefarosa, la fracción no unida a la GST, los lavados y el eluido se corrieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no reductoras. La composición del gel de resolución fue de 15% y la del gel de stacking 5%. Las muestras fueron incubadas con buffer de muestra y fueron corridas a 30 mA en buffer de electrodo.

4.9. Preparación de GST biotinilada de *Schistosoma japonicum*

4.9.1. Purificación de GST de *S. japonicum*

Se partió de una muestra de GST de *S. japonicum* obtenida de la expresión de cistationina β -sintasa recombinante, a partir del plásmido pGEX4T1/hCBS Δ C143 en una cepa BL21(DE3) de *E. coli*, por Dayana Benchoam y Ernesto Cuevasanta [97]. La GST se utiliza como módulo en proteínas de fusión para facilitar la purificación, pudiendo posteriormente ser cortada de la proteína de interés utilizando trombina.

La SjGST fue concentrada utilizando filtros de 10 KDa de corte, centrifugando a 7000 g en varias tandas de 30 minutos, siempre a 4 °C.

En un paso siguiente, la SjGST concentrada se purificó en dos tandas (primero una parte de la muestra y luego otra) por medio de gel filtración con una columna Superdex 200 16/60 unida a un equipo ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences) de purificación proteica. Los valores de flujo y presión usados correspondieron a 1 ml/min y 0.30 MPa, respectivamente, y la detección se realizó por medio de medición de absorbancia a 280 nm. La SjGST fue centrifugada 10 minutos a 10000 g previamente a ser inyectada en la columna.

Las fracciones obtenidas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15% con stacking 5%, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, para determinar la presencia y pureza de la proteína en las mismas. Las muestras fueron previamente incubadas con buffer de muestra con agente reductor (Tris-HCl pH 6.8 con 34.7 mM SDS y 2.5% β ME, 100 °C), y fueron corridas a 30 mA en buffer de electrodo. En este caso el MPM utilizado fue Sigma Marker Wide Range 6.5-200 kDa (Sigma-Aldrich).

Una vez seleccionadas las fracciones con GST, estas se juntaron y a la mezcla resultante se le calculó la concentración proteica por medio de la medición de absorbancia a 280 nm. Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática como el realizado anteriormente para la GST de *E. granulosus* (ver sección 4.5.2. *Determinación de actividad enzimática de GST*).

4.9.2. Biotinilación de GST

De manera de poder biotinar la proteína, fue necesario previamente formar biotina-N-hidroxisuccinimida (biotina-NHS). Para esto se incubaron 100 μ l de biotina 900 mM, 100 μ l de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 900 mM y 100 μ l de NHS 900 mM por 2.5 horas aproximadamente, en agitación y a temperatura ambiente (*Figura 22A*). Todas las soluciones se realizaron en dimetilformamida.

La biotinilación se realizó sobre la GST unida a una resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow en batch, en orden de bloquear el sitio activo y evitar la biotinilación del mismo (*Figura 22B*). La resina fue previamente equilibrada con buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, e incubada con 1 ml de GST de 69.3 μ M por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego de realizar sucesivos lavados con buffer se agregó la biotina-NHS en 5 tandas, cada una de ellas con 2.8 mM de concentración y 5-10 minutos de incubación. Se lavó con buffer nuevamente, y se pasó a la etapa de elución por medio del agregado de GSH 10 mM. Esto se realizó tres veces, incubando cada vez 10 minutos y colectando la fracción liberada.

Una vez finalizado este ensayo, se tomaron todas las fracciones obtenidas (GST no unida a la resina, lavados, biotina no unida a GST y eluidos) y se les hizo una prueba semi-cuantitativa de presencia de proteína. Para cada muestra se tomaron 10 μ l y se mezclaron con 10 μ l de reactivo de Bradford para observar el cambio de color de marrón a azul en caso de haber proteína, siendo este azul más intenso con mayores concentraciones proteicas.

Frente a estos resultados, se eligieron las fracciones de eluido que mostraron mayor contenido proteico. A la mezcla de las mismas se le realizó un espectro de absorbancia y se calculó la concentración de proteína en base al valor de absorbancia a 280 nm.

Para confirmar la ocurrencia de biotinilación y averiguar la eficiencia de la misma se utilizó un FluoReporter Biotin Quantitation Assay Kit (Thermo-Fisher Scientific).

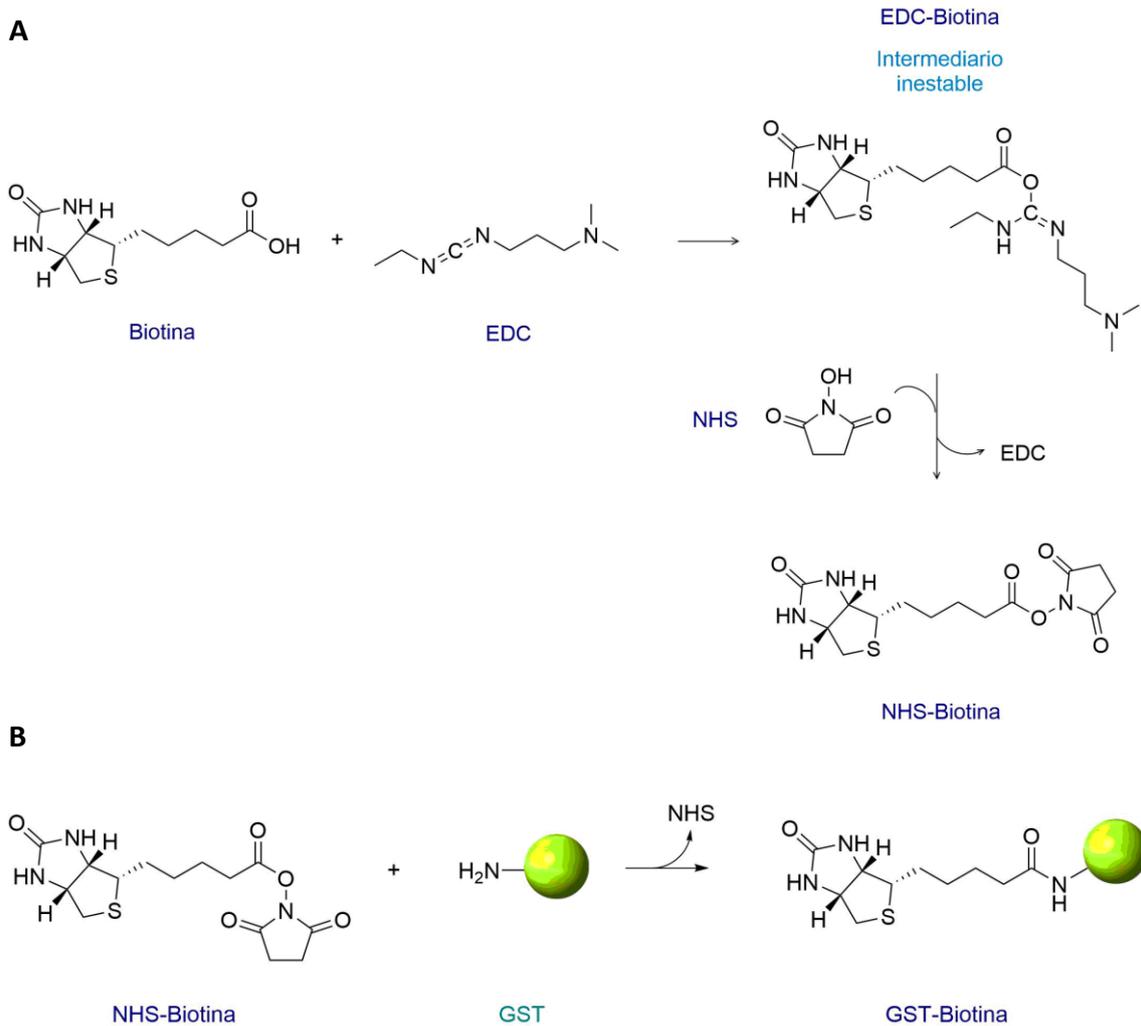


Figura 22: Reacciones que involucran a biotina-NHS. A. Formación del N-hidroxisuccinimidil ester de biotina a partir de la activación del carboxilato por medio de EDC. **B.** Reacción de biotinilación de la GST utilizando la biotina-NHS como agente [53].

Se realizaron diferentes diluciones de la muestra y para cada una se incubaron 50 μ l de la misma con 50 μ l de reactivo Biotective Green por 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se midió la intensidad de fluorescencia, con $\lambda_{\text{ex}}=485$ nm y $\lambda_{\text{em}}=530$ nm.

La curva de calibración para determinar la concentración de biotina en las muestras se realizó con diferentes concentraciones de biocitina –análogo de la biotina-, en un rango entre 0 y 0.8 μ M.

4.10. Dot blot con GST biotinilada

Para la detección de proteínas glutationiladas por GST biotinilada se utilizó una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences).

Previo al ensayo, la GST-biotina fue lavada para liberarla del GSH con el que se eluyó durante la etapa de biotinilación. El lavado se realizó utilizando filtros Vivaspin 500 (GE Healthcare) con 10 kDa de corte, centrifugando 3 veces a 14000 g por 10 minutos con el posterior agregado de buffer 50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl pH 7.4.

