

Tesis de Doctorado en Química

Facultad de Química – PEDECIBA Química

ÁCIDO SULFÉNICO EN ALBÚMINA SÉRICA HUMANA

Lucía Turell Novo

Orientadora: Dra. Beatriz Alvarez

Laboratorios de Enzimología y Fisicoquímica Biológica

Facultad de Ciencias

Centro de Investigaciones Biomédicas

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Mayo 2012

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	5
2.	INTRODUCCIÓN	7
2.1	Tioles y oxidaciones biológicas.....	7
2.1.1	Especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno	7
2.1.2	Tioles biológicos	8
2.1.3	Reactividad de tioles con oxidantes.....	9
2.2	Acido sulfénico en proteínas	11
2.2.1	Reactividad y estabilidad	11
2.2.2	Roles en proteínas	12
2.2.3	Detección de ácido sulfénico en proteínas.....	14
2.3	Albúmina sérica humana (HSA).....	16
2.3.1	Generalidades y estructura de la HSA	16
2.3.2	Biosíntesis, distribución y degradación de la HSA.....	17
2.3.3	Funciones	18
2.3.4	Uso farmacéutico de la HSA	21
2.4	Tiol de la HSA	21
2.4.1	Heterogeneidad del tiol de la HSA	21
2.4.2	Reactividad del tiol de la HSA.....	24
2.4.3	Ácido sulfénico en HSA	25
2.4.4	HSA y patología.....	27
2.5	Defensas antioxidantes en el espacio intravascular	30
2.6	HSA recombinante	33
2.6.1	Sistemas de expresión	33
2.6.2	<i>Pichia pastoris</i>	33
2.6.3	Propiedades y uso clínico de la HSA recombinante	35
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo general	37
3.2	Objetivos específicos	37
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1	Materiales y soluciones.....	39
4.2	Caracterización de ácido sulfénico en albúmina mediante la reacción con tionitrobenzoato.....	42
4.3	Utilización de tionitrobenzoato para caracterizar a la	

	alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE)	44
4.4	Purificación de isoformas de la HSA por cromatoenfoque y análisis por espectrometría de masa	45
4.5	Expresión, purificación y generación de mutantes de HSA recombinante	48
4.6	Procesamiento y análisis de datos.....	52
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1	Caracterización del ácido sulfénico formado en la albúmina sérica humana mediante la reacción con tionitrobenzoato.....	53
5.1.1	Reacción entre HSA-SOH y TNB	53
5.1.2	Naturaleza de la segunda fase de la reacción entre HSA-SOH y TNB ...	58
5.1.3	Estabilidad de HSA-SOH en solución.....	60
5.1.4	Relación entre la segunda fase de la reacción de HSA-SOH con TNB y la inestabilidad de HSA-SOH	64
5.1.5	Reacción de HSA-SH y HSA-SOH con peróxido de hidrógeno	66
5.1.6	Reactividad con dimedona y arsenito.....	69
5.1.7	Reactividad con ácido úrico y ascorbato	69
5.1.8	Reacción con tioles de bajo peso molecular.....	70
5.2	Efecto de la unión de ácidos grasos en las propiedades del tiol y del ácido sulfénico en la HSA.....	77
5.3	Reducción catalítica de peróxido de hidrógeno por AhpE a expensas de TNB	80
5.4	Purificación de isoformas del tiol de la HSA por cromatoenfoque y análisis por espectrometría de masa	84
5.4.1	Análisis de distintas HSA comerciales	87
5.4.2	Análisis de muestras de plasma.....	89
5.5	Caracterización de HSA-SX por espectrometría de masa	91
5.6	Caracterización de la reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno por espectrometría de masa	93
5.7	Clonado, expresión, purificación y obtención de mutantes de HSA recombinante en <i>Pichia pastoris</i>	95
5.7.1	Clonado del gen de la HSA.....	96
5.7.2	Mutagénesis	99
5.7.3	Transformación con pPICZA-HSAwt y expresión.....	99
5.7.4	Purificación	101

5.8	Comparación de la reactividad del tiol de la HSA con la de tioles de bajo peso molecular	106
5.9	HSA como atrapadora de especies reactivas en el espacio intravascular	107
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	111
7.	REFERENCIAS.....	117
8.	ANEXO.....	133
9.	AGRADECIMIENTOS	134

ABREVIATURAS

RSH	Tiol o sulfhidrilo
RSOH	Ácido sulfénico
RSO ₂ H	Ácido sulfínico
RSO ₃ H	Ácido sulfónico
RSSR'	Disulfuro
RSNHR'	Sulfenamida
HSA	Albúmina sérica humana
HSA-SH	Albúmina con el tiol en la forma reducida
HSA-SOH	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfénico
HSA-SO ₂ H	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfínico
HSA-SO ₃ H	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfónico
HSA-SSR	Albúmina con el tiol oxidado a disulfuro mixto
HSA-SX	Producto de decaimiento de HSA-SOH
HSAr	Albúmina recombinante
TNB	5-Tio-2-nitrobenzoato
DTNB	5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzoato
Dimedona	5,5-Dimetil-1,3-ciclohexanodiona
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenz-2-oxa-diazol
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
<i>p</i> -CMB	<i>p</i> -cloromercuribenzoato
NEM	N-etilmaleimida
NAC	N-acetilcisteína
DTT	Ditiotreitol
AhpE	Alquilhidroperóxido reductasa E
ESI-MS	"Electrospray ionization - mass spectrometry"
MALDI-TOF-MS	"Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- mass spectrometry"

1. RESUMEN

El ácido sulfénico (RSOH), formado en proteínas tras la oxidación del tiol de una cisteína, ha sido implicado en procesos de estrés oxidativo, señalización celular y catálisis redox. Sin embargo, existe poca información en cuanto a su reactividad. Su formación ha sido detectada en el único tiol libre de la albúmina sérica humana (HSA), la cisteína 34, cuando ésta es oxidada con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. En este trabajo se caracterizó a esta especie (HSA-SOH) desde el punto de vista de su reactividad y estabilidad utilizando técnicas complementarias.

A través de su reacción con el tionitrobenzoato (TNB) fue posible cuantificar el HSA-SOH y así determinar su reactividad frente a moléculas de interés analítico y biológico. El HSA-SOH se forma a partir de la reacción con peróxido de hidrógeno con una constante de $2.3 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4). Una vez formado puede seguir tres vías de reacción. En primer lugar puede reaccionar con otra molécula de peróxido de hidrógeno formando ácido sulfínico (HSA-SO₂H) con una constante de $0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4). La formación de HSA-SO₂H se confirmó por espectrometría de masa de la proteína entera y tripsinizada. En segundo lugar, puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular dando lugar a la formación de disulfuros mixtos. Mediante experimentos de competencia con TNB fue posible determinar las constantes para la reacción entre HSA-SOH y diferentes tioles. Estos experimentos aportaron información mecanística y permitieron concluir que la reacción implica un ataque nucleofílico del tiolato. Aquellos tioles con carga neta positiva a pH 7.4 reaccionaron más rápido que los de carga neta negativa, probablemente debido al entorno electronegativo de la Cys34. En tercer lugar, el HSA-SOH decae espontáneamente en solución ($1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 37 °C, pH 7.4), dando lugar a la formación de una nueva especie a la que denominamos HSA-SX.

La técnica del TNB fue también utilizada para caracterizar una peroxirredoxina, la alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE), permitiendo demostrar por primera vez que esta enzima puede reducir peróxido de hidrógeno en forma catalítica y resaltando la necesidad de realizar análisis cinéticos para cada proteína en particular.

Mediante una estrategia cromatográfica fue posible purificar, por diferencias en el punto isoeléctrico, las distintas isoformas de la HSA en relación al estado de oxidación del tiol, las cuales fueron caracterizadas por espectrometría de masa. El análisis de HSA-SX, tanto en la proteína entera como en la proteína tripsinizada sugiere que se trata de una sulfenamida (HSA-SNHR) dado que su masa (66436 ± 4 Da) es similar a la de la HSA reducida (HSA-SH, 66435 ± 3 Da), es reducible con tioles y no reacciona con alquilantes. Sin embargo, no fue posible determinar la amina o amida con la que reacciona el HSA-SOH.

Por último, se trabajó en la producción de HSA recombinante en la levadura *Pichia pastoris* con el objetivo de generar mutantes en residuos clave del entorno del tiol. Se clonó el ADN copia de la HSA salvaje y se generaron las construcciones con las mutaciones buscadas. Por otro lado se transformaron levaduras y se expresó la proteína salvaje como proteína de secreción.

Esperamos que los resultados obtenidos en esta tesis aporten a la comprensión de las interacciones entre los tioles y los oxidantes, lo cual es relevante dada la creciente evidencia de su participación en procesos de estrés oxidativo, catálisis y señalización, relevantes en diferentes patologías.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Tioles y oxidaciones biológicas

2.1.1 Especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno

Durante el metabolismo aeróbico se generan productos de reducción intermedia del oxígeno que, junto con algunas especies derivadas, se conocen como especies reactivas del oxígeno. Este término incluye moléculas que contienen un radical centrado en oxígeno tales como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) y los radicales peroxilo ($ROO^{\cdot}$), y moléculas no radicalares tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el oxígeno singulete ($^1O_2$). A estas especies, se suman aquellas derivadas del óxido nítrico ($^{\cdot}NO$), que se conocen como especies reactivas del nitrógeno. Entre ellas se encuentran el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), el dióxido de nitrógeno ($^{\cdot}NO_2$) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). También está incluido el radical carbonato ($CO_3^{\cdot -}$).

Estas especies reactivas son formadas por sistemas enzimáticos tales como NADPH oxidasas, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, mieloperoxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa entre otros, así como por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. También son producidas por sistemas no enzimáticos como la reacción de Fenton y las radiaciones UV e ionizantes, entre otros (1, 2).

Estas especies son capaces de reaccionar potencialmente con cualquier blanco biológico incluyendo lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El resultado final depende de la identidad de la especie oxidante y su reactividad, de fenómenos de difusión y compartimentalización, de la naturaleza y concentración de las moléculas blanco, de sistemas de reparación o de la presencia de mecanismos de defensa antioxidante (2).

En condiciones patológicas se puede producir un desbalance entre oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, lo que puede dar lugar a daño celular y tisular que estaría implicado en la génesis de diversas patologías (3). Por otro lado, existe creciente evidencia de que las especies reactivas juegan un rol central como mediadores en los procesos de señalización en condiciones fisiológicas. Esto ha llevado a redefinir al estrés oxidativo en términos de la alteración de la señalización redox (4). En este marco, los

tioles están siendo propuestos como importantes transductores capaces de intermediar entre las especies oxidantes y los blancos celulares (5).

2.1.2 Tioles biológicos

Los tioles son compuestos organosulfurados que contienen un grupo sulfhidrilo unido a un átomo de carbono (RSH). En sistemas biológicos están representados por la cisteína y sus moléculas derivadas. La versatilidad química de estas especies es muy alta. Los tioles son buenos reductores, presentando un potencial de reducción de $E^{\circ'}(\text{RSSR}/2\text{RSH})$ de -0.24 V en el caso de la cisteína (6). Por otro lado, son buenos nucleófilos y pueden ser modificados en forma reversible e irreversible.

En sistemas biológicos, los tioles pueden formar parte de moléculas de bajo y alto peso molecular. El tripéptido derivado de la cisteína, el glutatión, es el tiol de bajo peso molecular más abundante encontrándose en concentraciones del orden de 5 mM en el citosol.

En las proteínas, la cisteína es uno de los aminoácidos menos abundantes, encontrándose presente en un porcentaje menor al 3 %. Sin embargo, la versatilidad química de este residuo le permite cumplir diversas funciones. Por ejemplo, las cisteínas cumplen roles estructurales en un gran número de proteínas donde forman puentes disulfuro inter e intramoleculares. Las proteínas extracelulares suelen presentar puentes disulfuro que les permiten plegarse correctamente y mantener estabilidad estructural, como ocurre en la HSA. Por el contrario, las proteínas intracelulares suelen contener cisteínas reducidas debido al ambiente altamente reductor. Las cisteínas también participan en la coordinación de iones metálicos formando centros ferrosulfurados y dedos de zinc, entre otras estructuras. Algunas enzimas presentan una cisteína altamente reactiva en su sitio activo cuyo estado de oxidación no cambia durante el ciclo catalítico. Este es el caso de varias cisteína proteasas, caspasas, catepsinas y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, entre otras. Los grupos tiol de la cisteína pueden actuar también como sensores de los niveles de especies reactivas, actuando como interruptores en diversos procesos cambiando su estado de oxidación. Estas cisteínas con roles regulatorios se encuentran en factores de transcripción, quinasas y otras proteínas regulatorias. Las cisteínas más conservadas son aquellas que llevan a cabo procesos de catálisis redox. Estos residuos son oxidados a disulfuro o a ácido sulfénico y luego son regenerados por enzimas

especializadas. Otras cisteínas son sitios de modificaciones postraduccionales y pueden ser las responsables de marcar a la proteína para que vaya a un compartimento u otro o de mantener funciones que no son específicas de las cisteínas. Por último, existen cisteínas que no cumplen un rol específico. Estas cisteínas, denominadas cisteínas huérfanas, son poco abundantes y no se encuentran conservadas (7).