La membrana fue previamente activada con metanol 100% y equilibrada en TBS-Tween (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.6% Tween pH 7.4). A las proteínas se las trató con 1% SDS y se las calentó a 100 °C por 3 minutos antes de ser sembradas, en orden de favorecer la desnaturalización y retención de las mismas en la membrana. Se sembraron 2 µl de Hb-SG 636 µM, así como de hemoglobina sin glutationilar 553 µM y GST-Biotina 13.6 µM como controles, y luego se sometió a la membrana a vacío sobre un papel de filtro con el mismo objetivo.

El bloqueo de sitios no específicos en la membrana se realizó con una solución TBS-Tween-1% BSA, y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Posteriormente, se agregó aproximadamente 70 µg/ml de GST-biotina diluida en la solución de bloqueo y se dejó nuevamente en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween.

En un último paso se incorporó Streptavidina-Alexa Fluor 680 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EEUU) diluido 1/1000 en solución de bloqueo, en orden de detectar aquellos sitios donde se unió la GST por medio de la interacción Biotina-Streptavidina. La incubación en este caso se realizó en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación. Al cabo de 45 minutos se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween y se dejó la membrana en TBS lista para ser revelada.

El revelado de la membrana se llevó a cabo en un G:Box Chemi XT4 (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de GSH por mBrB

Una vez glutationiladas la HSA y hemoglobina, se procedió a determinar la eficiencia de esta glutationilación. Para esto se redujo las proteínas con DTT. El GSH liberado por acción del reductor es capaz de conjugarse a mBrB, dando lugar a un compuesto con un máximo de absorción a 396 nm y un máximo de emisión a 482 nm, que puede ser separado por HPLC utilizando una columna de fase reversa.

De este modo, se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de GSH para poder identificar el perfil cromatográfico del mismo y determinar posteriormente su concentración en las muestras de interés (*Figura 23*).

Se determinó que el mismo eluye a los 6.5 minutos en las condiciones en que se realizó el ensayo, a partir de la detección de un pico cuya área crece con el aumento en la concentración de GSH, y el cual no está presente en el blanco (con mBrB y 0 μM de GSH).

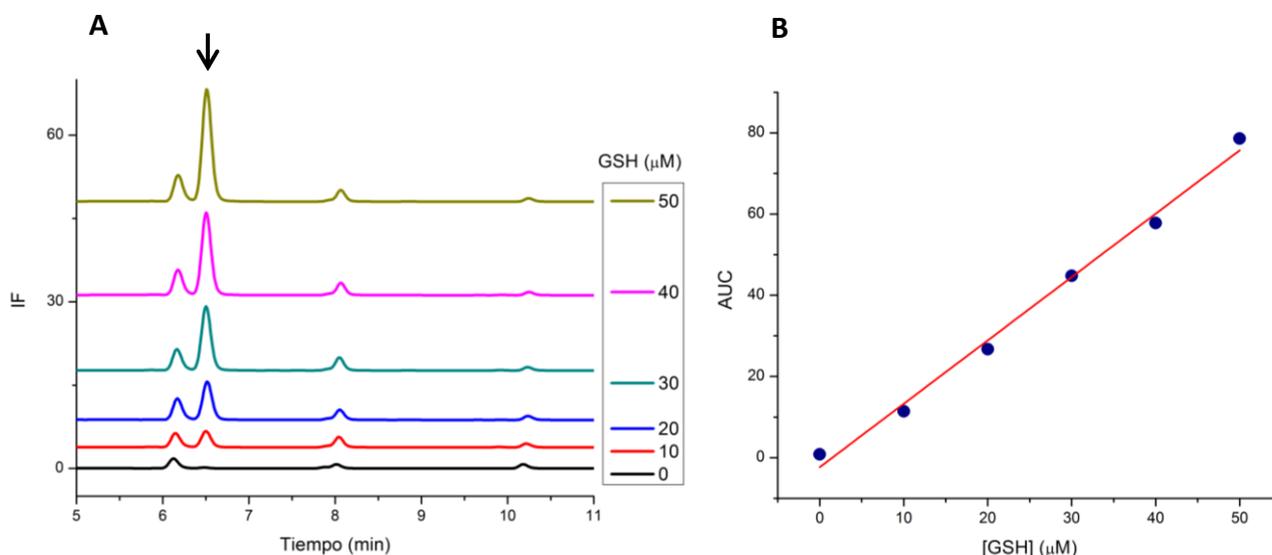


Figura 23: Control de GSH conjugado a mBrB. A. Perfil cromatográfico de concentraciones crecientes de GSH, visto en un gráfico de intensidad de fluorescencia (IF) en función del tiempo. La flecha señala el pico correspondiente al GSH. B. Curva de calibración: área bajo la curva (AUC) en función de concentración de GSH.

Teniendo esta información, se procedió a analizar las muestras conteniendo el GSH liberado por las proteínas al ser reducidas, así como las fracciones obtenidas de la

filtración de las proteínas glutationiladas sin reducir. Esto se realizó como control, de modo de detectar la posible presencia de GSSG remanente y evitar sobreestimar el porcentaje de glutationilación.

Según los resultados obtenidos, las dos proteínas resultaron glutationiladas con el método utilizado, confirmado por la aparición del pico en el minuto 6.5 del cromatograma, ausente en el blanco y en la muestra con DTT (*Figura 24*). Sin embargo, el porcentaje de glutationilación varió ampliamente entre una y otra. En el caso de la HSA, la concentración total de GSH detectada fue de 18.3 μM . Cuando se corrigió con el valor de GSH obtenido para el control se obtuvo una concentración de 10.9 μM que, en relación con la concentración de proteína (50 μM), dio un porcentaje de glutationilación de 22%. Para la hemoglobina la concentración de GSH obtenida fue de 139.3 μM , y al ser corregida con el control arrojó un valor de 120.7 μM . Esto equivale a un porcentaje de glutationilación de 270%, cuando se considera la concentración total de hemoglobina (44.5 μM).

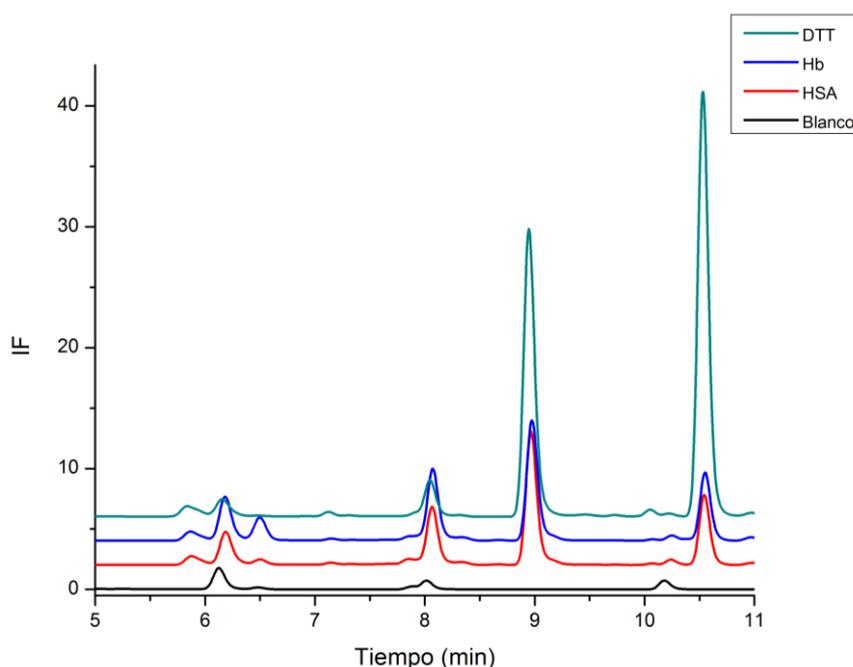


Figura 24: Perfil cromatográfico de las muestras. Gráfico de intensidad de fluorescencia (IF) en función del tiempo, con el control de DTT en verde, el blanco con mBrB en negro, la hemoglobina en azul y HSA en rojo.

Sin embargo, en el total de sus cuatro subunidades la hemoglobina presenta seis grupos tiol, por lo que en una situación de máxima glutationilación habrá 1.5 moléculas de GSH por cada subunidad. Por lo tanto, bajo estas condiciones, se esperaría un 150% de glutationilación.

Dado que el porcentaje de glutationilación de la hemoglobina obtenido supera el valor máximo esperado, se puede pensar que la purificación por gel filtración luego de la glutationilación o las filtraciones de control sin previa reducción con DTT no fueron eficientes, detectándose entonces GSSG residual que interaccionó con mBrB. Esto se tuvo en cuenta en ensayos posteriores, donde se sometió a la hemoglobina a un paso adicional de purificación por gel filtración.

5.2. Control de calidad de proteínas

El método de captura de proteínas glutationiladas se basa en la enzima GST, por lo que resultó fundamental la confirmación de su integridad y presencia de actividad. Para esto se llevó a cabo su cuantificación y ensayo de actividad enzimática, en conjunto con la observación de la misma en un gel de poliacrilamida.