2.1.3 Reactividad de tioles con oxidantes

Los tioles (RSH) son blancos preferenciales para el ataque por parte de un vasto espectro de especies radicalares y no radicalares rindiendo un amplio rango de productos (Figura 2.1). La cisteína, por ejemplo, reacciona con especies reactivas con constantes de velocidad varios órdenes de magnitud más rápidas que otros aminoácidos.

La oxidación de un tiol de bajo peso molecular o del tiol de una proteína, habitualmente lleva a la formación de un disulfuro (RSSR). Por otro lado, cuando un tiol reacciona con un oxidante de dos electrones, como el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito, el producto de la reacción es el ácido sulfénico (RSOH). Las propiedades y vías de reacción de esta especie se retomarán más adelante.

La oxidación de un tiol por un electrón determina la formación de un radical tiílo ($RS^\cdot$) altamente reactivo. Este radical puede reaccionar con otro radical tiílo formando un disulfuro o reaccionar con un tiol dando lugar a la formación de un disulfuro anión radical ($RSSR^{\cdot-}$). Este radical $RSSR^{\cdot-}$ es reductor siendo capaz de reducir el O_2 dando $O_2^{\cdot-}$, el cual es eliminado por la superóxido dismutasa (8, 9). Alternativamente, el tiílo puede reaccionar con O_2 dando lugar a la formación de un radical peroxilo ($RSOO^\cdot$) que puede rearrreglarse dando lugar a un radical sulfonilo ($RSO_2^\cdot$) y posteriormente ácido sulfínico (RSO_2H) o sulfónico (RSO_3H) (10). El radical peroxilo puede también dar lugar a la formación de un radical sulfenilo ($RSO^\cdot$), que luego de abstraer un hidrógeno a un reductor da lugar a la formación de un ácido sulfénico (11-13).

Por último, el tiol puede reaccionar con especies reactivas derivadas del óxido nítrico dando lugar a la formación de un nitrosotiol ($RSNO$) (15-17). Esta modificación oxidativa resulta interesante dado su carácter reversible y porque implicaría un mecanismo de regulación proteica por parte del óxido nítrico. De hecho, el número de proteínas nitrosiladas identificadas aumenta en forma constante. Sin embargo, la purificación y

detección de las S-nitrosoproteínas plantea un problema metodológico importante (18).

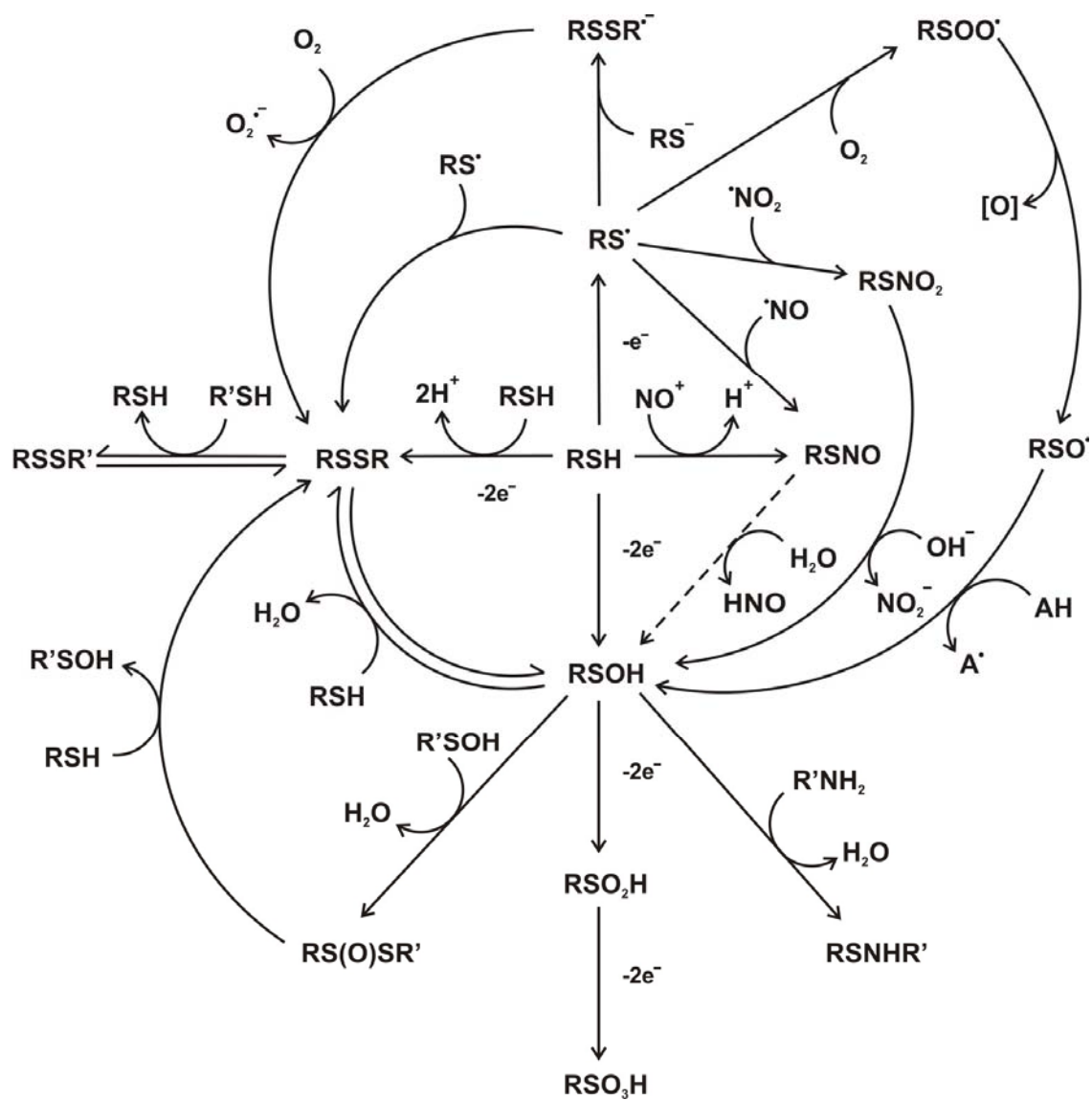


Figura 2.1. Vías de oxidación del tiol por especies reactivas. Tomado de (14).