5.2.1. Cuantificación de glutatión S-transferasa

La cuantificación de GST se realizó mediante el método de Bradford, utilizando un estándar de lisozima para la elaboración de la curva de calibración (*Figura 25*). Esta permitió obtener los valores de concentración de proteína a partir de mediciones en la absorbancia a $\lambda=595$ nm de tres diluciones distintas de proteína.

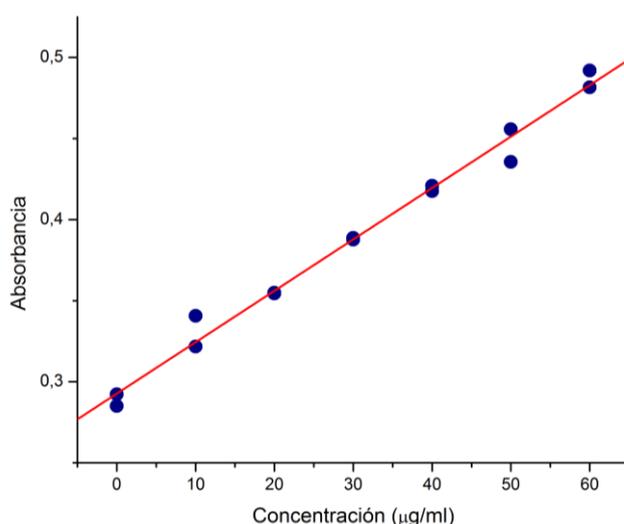


Figura 25: Curva de calibración del método de Bradford. Gráfico de absorbancia a $\lambda=595$ nm en función de concentración proteica ($y=0.003x + 0.293$).

Se tomó el promedio de estos resultados de absorbancia y se calculó la concentración real de proteína a partir del mismo. El valor obtenido fue de 2.25 mg/ml, siendo muy similar al valor que se llegó por medición de absorbancia a $\lambda=280$ nm, que fue de 2.38 mg/ml.

5.2.2. Determinación de actividad enzimática de GST

La medida de actividad enzimática se realizó incubando a la GST con GSH, iniciándose la reacción con el agregado de CDNB. Se realizaron mediciones de absorbancia a $\lambda=340$ nm durante 2 minutos para detectar la formación de producto. Se realizó, además, un control de la reacción en ausencia de enzima (*Figura 26*).

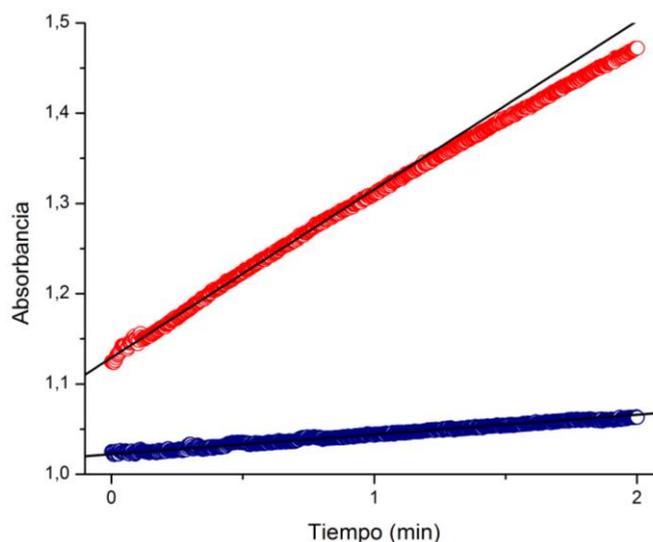


Figura 26: Determinación de actividad enzimática de GST. Seguimiento de la absorbancia a $\lambda=340$ nm en el tiempo, en presencia (rojo) y ausencia (azul) de enzima.

Los resultados mostraron valores de absorbancia crecientes con el paso del tiempo, indicando la formación de producto y presencia de actividad enzimática.

Al corregirse con el control sin enzima se obtuvo una actividad específica igual a 7.56 U/mg. Este valor es superior al valor reportado, siendo este último 2.50 U/mg [98], pero se mantiene en el mismo orden. Esta diferencia probablemente esté dada por diferencias en el método de cuantificación proteica.

5.2.3. Electroforesis

Una vez confirmada la conservación de actividad enzimática de la GST, se procedió a analizar su integridad y pureza por medio de un gel desnaturalizante de poliacrilamida 15% (*Figura 27*). Se realizó también un control de calidad de la hemoglobina, analizando tanto hemoglobina reducida como glutationilada, dado que esta sería utilizada posteriormente en los ensayos de captura.

Se observó que la hemoglobina reducida y la hemoglobina glutationilada presentan la misma movilidad electroforética, manifestándose una banda marcada de aproximadamente 16 kDa en ambos casos correspondiente al monómero. Se detectó además, tanto en la reducida como en la glutationilada, una segunda banda de mayor tamaño que podría estar correspondiendo a la formación de dímeros de hemoglobina oxidada. Desde el punto de vista de la pureza, no parecieron haber otros contaminantes presentes.

La GST mostró también una banda marcada, en este caso de alrededor de 25 kDa. Esto indicó que la enzima no se encontraba degradada, lo cual concuerda con la confirmación de presencia de actividad. Además de esta banda identificada como la GST propiamente dicha, se vio una serie de bandas de mayor tamaño. La principal hipótesis es que se trata de contaminantes, pudiéndose mejorar esto con una gel filtración de la enzima para mejorar su pureza. Sin embargo, a juzgar por los pesos moleculares, no se puede descartar que estas bandas correspondan a agregados multiméricos formados por uniones covalentes por sobreoxidación de la enzima. Para poder, eventualmente, diferenciar esto de especies contaminantes se podría utilizar técnicas de espectrometría de masa o de western blot.

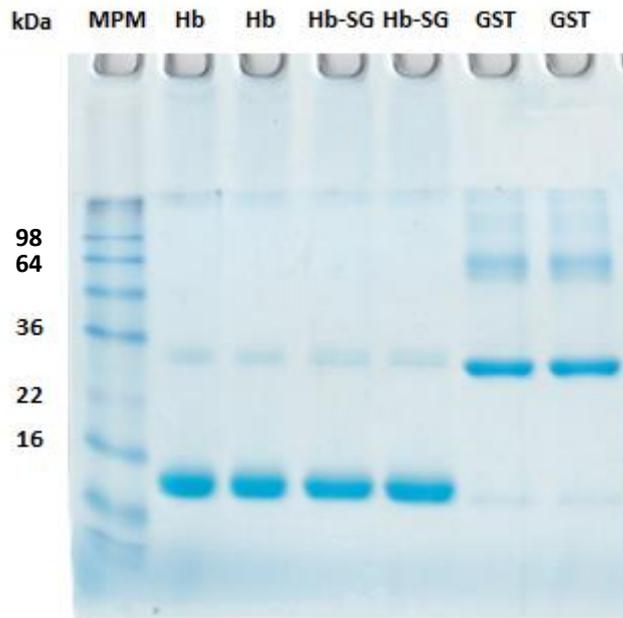


Figura 27: Análisis electroforético de las proteínas. De izquierda a derecha se muestra: en el primer carril, el MPM, dos carriles con hemoglobina, dos carriles con hemoglobina glutationilada y dos carriles con glutatión S-transferasa.

5.3. Captura por IMAC-Sefarosa

El ensayo de captura consistió en la utilización de GST como un “anzuelo” de proteínas glutationiladas, por su capacidad de unir GSH en su sitio activo. Esta a su vez fue retenida por una resina de sefarosa con níquel, al formarse enlaces de coordinación entre el grupo imidazol de las histidinas de la cola de la GST y el metal en cuestión.

Se incubó, en batch, esta resina unida a GST y la proteína glutationilada, así como un control en paralelo con proteína reducida. Se espera que las proteínas glutationiladas interactúen específicamente con la GST y de ese modo permanezcan unidas a la resina, mientras que las proteínas que no presentan GSH en su estructura se eluyan con lavados. Para eluir las proteínas glutationiladas se utilizó GSH.

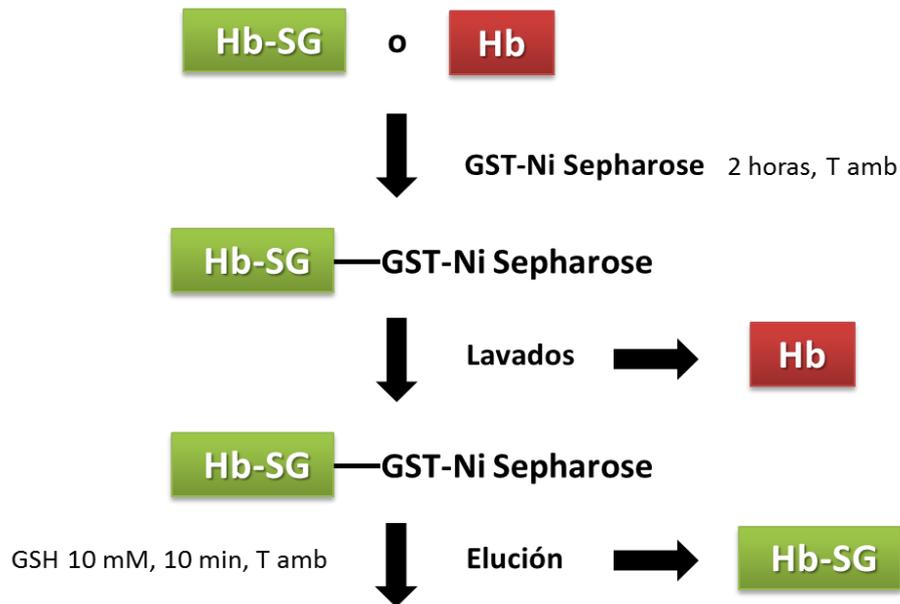


Figura 28: Esquema de ensayo de captura para hemoglobina.

El ensayo se realizó con hemoglobina y con HSA. Para analizar la eficiencia del mismo se corrieron las distintas fracciones eluidas en un gel de poliacrilamida y se observó el patrón de bandas obtenido (*Figura 29*).

El gel correspondiente a las fracciones obtenidas del ensayo con HSA glutationilada mostró un perfil de bandas que concuerdan con lo esperado. En el primer carril se sembró HSA reducida como referencia, y se vio una banda de alrededor de 64 kDa. En la fracción no unida se detectó gran cantidad de HSA (posiblemente atribuible a la saturación por alta concentración proteica), la cual continúa eluyendo con los lavados hasta llegar al lavado n°5. En ese punto la resina pareció haberse limpiado totalmente de proteína excedente. Con el eluido con GSH se esperó desprender proteína unida específicamente a la GST y, en efecto, se detectó HSA en dicha fracción.

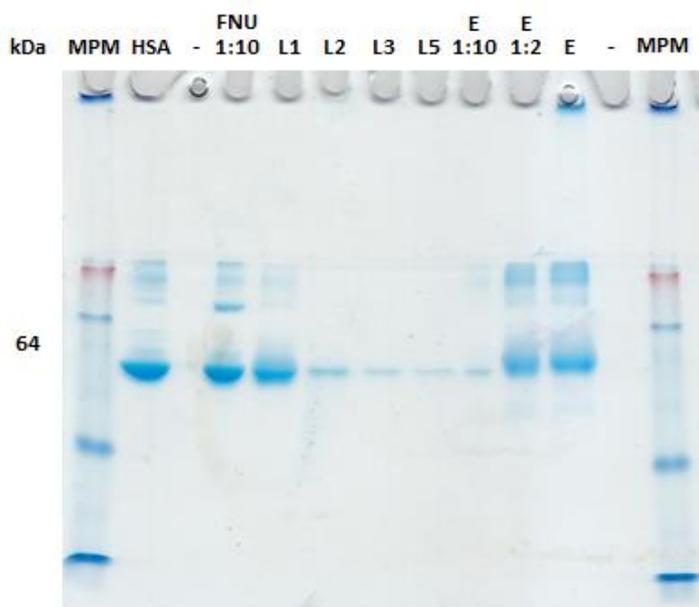


Figura 29: Análisis electroforético de las fracciones obtenidas del ensayo de captura de HSA-SG con GST unida a resina IMAC. De izquierda a derecha se muestra: MPM, HSA control, carril vacío, dilución 1/10 de la fracción no unida, lavados 1-5, dilución 1/10 del eluido, dilución ½ del eluido, eluido sin diluir, carril vacío, MPM.

Para validar este resultado, se analizó el control realizado con HSA no glutationilada (*Figura 30A*). Si se observa el gel correspondiente a las fracciones obtenidas con este ensayo control, se puede apreciar que el patrón de bandas es el mismo que con HSA-SG. Los lavados realizados disminuyeron la cantidad de proteína excedente detectada en la fracción no unida (aunque no totalmente), para luego eluir una gran proporción de la misma con el agregado de GSH, mecanismo ideado para desfavorecer interacciones específicas establecidas.

Una de las hipótesis para explicar este resultado podría ser que parte de la HSA utilizada como control se encuentra glutationilada. Esta fracción glutationilada podría, entonces, unirse a la GST y luego ser eluida con el agregado de GSH. Para descartar esta hipótesis, se realizó un control adicional con HSA pre-reducida con β ME para asegurar que no exista glutationilación (*Figura 30B*). El patrón de bandas mostrado en el gel correspondiente a este ensayo se mantuvo igual a los anteriormente realizados.

Uniendo estos resultados se puede pensar que la HSA está estableciendo interacciones inespecíficas, ya sea con la GST o con la resina. Considerando que la HSA es conocida por unir diferentes ligandos [93], se pasó entonces a probar el mismo procedimiento con hemoglobina.

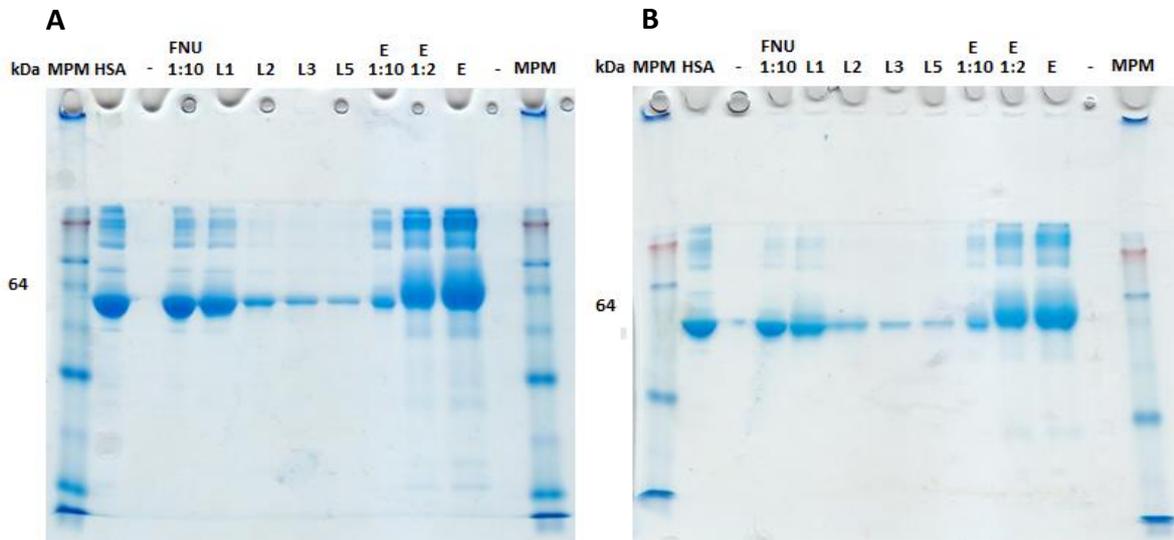


Figura 30: Análisis electroforético de las fracciones obtenidas de los ensayos de captura de HSA no glutationilada con GST unida a resina IMAC. A. Ensayo realizado con HSA no glutationilada sin reducir. **B.** Ensayo realizado con HSA no glutationilada pre-reducida con β ME. En ambos casos se muestra, de izquierda a derecha: MPM, HSA control, carril vacío, dilución 1/10 de la fracción no unida, lavados 1-3, lavado 5, dilución 1/10 del eluido, dilución 1/2 del eluido, eluido sin diluir, carril vacío, MPM.

Tanto para Hb-SG como hemoglobina reducida con β ME, el ensayo dio el mismo resultado (*Figuras 31 y 32*, respectivamente). En ambos casos la hemoglobina se unió completamente a la resina, pudiéndose ver a nivel macroscópico (la resina adquirió un color rojo) y también detectándose en el gel. Se corrió, al igual que con la HSA, hemoglobina como referencia en el primer carril. En este se observó una banda de alrededor de 16 kDa que no se volvió a detectar en ningún otro carril. Es decir, no fue posible eluir la hemoglobina (glutacionilada o no) ni con lavados ni con GSH libre.

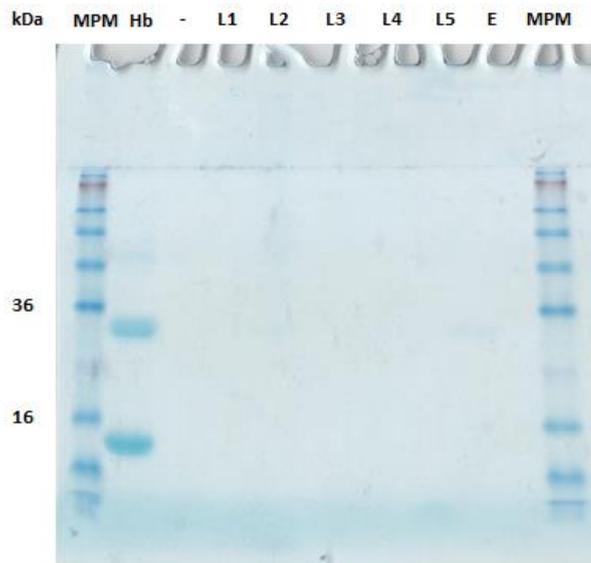


Figura 31: Análisis electroforético de las fracciones obtenidas del ensayo de captura de Hb-SG con GST unida a resina IMAC. Se muestra, de izquierda a derecha: MPM, hemoglobina control, carril vacío, lavados 1-5, eluido, MPM.