2.2 Ácido sulfénico en proteínas

2.2.1 Reactividad y estabilidad

La formación de ácido sulfénico en proteínas es el resultado de la reacción de tioles, más precisamente tiolatos, con peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos alquílicos, peroxinitrito y ácido hipocloroso. En este último caso el ácido sulfénico se formaría por hidrólisis del cloruro de sulfenilo inicial. Otras cuatro reacciones menos comunes pueden dar lugar a la formación de ácido sulfénico. Una de ellas es la hidrólisis de enlaces disulfuro (dando lugar a la formación de un tiol además del ácido sulfénico). También se incluyen la reacción de tiosulfinato (RS(O)SR) con un grupo tiol para dar lugar a la formación de un nuevo enlace disulfuro junto con el ácido sulfénico y la hidrólisis de S-nitrosotioles (RSNO). Por último, los radicales tiilo de las cisteínas también pueden producir ácido sulfénico (Figura 2.1) (19).

Este intermediario clave en los procesos de oxidación de tioles suele ser inestable (Figura 2.1). Una de las principales vías de decaimiento la constituye la reacción con un tiol reducido dando lugar a la formación de un disulfuro. Por ejemplo, la reacción de un ácido sulfénico formado en una proteína con glutatión (GSH, principal tiol citosólico de bajo peso molecular), es uno de los mecanismos que puede dar lugar a la formación de proteínas glutatióniladas (RSSG). Otro ejemplo lo constituyen las peroxirredoxinas de dos cisteínas. En estas enzimas, una cisteína, denominada peroxidática, se oxida a ácido sulfénico el cual es atacado por una segunda cisteína, denominada resolutive, dando lugar a la formación de un disulfuro. Alternativamente, un ácido sulfénico puede reaccionar con otro ácido sulfénico dando lugar a la formación de un tiosulfinato. Esto deja en evidencia que el ácido sulfénico puede actuar como electrófilo o como nucleófilo.

En presencia de un exceso de oxidantes, el ácido sulfénico puede oxidarse aún más dando lugar a la formación de ácido sulfinico (RSO_2H) y/o sulfónico (RSO_3H) (12, 20). Estas dos especies no pueden revertir a tiol en presencia de reactivos de tioles tales como 2-mercaptoetanol o ditiotreitól. El ácido sulfinico formado en algunas peroxirredoxinas puede ser reducido enzimáticamente en presencia de cisteína sulfinilreductasas en un mecanismo complejo que requiere la presencia de ATP (21, 22).

El ácido sulfénico puede también reaccionar con una amina dando lugar a la formación de una sulfenamida (RSNHR) (23). En la proteína tirosina fosfatasa 1B se identificó la formación de una sulfenamida cíclica a partir de la reacción del ácido sulfénico con el nitrógeno amídico del residuo contiguo (24, 25). Más recientemente, se ha reportado la reacción entre el ácido sulfénico formado en una tioredoxina peroxidasa y una histidina cercana dando lugar a la formación de un sulfurano (26).

La reactividad del ácido sulfénico es diferente para cada proteína. La estabilización depende de factores estéricos y del microambiente del tiol involucrado. En el caso de las proteínas, el factor más importante para la estabilidad del ácido sulfénico es la ausencia de tioles cercanos con los que pueda reaccionar. Por otro lado, la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre el ácido sulfénico y un aceptor adecuado puede estabilizar dicho ácido. La ionización del ácido a su conjugado, el sulfenato, reduce su potencial para funcionar como dador en el puente de hidrógeno en el precursor dimérico de la formación de tiosulfonato, lo que favorece la estabilidad. Por último, el acceso limitado del solvente así como la asociación con elementos apolares de la estructura proteica contribuyen con la estabilidad (27, 28).

2.2.2 Roles en proteínas

En algunas enzimas el ácido sulfénico se forma como consecuencia del propio mecanismo catalítico. Las peroxirredoxinas, enzimas capaces de reducir hidroperóxidos a agua, presentan una cisteína peroxidática que se oxida a ácido sulfénico como parte de su mecanismo catalítico. El mecanismo de reciclaje de dicho sulfénico difiere entre las diferentes clases de peroxirredoxinas (29, 30). Las glutatión peroxidases también catalizan la reducción de hidroperóxidos y están relacionadas con las peroxirredoxinas tanto en estructura como en función. Sin embargo, la mayoría de las glutatión peroxidases presentan un selenol en lugar de un tiol en su sitio activo. Cuando éste es el caso, durante la reacción de detoxificación del hidroperóxido se forma un selenenato (Cys-SeO⁻) (31). La metionina sulfóxido reductasa revierte la oxidación de la metionina sulfóxido a través de la formación de un ácido sulfénico intermediario en una de las cisteínas de la enzima (32). Los estreptococos gram positivos como *Streptococcus faecalis* presentan dos flavoproteínas inusuales, NADH peroxidasa y NADH oxidasa, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno y oxígeno, respectivamente. Estas enzimas, con características estructurales muy similares (33), presentan en su mecanismo catalítico un ácido sulfénico como

intermediario (34).