Al igual que lo visto en el gel de control de calidad de proteínas, la hemoglobina presentó una segunda banda cerca de 36 kDa atribuida a la formación de dímeros.

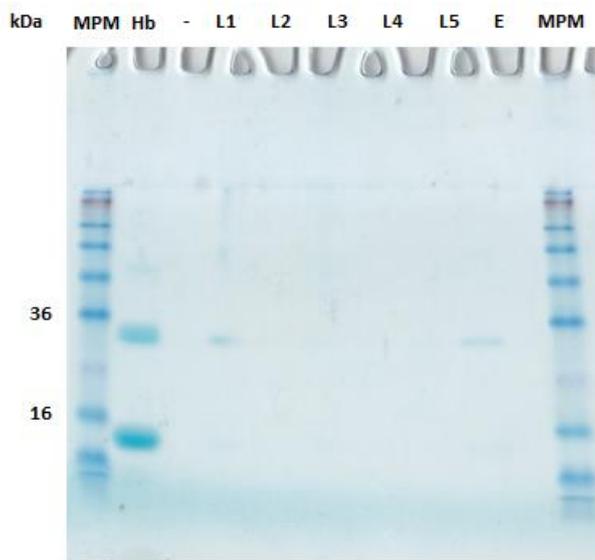


Figura 32: Análisis electroforético de las fracciones obtenidas del ensayo de captura de hemoglobina no glutationilada con GST unida a resina IMAC. Se muestra, de izquierda a derecha: MPM, hemoglobina control, carril vacío, lavados 1-5, eluido, MPM.

En conclusión, se puede decir que este método no resultó útil para capturar las proteínas glutacioniladas. Es posible que este tipo de resina esté interfiriendo con el ensayo, siendo la responsable de las interacciones inespecíficas, o que la GST utilizada

no tenga la capacidad de unir el GSH unido a proteínas por impedimento estérico o fallas en su plegamiento al estar adherida a la resina.

5.4. Captura por sefarosa activada con CNBr

Frente a los resultados negativos obtenidos con la resina de IMAC, se procedió a cambiar la plataforma de anclaje de la GST. A diferencia de la anteriormente utilizada, esta resina forma uniones covalentes con su ligando, inmovilizándolo por medio del método de bromuro de cianógeno. El ligando en cuestión puede ser cualquier molécula que contenga grupos amino primarios (como el grupo amino de los residuos de lisina y el N-terminal en proteínas), siendo aquí la GST.

En este caso el ensayo se realizó únicamente con hemoglobina, tanto glutationilada como el control en paralelo con hemoglobina reducida. Esta se incubó con el complejo resina-GST y se hicieron lavados para eluir toda la proteína no unida. La elución de la Hb-SG se llevó a cabo del mismo modo que los ensayos anteriores, con GSH libre.

Además, se llevó a cabo un ensayo en las mismas condiciones pero con una resina control. Esta fue incubada con un volumen equivalente de agua y buffer NaHCO_3 , en lugar de GST, para determinar si se establecen interacciones entre la hemoglobina (glutacionilada o no glutacionilada) y la fase estacionaria.

El análisis de eficiencia consistió también en la corrida de las fracciones obtenidas en un gel de poliacrilamida.

Los geles corridos con las fracciones obtenidas del ensayo con esta resina fueron iguales para la hemoglobina glutacionilada y reducida (*Figuras 33 y 34*, respectivamente). No se detectó proteína en ninguno de los lavados, ni tampoco en el eluido, observándose una banda correspondiente a la hemoglobina únicamente en la fracción no unida. Además se observó coloración roja en la resina durante todas las etapas del procedimiento, lo que señaló la unión de hemoglobina a la misma.

Frente a estos resultados se puede determinar que la proteína está siendo retenida inespecíficamente por la resina de sefarosa.

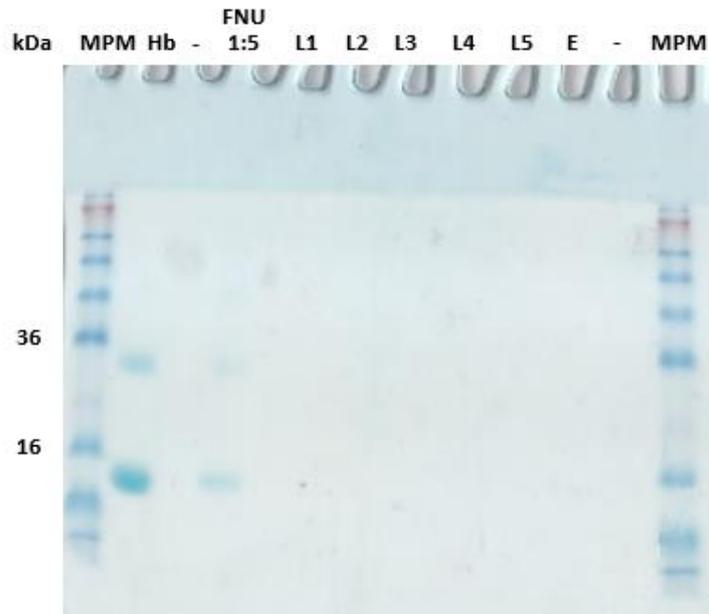


Figura 33: Análisis electroforético de las fracciones obtenidas del ensayo de captura de Hb-SG con GST unida a resina de sefarosa activada con CNBr. Se muestra, de izquierda a derecha: MPM, hemoglobina control, carril vacío, dilución 1/5 de la fracción no unida, lavados 1-5, eluido, MPM.

Más evidencia de esto se obtuvo en los resultados del ensayo realizado con la resina control, la cual también se coloreó de rojo (no se muestran estas imágenes).

Otro problema persistente durante el desarrollo de esta técnica fue la pérdida de resina en los lavados y el resto de los pasos en donde se necesitó de centrifugación. Esto pudo haber determinado la pérdida de proteína en conjunto con la resina, por falta de sedimentación total de la misma.

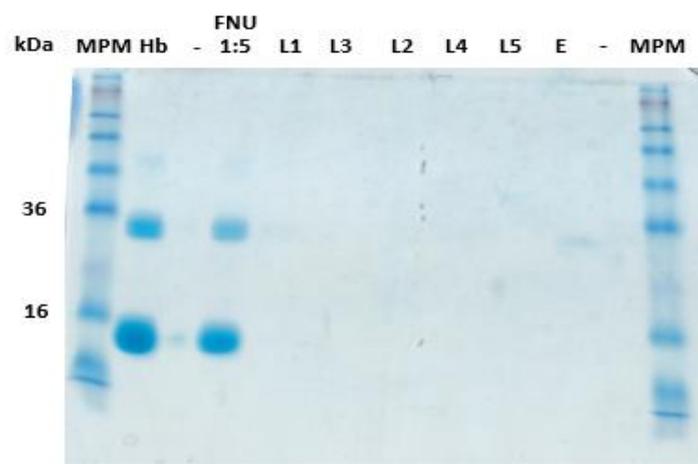


Figura 34: Análisis electroforético de las fracciones obtenidas del ensayo de captura de hemoglobina no glutationilada con GST unida a resina de sefarosa activada con CNBr. Se muestra, de izquierda a derecha: MPM, hemoglobina control, carril vacío, dilución 1/5 de la fracción no unida, lavados 1-5, eluido, MPM.

En conclusión, este método tampoco permitió la captura específica de Hb-SG. De todos modos, sigue siendo imposible descartar que el problema radique en la GST y su incapacidad de unir proteínas glutationiladas cuando es empleada en estas condiciones.

5.5. Preparación de GST biotinilada de *Schistosoma japonicum*

5.5.1. Purificación de GST de *S. japonicum*

Dos alícuotas de GST fueron purificadas por medio de gel filtración, luego de ser concentradas y centrifugadas. La *Figura 35* muestra el perfil electroforético de los picos obtenidos durante las dos cromatografías de las alícuotas.

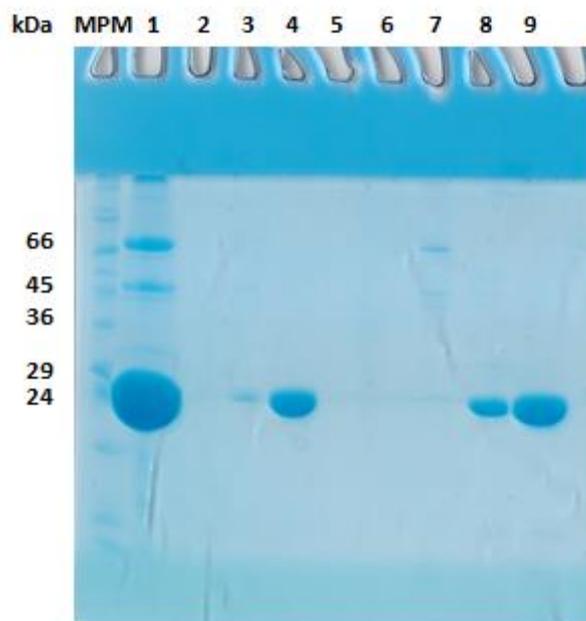


Figura 35: Análisis electroforético de fracciones obtenidas de cromatografía de SjGST. La muestra se dividió en dos partes y estas fueron purificadas por gel filtración. Se muestra, de izquierda a derecha, MPM, 1- muestra sin purificar, 2-6- picos obtenidos en la purificación de la primera parte de la muestra, 7-9, picos obtenidos en la purificación de la segunda parte de la muestra.

En el carril número 1 se sembró la muestra sin purificar, del 2-6 se sembraron los picos obtenidos en la purificación de la primera alícuota de la muestra, y del 7-9 los picos obtenidos en la purificación de la segunda alícuota de la muestra. Considerando que la GST es un homodímero y sus monómeros presentan un peso molecular de alrededor

de 26 kDa, se tomaron las fracciones sembradas en el carril número 4 y número 9 y fueron almacenadas en conjunto.

Usando un ϵ_{280} teórico = $43110 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ calculado a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína (ProtParam, ExPASy Bioinformatics Resource Portal) [95], se determinó una concentración de 1.81 g/L de GST para la mezcla de fracciones obtenida.

Una vez establecida su concentración, se procedió a medir la actividad enzimática para corroborar la integridad funcional de la proteína. Esto se llevó a cabo de la misma manera que para la GST de *E. granulosus*. Se observó también un aumento de absorbancia con el paso del tiempo, indicando la formación de producto y presencia de actividad enzimática. En este caso, el valor de actividad específica fue de 18.2 U/mg, siendo este considerablemente mayor al valor reportado en la bibliografía, de 6.78 U/mg [99]. Al igual que con la GST de *E. granulosus*, esto pudo haberse dado por diferencias en los métodos de trabajo.

5.5.2. Biotinilación de GST

La biotinilación de GST se llevó a cabo con la proteína previamente unida a una resina de GSH-Sefarosa para evitar la biotinilación de su sitio de unión a GSH. Luego de incubar con biotina-NHS y eluir la GST de la resina, se determinó la eficiencia de biotinilación mediante el kit de cuantificación de biotina FluoReporter Biotin Quantitation Assay Kit.

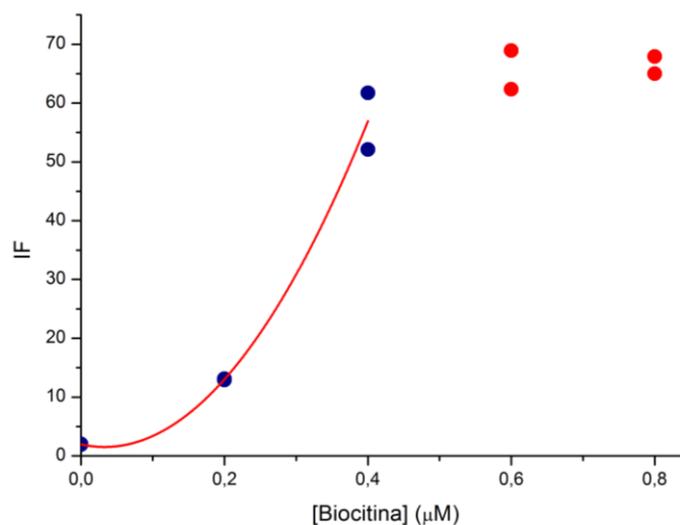


Figura 36: Curva de calibración del FluoReporter Biotin Quantitation Assay Kit. Gráfico de intensidad de fluorescencia del reactivo Biotective Green en función de concentración de biocitina, ajustado a un polinomio de segundo grado.

El reactivo utilizado, Biotective Green, emite fluorescencia a 530 nm de manera proporcional a los niveles de biotina presentes.

A partir de la curva de calibración realizada con biocitina (análogo de biotina) (Figura 36), y conociendo la concentración de GST eluida de la resina, se calculó un porcentaje de biotilación de GST de 90%. Este método de biotilación resultó eficiente, pudiéndose usar esta GST para detectar proteínas glutationiladas sin riesgos mayores de competencia por parte de GST no biotilada.

5.6. Dot blot con GST biotilada

El dot blot se realizó en una membrana de PVDF, en la cual se sembró la Hb-SG para luego detectarla utilizando GST biotilada. Se buscó que la GST cumpliera la función de sonda, uniéndose al GSH de la proteína glutationilada, mientras que el revelado del dot blot se realizó por medio de streptavidina fluorescente, que se asocia a aquellos sitios donde se encuentre la GST por unión a la biotina.

Además de Hb-SG, también se sembró hemoglobina sin glutationilar y GST-biotina a modo de control. La hemoglobina sirve para confirmar que no hay unión entre la GST biotilada y proteínas que no estén glutationiladas, y la GST-biotina para controlar que la streptavidina esté efectivamente uniéndose a la biotina.

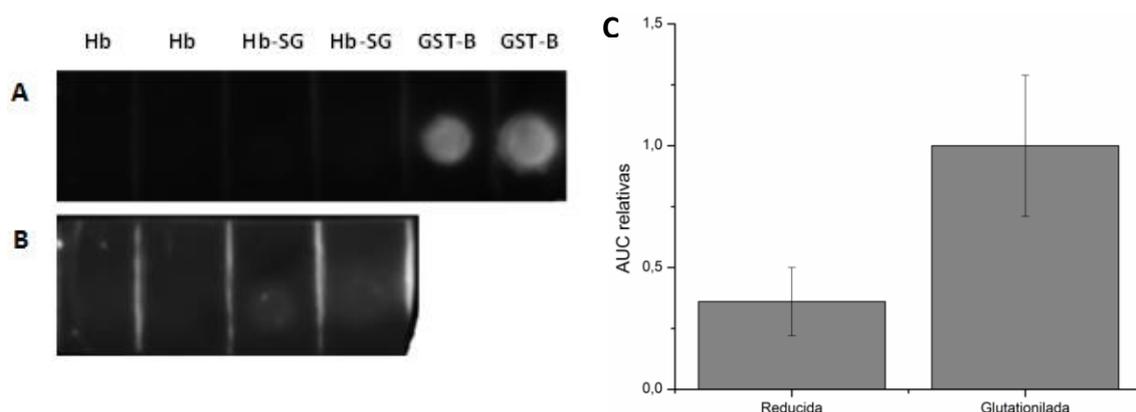


Figura 37: Resultados del dot blot revelado con Streptavidina-Alexa Fluor 680. A. Imagen del dot blot. De izquierda a derecha, se muestra: dos sitios con hemoglobina reducida, dos sitios con Hb-SG, y dos sitios con GST-biotina como control positivo. **B.** Misma imagen que A, sin control positivo y con mayor acumulación. **C.** Relación entre las áreas bajo la curva de los gráficos de señal para hemoglobina reducida y glutacionilada. Tomando la de Hb-SG como 1, la hemoglobina reducida mostró un AUC de 0.36.

La *Figura 37A* muestra la membrana con los seis sitios donde fueron sembradas las proteínas. No se detectó señal fluorescente con hemoglobina reducida o glutationilada. Sin embargo, se obtuvo una fuerte señal con el control positivo (los primeros dos sitios comenzando de la derecha) que permitió confirmar que todos los pasos de la técnica de dot blot se llevaron a cabo correctamente, incluyendo el revelado por streptavidina fluorescente.

En la *Figura 37B*, se omite el control positivo de GST-biotina para no opacar posibles señales más débiles con su intensa fluorescencia. De este modo, se logró divisar una leve fluorescencia en aquellos sitios donde se sembró Hb-SG, pudiéndose tomar esto como un potencial resultado positivo al no observarse señal con la hemoglobina reducida. De manera de confirmar este resultado, se realizó un análisis cuantitativo del dot blot mostrado en esta figura mediante el programa ImageJ 1.46r [100].

Este análisis indicó, en efecto, un aumento de la intensidad de la señal fluorescente para la Hb-SG en comparación con la hemoglobina reducida: en promedio, el área bajo la curva del gráfico obtenido para Hb-SG fue 2.8 veces mayor.

A pesar de ser baja la sensibilidad del método, estos resultados sugieren la formación de un complejo entre Hb-SG y SjGST, abriéndose la posibilidad de eventualmente mejorar la sensibilidad y utilizar este método como herramienta de detección.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se buscó desarrollar un método para capturar o detectar proteínas glutationiladas, en particular hemoglobina, que resulta relevante por su calidad de marcador de estrés oxidativo. En el proceso de llevar esto a cabo se lograron aplicar diferentes técnicas y metodologías del área de bioquímica de proteínas, tanto para su modificación, como para su purificación y análisis.

En cuanto al objetivo de capturar proteínas glutationiladas utilizando GST de *E. granulosus*, no se pudo llegar a un procedimiento exitoso inmovilizándola en resinas de IMAC-sefarosa o sefarosa activada con CNBr. Es importante tener en cuenta que las mediciones de actividad de la enzima se llevaron a cabo en solución, en condiciones diferentes a aquellas en las que se la está utilizando. Frente a esto, algunas estrategias a aplicar en el futuro podrían consistir en la medida de su actividad en condiciones de inmovilización, o la incubación en solución de la GST con la proteína glutationilada. Posterior a esto, se podría realizar una gel filtración (para separar el complejo de las especies libres) y la retención del complejo con la matriz de afinidad IMAC. Otras mejoras al protocolo podrían incluir el aumento de concentración de GSH al momento de la elución, y un lavado con imidazol para eliminar interacciones inespecíficas. Asimismo, en el protocolo de captura por sefarosa activada con CNBr, se debería incorporar un paso de bloqueo de sitios con el mismo objetivo de eliminar estas interacciones.