Además de su función en catálisis y de protección frente a especies reactivas, el ácido sulfénico también está implicado en sensar señales e iniciar respuestas celulares frente al estrés oxidativo. Ejemplos de esto son el factor de transcripción OhrR y las fosfatasa de tirosina. El factor de transcripción OhrR, presente en *Bacillus subtilis*, funciona como represor de la expresión de Ohr, una peroxidasa dependiente de cisteína, cuando se encuentra reducido. En condiciones de estrés oxidativo el represor se oxida a ácido sulfénico determinando la desrepresión de la transcripción del gen (19, 35, 36). Por otro lado, las fosfatasa de tirosina (PTP) catalizan la hidrólisis de fosfotirosinas de proteínas transductoras de señales específicas. Estas enzimas presentan una cisteína crítica en su sitio activo. En presencia de peróxido de hidrógeno se forma un ácido sulfénico en dicha cisteína, lo que en este caso constituye un mecanismo de inhibición de la enzima que puede ser revertido por glutatión u otros tioles. De este modo las proteínas transductoras de señales permanecen fosforiladas y por lo tanto activas (25, 37). Sin embargo esto debe ser tomado con cautela. Las fosfatasa de tirosina reaccionan con peróxido de hidrógeno con una constante de $20 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y se encuentran en el citosol a una concentración de $0.1 \text{ } \mu\text{M}$. Por lo tanto, no podrán competir cinéticamente con las peroxirredoxinas ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $0.2\text{-}410 \text{ } \mu\text{M}$) y glutatión peroxidasas ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $0.3\text{-}7 \text{ } \mu\text{M}$), por lo que la señalización deberá ocurrir a través de una oxidación indirecta que implique la oxidación de otras cisteínas como intermediarios (38). Por otro lado, existe considerable evidencia que demuestra la susceptibilidad de un cierto número de peroxirredoxinas eucariotas a la inactivación durante el ciclo catalítico en presencia de altos niveles del peróxido sustrato. Esto muestra que el ácido sulfénico intermediario generado durante la catálisis normal, también podría operar como un “redox switch” en estas enzimas (39).

Además, el ácido sulfénico participa en el plegamiento *in vitro* de proteínas como precursor en la formación de disulfuros (40). Por último, en condiciones de estrés oxidativo *in vitro*, la oxidación de la cisteína de proteínas donde la formación de un disulfuro resulta desfavorable, puede dar lugar a la formación de un ácido sulfénico estable. Este es el caso de la papaína, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, catepsina K y albúmina sérica humana (12, 41-43).

Como se desprende de este resumen, el ácido sulfénico participa en diversos procesos celulares, que incluyen catálisis, transducción de señales, metabolismo del

oxígeno y respuesta al estrés oxidativo. Por este motivo es necesario el desarrollo de técnicas que permitan, no solo detectar la formación de esta especie, sino también cuantificarla y caracterizar su reactividad.

2.2.3 Detección de ácido sulfénico en proteínas

El interés en detectar y cuantificar el ácido sulfénico formado en proteínas se ha incrementado conforme lo ha hecho la implicancia del mismo en roles de regulación redox y catálisis. El ácido sulfénico no presenta espectros de fluorescencia o de absorbancia UV-visible característicos. Por otro lado, su inestabilidad y pequeño tamaño no permite el desarrollo de anticuerpos para la identificación de esta modificación postraducciona.

En ciertos casos, el ácido sulfénico ha sido detectado en forma directa. Por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y por datos de desplazamiento químico en RMN de ^{13}C ha sido posible detectar la existencia de un ácido sulfénico en la Cys42 de la NADH peroxidasa. También se ha detectado ácido sulfénico en forma directa mediante espectrometría de masa donde se observa un incremento en el m/z correspondiente a la adición de un oxígeno. Sin embargo, estos abordajes solo pueden ser utilizados en proteínas aisladas y solo en el caso de ácidos sulfénicos estables (44). Por este motivo se han desarrollado diversas herramientas y métodos químicos con el objetivo de atrapar e identificar estos grupos funcionales.

La modificación química del ácido sulfénico con 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (dimedona) provee de una técnica útil para atrapar esta especie. Este reactivo actúa como nucleófilo, lo cual es de relevancia dado que existen pocos grupos electrófilos en las proteínas. Sin embargo, la falta de propiedades de absorción o fluorescencia del aducto formado hace necesario el uso de espectroscopía de masa. Aún así, ha demostrado ser una técnica útil por su especificidad, permitiendo la detección de ácido sulfénico en proteínas diferentes tales como albúmina sérica humana (42), componente AhpC de la alquil hidroperóxido reductasa de *Salmonella typhimurium* (45) y la metionina sulfóxido reductasa de *Escherichia coli* (32), entre otras. En los últimos años se han desarrollado una serie de reactivos basados en la dimedona unida a etiquetas fluorescentes o de afinidad. De esta manera, es posible alquilar y atrapar en forma específica al ácido sulfénico y detectarlo de manera más sencilla (46-49). Por otro lado, se han desarrollado anticuerpos capaces de reconocer en forma específica al producto de la reacción de la dimedona con el

ácido sulfénico, 2-tiodimedona (50). Estos abordajes no solo permiten la detección *in vitro* de ácido sulfénico en proteínas individuales, sino que también permiten realizar abordajes más globales siguiendo, por ejemplo, la oxidación de las proteínas a nivel celular, así como análisis proteómicos.

El reactivo electrofílico, 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) ha sido también utilizado para la detección de ácido sulfénico. Este reactivo reacciona con especies nucleófilas tales como grupos amino, tioles y grupos hidroxilo de tirosinas (51-53). La reacción del NBD-Cl con estas especies da lugar a la formación de productos que presentan características espectrales particulares permitiendo su detección. El ácido sulfénico es también una especie nucleófila y por lo tanto susceptible a reaccionar con este reactivo. De hecho el NBD-Cl ha sido utilizado para la detección de ácido sulfénico formado en varias proteínas (35, 37, 54).

El ácido sulfénico puede ser también detectado tras la reacción con arsenito de sodio. Este compuesto reduce específicamente el ácido sulfénico a tiol. Por lo tanto, mediante la determinación de tioles antes y después del tratamiento con arsenito es posible determinar la concentración de ácido sulfénico (55). Recientemente se ha desarrollado un método de detección que puede ser utilizado en mezclas complejas basado en la reducción específica con arsenito seguido de la reacción con N-etilmaleimida conjugada con biotina lo que permite luego su detección con anticuerpos específicos (56).