Por otro lado, en el ensayo de dot blot con la SjGST biotilada combinada con streptavidina fluorescente se mostró una señal mayor para la Hb-SG que para hemoglobina reducida. Sin embargo, en comparación con el trabajo anteriormente mencionado donde también se utilizó a la GST como herramienta de detección (Cheng y colaboradores) [85], se obtuvo una menor sensibilidad del método. Una diferencia con este trabajo es que se usó hemoglobina en lugar de albúmina, lo que puede estar cambiando el resultado del protocolo.

De todos modos, se destaca que no existieron trabajos que continuaran investigando sobre esta herramienta. En general, los métodos presentes en la bibliografía para la detección de proteínas glutationiladas consisten en técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masa [101, 102], así como western blots con anticuerpos anti-GSH [103], marcado del GSH intracelular con ^{35}S y posterior electroforesis en dos dimensiones y autorradiografía [104, 105], y técnicas de derivatización de cisteínas

catalizada por Grx1 [106]. Todas estas estrategias involucran procedimientos costosos, y en algunos casos son técnicas indirectas de detección.

Frente a esto se destaca que, con mejoras en su sensibilidad, la SjGST biotinilada podría funcionar como herramienta selectiva para la detección de proteínas glutationiladas intactas, en un método simple y accesible. Si bien es un objetivo ambicioso, en este trabajo se llegó a resultados preliminares interesantes que podrían ser explorados en mayor profundidad en otra etapa.

7. ANEXO

Para mostrar la relación estructural entre la enzima GST de *S. japonicum* y las GST de clase μ de mamíferos, se realizó un alineamiento de la secuencia de SjGST con la base de datos de UniProt usando la herramienta BLAST [107]. En total se encontraron 125 *hits* (de 250) correspondientes a GST de clase μ de mamíferos, todos ellos significativos, con un porcentaje de identidad en el rango 41.2-47.6% y *e-values* de órdenes menores a 1×10^{-52} .

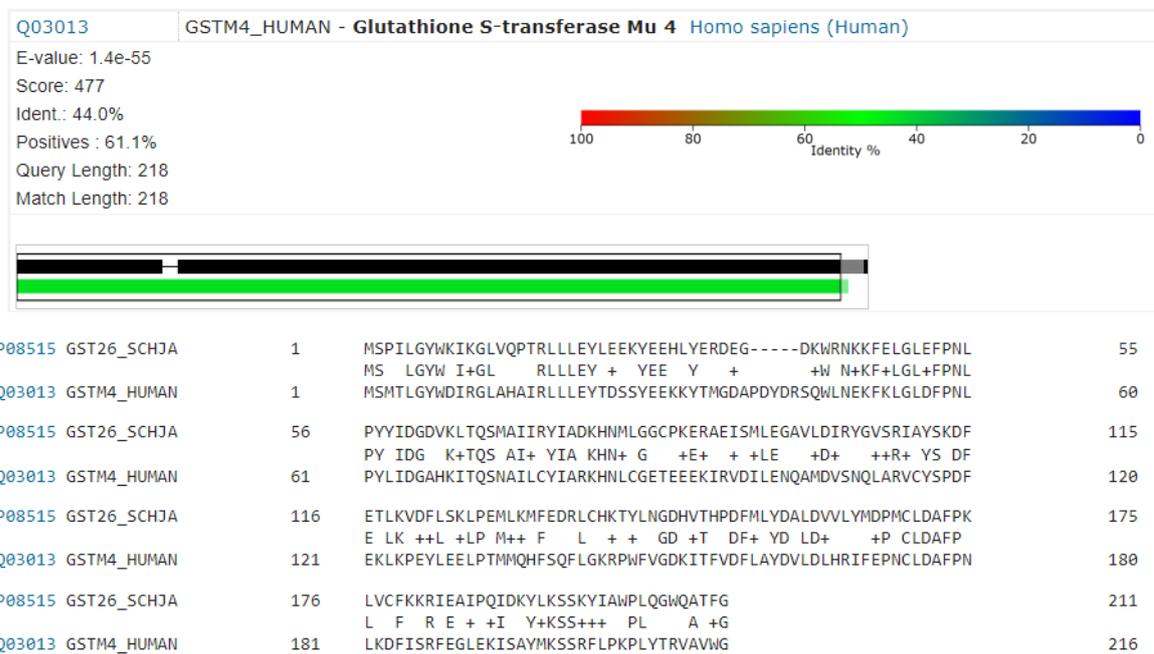


Figura 38: Alineamiento de secuencias entre GST μ 4 humana y SjGST.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Amen, F., *Envejecimiento de Glóbulos Rojos para transfusión. Suplementación con N-acetil cisteína*, in *Tesis de Maestría, Laboratorios de Enzimología y Fisicoquímica Biológica*. 2016, Facultad de Ciencias: Montevideo.
2. Hall, J.E., *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 2015, Elsevier Health Sciences.
3. Alberts, B.J., Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter *Membrane Structure in Molecular Biology of the Cell*. 2015, Garland Science, Taylor & Francis Group. p. 592.
4. Voet, D.V., Judith G., *Covalent Structures of Proteins and Nucleic Acids*, in *Biochemistry*. 2011, John Wiley & Sons. p. 185.
5. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans*. *Oxid Med Cell Longev*, 2010. **3**(1): p. 2-12.
6. Dvorkin, M.A. and D.P. Cardinali, *Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 11 ed. 1987: Ed. Médica Panamericana.
7. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 1999, Oxford University Press, USA.
8. Mihailescu, M.-R. and I.M. Russu, *A signature of the T→R transition in human hemoglobin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(7): p. 3773-3777.
9. Monod, J., J. Wyman, and J.-P. Changeux, *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*. *Journal of molecular biology*, 1965. **12**(1): p. 88-118.
10. DeLano, W.L., *Pymol: An open-source molecular graphics tool*. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 2002. **40**: p. 82-92.
11. HM Berman, J.W., Z. Feng, G. Gilliland, TN Bhat, H. Weissig, IN Shindyalov, PE Bourne, *Protein Data Bank Nucleic Acids Res*, 2000. **28**: p. 235.
12. Stryer, L.B., J.M.; Tymoczko, J.L., *Biochemistry*. 7th ed. 2012: W.H. Freeman and Company.
13. Jensen, F.B., A. Fago, and R.E. Weber, *Hemoglobin structure and function*. *Fish physiology*, 1998. **17**: p. 1-40.
14. Kalyanaraman, B., *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms*. *Redox Biol*, 2013. **1**: p. 244-57.
15. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
16. Mittler, R., *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. *Trends in plant science*, 2002. **7**(9): p. 405-410.
17. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 239-247.
18. Cadenas, E. and K.J. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. **29**(3): p. 222-230.
19. Circu, M.L. and T.Y. Aw, *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(6): p. 749-62.

20. Cimen, M.Y., *Free radical metabolism in human erythrocytes*. Clin Chim Acta, 2008. **390**(1-2): p. 1-11.
21. Shikama, K., *The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle*. Chemical Reviews, 1998. **98**(4): p. 1357-1374.
22. Fielden, E.M., et al., *The mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis*. Biochemical Journal, 1974. **139**(1): p. 49-60.
23. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circulation research, 2000. **87**(10): p. 840-844.
24. Kelley, E.E., et al., *Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase*. Free Radical Biology and Medicine, 2010. **48**(4): p. 493-498.
25. Förstermann, U. and T. Münzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-1714.
26. Lee, J., *Redox regulation of physiological processes*, in *Redox Biochemistry*, R. Banerjee, Editor. 2008, John Wiley & Sons. p. 164.
27. Möller, M., et al., *Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(10): p. 8850-8854.
28. Möller, M.N., J.R. Lancaster, and A. Denicola, *The interaction of reactive oxygen and nitrogen species with membranes*. Current Topics in Membranes, 2008. **61**: p. 23-42.
29. Denicola, A., et al., *Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching*. Archives of biochemistry and biophysics, 1996. **328**(1): p. 208-212.
30. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiological reviews, 2007. **87**(1): p. 315-424.
31. Romero, N., A. Denicola, and R. Radi, *Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite*. IUBMB life, 2006. **58**(10): p. 572-580.
32. Church, D.F. and W.A. Pryor, *Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications*. Environmental health perspectives, 1985. **64**: p. 111.
33. Helms, C. and D.B. Kim-Shapiro, *Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **61**: p. 464-472.
34. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi, *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(7): p. 3566-3571.
35. Stamler, J.S., et al., *Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2034-2037.
36. Kissner, R., et al., *Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis*. Chemical research in toxicology, 1997. **10**(11): p. 1285-1292.
37. Blough, N.V. and O.C. Zafiriou, *Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution*. Inorganic Chemistry, 1985. **24**(22): p. 3502-3504.
38. Radi, R., et al., *Peroxyntirite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Archives of biochemistry and biophysics, 1991. **288**(2): p. 481-487.

39. Matarrese, P., et al., *Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases*. The FASEB journal, 2005. **19**(3): p. 416-418.
40. Denicola, A., et al., *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **333**(1): p. 49-58.
41. Perry, J.J., et al., *The structural biochemistry of the superoxide dismutases*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(2): p. 245-62.
42. Michiels, C., et al., *Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress*. Free radical Biology and medicine, 1994. **17**(3): p. 235-248.
43. Takebe, G., et al., *A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(43): p. 41254-41258.
44. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **15**(7): p. 1957-1997.
45. Flohé, L., et al., *Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1972. **353**(1): p. 987-1000.
46. Rhee, S.G., H.Z. Chae, and K. Kim, *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. **38**(12): p. 1543-1552.
47. Manta, B., et al., *The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2*. Archives of biochemistry and biophysics, 2009. **484**(2): p. 146-154.
48. Johnson, R.M., et al., *Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. **39**(11): p. 1407-1417.
49. Lion, N., et al., *Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map (s)*. Journal of proteomics, 2010. **73**(3): p. 374-385.
50. Alfonso-Prieto, M., et al., *The molecular mechanism of the catalase reaction*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(33): p. 11751-11761.
51. Mendiratta, S., Z.-c. Qu, and J.M. May, *Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood*. Free Radical Biology and Medicine, 1998. **24**(5): p. 789-797.
52. Frei, B., L. England, and B.N. Ames, *Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(16): p. 6377-6381.
53. ChemDraw Professional PerkinElmer Informatics.
54. Omenn, G.S., et al., *Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease*. New England journal of medicine, 1996. **334**(18): p. 1150-1155.
55. Hennekens, C.H., et al., *Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease*. New England Journal of Medicine, 1996. **334**(18): p. 1145-1149.
56. Albanes, D., *β -Carotene and lung cancer: a case study*. The American journal of clinical nutrition, 1999. **69**(6): p. 1345s-1350s.

57. Druesne-Pecollo, N., et al., *Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials*. International journal of cancer, 2010. **127**(1): p. 172-184.
58. Amen, F., et al., *N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017. **621**: p. 31-37.
59. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(1): p. 1-12.
60. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(33): p. 17205-17208.
61. Brigelius-Flohé, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(9): p. 951-965.
62. Varandani, P., *Mode of action of glutathione-insulin transhydrogenase. Studies on the precipitate produced by its action on insulin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation, 1966. **118**(1): p. 198-201.
63. Saran, M. and W. Bors, *Radical reactions in vivo--an overview*. Radiat Environ Biophys, 1990. **29**(4): p. 249-62.
64. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. Nature reviews. Drug discovery, 2013. **12**(12): p. 931.
65. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Biomarkers of oxidative stress in red blood cells*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011. **155**(2): p. 131-6.
66. Ghezzi, P., *Protein glutathionylation in health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. **1830**(5): p. 3165-3172.
67. Thomas, J.A., B. Poland, and R. Honzatko, *Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995. **319**(1): p. 1-9.
68. Gilbert, H.F., [2] *Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability*. Methods in enzymology, 1995. **251**: p. 8-28.
69. Klatt, P. and S. Lamas, *Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress*. The FEBS Journal, 2000. **267**(16): p. 4928-4944.
70. Dalle-Donne, I., et al., *Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(10): p. 1185-1193.
71. Musci, G., et al., *Nitrosative/oxidative modifications and ageing*. Mechanisms of ageing and development, 2006. **127**(6): p. 544-551.
72. Grek, C.L., et al., *Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(37): p. 26497-26504.
73. Dalle-Donne, I., et al., *Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans*. Trends in biochemical sciences, 2009. **34**(2): p. 85-96.
74. Fratelli, M., E. Gianazza, and P. Ghezzi, *Redox proteomics: identification and functional role of glutathionylated proteins*. Expert review of proteomics, 2004. **1**(3): p. 365-376.
75. Cotgreave, I.A. and R.G. Gerdes, *Recent trends in glutathione biochemistry—glutathione–protein interactions: a molecular link between oxidative stress and*

- cell proliferation?* Biochemical and biophysical research communications, 1998. **242**(1): p. 1-9.
76. Giustarini, D., et al., *Protein glutathionylation in erythrocytes*. Clinical chemistry, 2003. **49**(2): p. 327-330.
 77. Toth, K., et al., *Intact human erythrocytes prevent hydrogen peroxide-mediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells*. Journal of Clinical Investigation, 1984. **74**(1): p. 292.
 78. Romero, N. and R. Radi, *Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry*. Methods in enzymology, 2005. **396**: p. 229-245.
 79. Bursell, S.-E. and G.L. King, *The potential use of glutathionyl hemoglobin as a clinical marker of oxidative stress*. 2000, Clinical Chemistry.
 80. Niwa, T., et al., *Increased glutathionyl hemoglobin in diabetes mellitus and hyperlipidemia demonstrated by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry*. Clinical chemistry, 2000. **46**(1): p. 82-88.
 81. Mandal, A.K., et al., *Quantitation and characterization of glutathionyl haemoglobin as an oxidative stress marker in chronic renal failure by mass spectrometry*. Clinical biochemistry, 2007. **40**(13): p. 986-994.
 82. Al-Abed, Y., et al., *Characterization of a novel hemoglobin-glutathione adduct that is elevated in diabetic patients*. Molecular Medicine, 2001. **7**(9): p. 619.
 83. Mawatari, S. and K. Murakami, *Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes*. Archives of biochemistry and biophysics, 2004. **421**(1): p. 108-114.
 84. Böhmer, A., et al., *Evidence by chromatography and mass spectrometry that inorganic nitrite induces S-glutathionylation of hemoglobin in human red blood cells*. Journal of Chromatography B, 2016. **1019**: p. 72-82.
 85. Cheng, G., et al., *Detection of S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay*. Archives of biochemistry and biophysics, 2005. **435**(1): p. 42-49.
 86. Hayes, J.D., J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, *Glutathione transferases*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2005. **45**: p. 51-88.
 87. Strange, R.C., et al., *Glutathione-S-transferase family of enzymes*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001. **482**(1): p. 21-26.
 88. Ioannides, C., *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. 2002: J. Wiley.
 89. Sheehan, D., G. MEADE, and V.M. FOLEY, *Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily*. Biochemical Journal, 2001. **360**(1): p. 1-16.
 90. Mannervik, B., U. Helena Danielson, and B. Ketterer, *Glutathione transferases—structure and catalytic activit*. Critical Reviews in Biochemistry, 1988. **23**(3): p. 283-337.
 91. Armstrong, R., et al. *Crystallographic and mechanistic studies of class mu glutathione-S-Transferases In: Tew KD, Pickett CB, Mantle TJ, Mannervik B, Hayes JD. in Proceedings of the International Meeting on Structure and Function of Glutathione Transferases*. 1993.

92. Cuevasanta, E., et al., *Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(45): p. 26866-26880.
93. Peters Jr, T., *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. 1995: Academic press.
94. Fleitas, A.L., et al., *Purification of a recombinant glutathione transferase from the causative agent of hydatidosis, Echinococcus granulosus*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2016. **44**(1): p. 28-37.
95. Gasteiger E., H.C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A, *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press p. 571-607.
96. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 2nd ed. The Practical Approach Series, ed. B.D.H. D. Rickwood. 1990, United States Oxford University Press, New York
97. Cuevasanta, E., *Cistationina β -sintasa y sulfuro de hidrógeno*, in *Tesis de Grado, Laboratorio de Enzimología*. 2008, Facultad de Ciencias, Universidad de la República: Montevideo. p. 72.
98. Harispe, L., et al., *Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode Echinococcus granulosus*. Acta tropica, 2010. **114**(1): p. 31-36.
99. Walker, J., et al., *Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum*. Molecular and biochemical parasitology, 1993. **61**(2): p. 255-264.
100. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.
101. Chen, H.-J.C., et al., *Multistage mass spectrometric analysis of human hemoglobin glutathionylation: correlation with cigarette smoking*. Chemical research in toxicology, 2014. **27**(5): p. 864-872.
102. Naito, C., M. Kajita, and T. Niwa, *Determination of glutathionyl hemoglobin in hemodialysis patients using electrospray ionization liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999. **731**(1): p. 121-124.
103. McDonagh, B., R. Tyther, and D. Sheehan, *Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel Mytilus edulis detected by proteomic analysis and Western blotting: actin as a target for oxidative stress*. Aquatic Toxicology, 2005. **73**(3): p. 315-326.
104. Fratelli, M., et al., *Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells*. Proteomics, 2003. **3**(7): p. 1154-1161.
105. Fratelli, M., et al., *Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(6): p. 3505-3510.
106. Reynaert, N.L., et al., *In situ detection of S-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2006. **1760**(3): p. 380-387.
107. Consortium, U., *UniProt: the universal protein knowledgebase*. Nucleic acids research, 2017. **45**(D1): p. D158-D169.