El hecho que el ácido sulfénico reaccione con tioles puede también ser explotado como técnica de detección. El tionitrobenzoato (TNB) reacciona con el ácido sulfénico determinando una disminución en la absorbancia a 412 nm debido a la formación de un disulfuro mixto con propiedades espectrales diferentes. Este tiol ha sido utilizado para cuantificar el ácido sulfénico formado en proteínas tales como el componente AhpC de la alquil hidroperóxido reductasa de *Salmonella typhimurium* (57), la peroxirredoxina bovina de una cisteína BRPrx (58) y metionina sulfóxido reductasa de *Escherichia coli* (32). Recientemente, el TNB ha sido utilizado para detectar la formación de ácido sulfénico en mezclas más complejas como el plasma. En este caso, luego de la reacción la muestra se analizó por espectrometría de masa (59). Si bien esta técnica ha resultado útil para la detección y cuantificación de ácido sulfénico, hasta el momento no había sido sometida a un análisis más detallado que permita una caracterización más adecuada del método y por lo tanto una caracterización más exhaustiva del ácido sulfénico.

2.3 Albúmina sérica humana (HSA)

2.3.1 Generalidades y estructura de la HSA

La albúmina sérica humana (HSA, por su sigla en inglés, Human Serum Albumin) es la proteína más abundante en el espacio intravascular. En plasma se encuentra presente a una concentración de ~43 g/L (~0.6 mM) constituyendo el 60 % de las proteínas plasmáticas. Entre los 585 aminoácidos que la componen (66438 g/mol) existe un único triptofano en la posición 214, pocos residuos de metionina (6), glicina (12) e isoleucina (8) y un número elevado de leucinas (61), glutamatos (62), lisinas (59) y cisteínas (35). Estas últimas forman 17 disulfuros restando una única cisteína libre, la Cys34. Esta cisteína se encuentra conservada en todas las albúminas de mamíferos. El alto número de aminoácidos cargados determina que a pH 7 la HSA presente 215 iones por molécula, lo que facilita su solubilidad. Dado que los aminoácidos ácidos superan en número a los básicos, la proteína presenta ~19 cargas negativas a pH 7.4 (61).

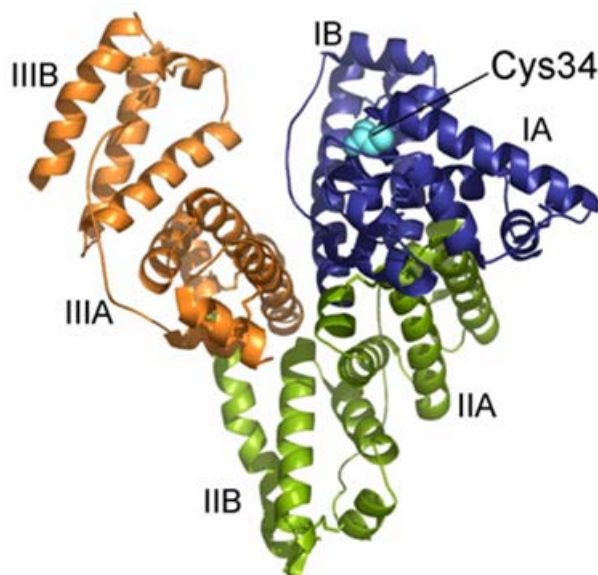


Figura 2.2. Estructura tridimensional de la HSA. El dominio I se muestra en azul, el II en verde y el III en naranja. La Cys34 se muestra en turquesa. Las coordenadas atómicas se obtuvieron del Protein Data Bank, código de acceso 1AO6 (60). La figura se generó utilizando PyMOL v0.99 (www.pymol.org).

La estructura cristalográfica de la HSA ya fue resuelta. Se trata de una proteína monomérica, globular, con 67 % de α -hélice y nada de hoja β -plegada. En su estructura se distinguen tres dominios homólogos, I, II y III, que se dividen en dos subdominios (A y B) (Figura 2.2). Los dominios no sólo son homólogos desde el punto de vista de su estructura primaria sino también muy similares en su estructura terciaria (60).

En ciertas condiciones no fisiológicas, la molécula de HSA sufre cambios conformacionales que se encuentran bien caracterizados. Por ejemplo, es sabido que presenta isomerizaciones cuando cambia el pH observándose cuatro conformaciones posibles: N (“normal”) entre pH 8 y 4.3, F (“fast”) entre pH 4.3 y 3, E (“extended”) por debajo de pH 3, B (“basic”) a pH mayor a 8 y A (“aged”) a pH mayor a 10 (61). La unión de ligandos también determina cambios conformacionales. Por ejemplo, la unión de ácidos grasos determina cambios globales y locales. Globalmente, la unión de ácidos grasos induce rotaciones relativas de los tres dominios de la proteína (62). Los cambios locales son más sutiles pero especialmente relevantes a nivel de la Cys34. Este último aspecto que hasta el momento no se había estudiado en forma sistemática, se retomará más adelante.

2.3.2 Biosíntesis, distribución y degradación de la HSA

La síntesis de HSA se da predominantemente en los hepatocitos. La misma ocurre a una velocidad de ~10-15 g por día en adultos sanos, lo que corresponde al 10 % de la síntesis de proteína en el hígado (63).

La HSA sigue la regla de “un gen-una proteína” y dado que es una proteína monomérica no requiere ensamblaje de cadenas. Ambos alelos del gen se encuentran en el cromosoma 4. Si bien la HSA aislada de plasma contiene 585 aminoácidos, cuando es traducida a partir de su ARN mensajero, contiene en el extremo amino terminal un prepéptido o péptido señal compuesto por 18 aminoácidos que indica que la proteína es de secreción y un propéptido compuesto por 6 aminoácidos de función desconocida. Cuando estas dos secuencias están presentes a la HSA se la denomina preproHSA. Los puentes disulfuro comienzan a formarse antes que termine la traducción y procede en sentido amino-carboxilo terminal. Este mecanismo sencillo es posible dado que la formación de puentes disulfuro ocurre secuencialmente a lo largo de la cadena polipeptídica. Porqué la primera cisteína, Cys34, no participa en la formación de enlaces disulfuro no es claro. Se podría explicar por la distancia de la Cys34 en relación a los puentes disulfuro en la conformación terciaria lo que impediría el enlace.

Una vez sintetizada, la HSA es secretada inmediatamente no existiendo almacenamiento de la proteína en el hepatocito. Solo existe un pequeño porcentaje (<2 %) que se encuentra en tránsito durante los 30 minutos que demora su viaje dentro de la célula antes de ser secretada. La vida media de la HSA es de 19 días. Aproximadamente el

40 % permanece en el compartimento intravascular mientras que el 60 % restante se ubica en el espacio extravascular. De hecho, se calcula que cada molécula de HSA abandona la circulación a través del sistema linfático cada 22-24 horas. La HSA extravascular se encuentra fundamentalmente en la piel y el músculo (61).

La degradación de la HSA ocurre mayoritariamente en el músculo, piel, hígado y riñón. Si se encuentra modificada en residuos específicos o desnaturalizada su degradación es mucho más eficiente. Se ha reportado que cambios en la hidrofobicidad y la carga neta de la proteína están estrechamente relacionados con la tasa de eliminación de la HSA. Existen al menos dos receptores, gp18 y gp30, presentes en las células endoteliales responsables del reconocimiento de la proteína modificada. Esta última es entonces endocitada y degradada en los lisosomas obteniéndose aminoácidos libres como producto final (61, 64-66). La HSA nativa no sigue esta vía sino que se une al receptor albodina (gp60) presente en las células endoteliales durante la transcitosis a través del endotelio y no parece ingresar al sistema de degradación endosoma-lisosoma (61, 67).

2.3.3 Funciones

La importancia de las proteínas plasmáticas, especialmente la HSA, en la estabilización del ambiente físico de la sangre ha sido reconocida por casi 90 años, pero la importancia de la HSA como vehículo de metabolitos, agente protector, participante en el metabolismo lipídico y en otras variadas actividades está aún siendo reconocida.

Funciones en la circulación. La HSA tiene un rol fundamental en el mantenimiento de la presión coloidosmótica siendo la responsable del 80 % de la misma. Dado que presenta ~19 cargas negativas a pH fisiológico, es el principal anión macromolecular en plasma. Además, de todas las proteínas plasmáticas, es quien provee la mayor capacidad amortiguadora de pH en el rango fisiológico. Si bien en sangre el principal amortiguador lo constituye la hemoglobina, en fluidos extravasculares la HSA adquiere una mayor importancia (61).

Transporte de metabolitos. La extraordinaria capacidad de la HSA para la unión de ligandos refleja su organización en varios dominios. Dado que es capaz de transportar prácticamente cualquier molécula pequeña, se ha vuelto una interesante candidata como transportadora molecular o nanovehículo con propósitos clínicos, biofísicos e industriales. En condiciones fisiológicas, la HSA une una gran variedad de compuestos exógenos y

endógenos de bajo peso molecular, así como también péptidos y proteínas.

Ácidos grasos. Dentro de los metabolitos endógenos más importantes se encuentran los ácidos grasos de cadena media y larga. Estas moléculas son altamente insolubles y metabólicamente muy activas con un tiempo de recambio de aproximadamente 2 minutos. Los ácidos grasos unidos a la HSA son transportados desde el intestino hacia el hígado, desde el hígado hacia el músculo y desde y hacia el tejido adiposo. En condiciones fisiológicas, la HSA transporta ~ 0.3 -1 ácido graso por molécula (68). Sin embargo, este número se puede incrementar durante el ejercicio intenso, estimulación adrenérgica y algunas patologías tales como diabetes mellitus (61). La HSA es capaz de unir hasta nueve ácidos grasos por molécula. Estos nueve sitios de unión se encuentran distribuidos en toda la proteína de manera asimétrica y presentan afinidades diferentes pero, en general, presentan un bolsillo hidrofóbico que interactúa con la cadena hidrocarbonada del ácido graso y un residuo básico o polar que interactúa con el carboxilato (69, 70). Los sitios 4 y 5, localizados en los subdominios IIIA y IIIB respectivamente, son los que presentan mayor afinidad por ácidos grasos. Los sitios 8 y 9 se consideran sitios de unión suplementarios y solo son ocupados por ácidos grasos de cadena corta o en presencia de concentraciones saturantes de ácidos grasos. Los sitios 3 y 4, compuestos por seis hélices- α ubicadas en el dominio IIIA, constituyen el sitio Sudlow II. Este sitio une carboxilatos aromáticos de conformación extendida, siendo el ibuprofeno (droga antiinflamatoria no esteroidea) el ligando prototípico. El sitio 7 se conoce también como sitio Sudlow I y se encuentra en una cavidad hidrofóbica del subdominio IIA. Este sitio une preferencialmente aniones heterocíclicos voluminosos, siendo su ligando prototípico la droga anticoagulante warfarina (61, 71).

Metales. La HSA presenta muchos sitios de unión a metales tales como Mg(II), Al (III), Ca(II), Mn(II), Co(II/III), Ni (II), Cu (I/II), Zn(II), Cd(II), Pt(II), Au(I/II), Hg(II) y Tb (III). Hasta el momento se han identificado tres sitios principales. El primer sitio se encuentra en el extremo amino terminal de la proteína. En este sitio los metales son coordinados con los átomos de nitrógeno de Asp1, Ala2 e His3. El segundo sitio lo constituye el tiol reducido de la Cys34, el cual es capaz de unir Au(I), Hg(II) y Pt(II). El tercer sitio se conoce como sitio de unión multimetal o sitio de cadmio A y está formado por los residuos His67, Asn99, His247 y Asp249 (61, 71).

Bilirrubina. Este compuesto insoluble derivado del catabolismo del hemo se forma en el bazo y se une a la HSA con alta afinidad siendo luego transportado hacia el hígado para su conjugación y excreción biliar. El sitio de unión de la bilirrubina ha sido históricamente asignado al sitio de Sudlow I (subdominio IIA). Sin embargo, existen reportes recientes que muestran que el sitio de unión del isómero más importante *in vivo* (4Z,15E-Bilirrubina-IX α) está en el subdominio IB (72).

Otros compuestos de bajo peso molecular. Muchas hormonas y vitaminas son también transportadas por la HSA. En muchos casos la HSA actúa no sólo como transportadora sino también como reservorio. También transporta ácidos biliares presentes en plasma (88 % del total), así como hemina. Algunos ligandos también se unen en forma covalente. Por ejemplo, las drogas disulfiram y captopril pueden formar disulfuros con la Cys34. Los compuestos exógenos se unen predominantemente en los sitios Sudlow I y II (61, 73).

Péptidos y proteínas. Hasta el momento se han detectado 35 proteínas que se asocian a la HSA entre las que se encuentran el angiotensinógeno, apolipoproteínas, ceruloplasmina, hemoglobina, plasminógeno, protrombina y transferrina. Dado que esto tiene un impacto en estudios proteómicos y de biomarcadores, se ha definido el “albuminoma” como la fracción de péptidos y proteínas que se unen a la HSA (74).

Funciones de protección. Además de su capacidad de unir toxinas volviéndolas así menos dañinas, la HSA presenta un rol antioxidante. En primer lugar, como se mencionó antes, la HSA une bilirrubina. Ésta última se ha propuesto como un antioxidante por su capacidad para atrapar radicales lipoperoxilos (LOO $\cdot$) (75). Además, la unión de la bilirrubina a la HSA evita que atraviese la barrera hematoencefálica evitando consecuencias neurotóxicas (76). En segundo lugar, debido a su capacidad para unir metales evita fenómenos como química de Fenton (61). En tercer lugar, se ha propuesto la capacidad de la albúmina para reducir hidroperóxidos formados en fosfolípidos por parte del disulfuro entre Cys392 y Cys438, aunque esto no debe considerarse una actividad enzimática de la proteína (77). Por último, la albúmina constituye un importante blanco de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, lo que la convierte en un atrapador de estas especies. La Cys34 es la principal responsable de esta capacidad y este punto será desarrollado a la largo de este trabajo.

2.3.4 Uso farmacéutico de la HSA

La terapia con HSA es considerada en casos de hipovolemia, shock, quemaduras, hipoalbuminemia, cirugía o trauma, bypass cardiopulmonar, síndrome de distrés respiratorio agudo, hemodiálisis y secuestro de fluidos ricos en proteínas. A pesar del hecho de que la terapia con HSA se ha utilizado con éxito por más de 50 años, aún resulta controversial y las ventajas sobre otros fluidos alternativos de menor costo continúa siendo objeto de debate y de múltiples ensayos controlados y meta-análisis (78, 79).

Actualmente, la HSA que se utiliza en pacientes se obtiene mayoritariamente a partir de plasma con una pureza >95 %, la cual es filtrada y calentada luego de la adición de estabilizantes. Esto presenta ciertas desventajas como ser el alto costo y la posibilidad de obtener solo cantidades limitadas. Además, las preparaciones de HSA a partir de plasma presentan riesgo biológico debido a la potencial presencia de agentes infecciosos presentes en la sangre tales como el virus de hepatitis y el de inmunodeficiencia humana, entre otros. Esto impulsó el desarrollo de la proteína recombinante (HSAr) en cantidad suficiente, con menores costos y sin riesgo de contaminaciones biológicas. Este aspecto se retomará más adelante.

2.4 Tiol de la HSA

2.4.1 Heterogeneidad del tiol de la HSA

Como se mencionó antes, la HSA presenta 35 cisteínas las cuales forman 17 puentes de disulfuro restando una sola cisteína libre, la Cys34. En plasma, la HSA es heterogénea en relación al estado de oxidación del tiol de la Cys34. La forma predominante, presente en un ~70 %, es la forma reducida la cual se conoce como mercaptalbúmina (HSA-SH). A esta concentración (~0.45 mM) el tiol reducido de la HSA constituye el 80 % de los tioles presentes en plasma.

Parte de la fracción no-mercaptalbúmina está constituida por disulfuros mixtos formados entre el tiol de la albúmina y tioles de bajo peso molecular como cisteína (160 μ M, 24 % del total de HSA), cisteinilglicina (16 μ M, 2.5 %), homocisteína (8.8 μ M, 1.4 %) y glutatión (1.3 μ M, 0.2 %) (80, 81). El resto de la fracción no-mercaptalbúmina no es reducible por agentes tales como ditioneitol (DTT) por lo que el tiol se encuentra en

niveles de oxidación superiores tales como ácido sulfínico (HSA-SO₂H) o ácido sulfónico (HSA-SO₃H) (82, 83). El tiol también puede encontrarse como S-nitrosoalbúmina (HSA-SNO). Esta especie, que ha sido detectada en concentraciones <0.2 µM (84, 85) puede constituir un reservorio de óxido nítrico y participar en reacciones de transnitrosación. La Cys34 puede encontrarse también formando aductos carbonilados tras una adición de Michael a aldehídos α,β-insaturados como el 4-hidroxinonenal, el cual es un subproducto de la peroxidación lipídica (86). Esto también ocurre en el caso de los ácidos grasos nitrados dando lugar a un aducto tiol-nitroalqueno (87).

En el caso de las albúminas comerciales la situación es más compleja pues existe mayor heterogeneidad (88). Las diferencias entre fabricantes y la variabilidad entre lotes aporta a la controversia acerca de la administración de HSA a pacientes y contribuye a la evidencia contradictoria de los ensayos clínicos.

La heterogeneidad de la HSA en relación al estado de oxidación del tiol ha sido estudiada por espectrometría de masa (83, 89) y por métodos cromatográficos. Era *et al.* (90) desarrollaron un método de HPLC utilizando una columna de intercambio aniónico-interacción hidrofóbica con una matriz de alta resolución que, según los autores, permite separar la HSA en tres fracciones: HSA reducida (HSA-1), HSA formando disulfuros mixtos (HSA-2) y HSA oxidada a sulfínico o sulfónico (HSA-3). Los autores proponen que la separación está probablemente mediada por diferencias de cargas así como alteraciones conformacionales no caracterizadas relacionadas al estado de oxidación del tiol. En el experimento de la Figura 2.3, realizado por Horacio Botti, se observa cómo, utilizando esta técnica, es posible analizar muestras de plasma y separar las tres fracciones de HSA. Tras la adición de peróxido de hidrógeno se observa un aumento en la fracción HSA-3 (13 %) y una disminución en la fracción HSA-1, consistente con la oxidación del tiol (91).

Como se verá más adelante, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar la heterogeneidad de la HSA en diversas condiciones patológicas. Sin embargo, no ha sido utilizada con fines preparativos probablemente debido a la baja capacidad de unión de esta matriz compleja. Además, el procedimiento requiere trabajar a temperaturas mayores que la ambiente (35 °C) y la elución se realiza en una mezcla etanol-amortiguador que se encuentra cerca del límite de solubilidad. Dado que el eluido presenta una alta concentración de sales, no es posible realizar análisis por espectrometría de masa en forma directa. Además, para separar las distintas isoformas de la HSA, es

conveniente basarse en alguna propiedad molecular directamente vinculada al estado de oxidación y de esa manera facilitar la interpretación de los resultados.

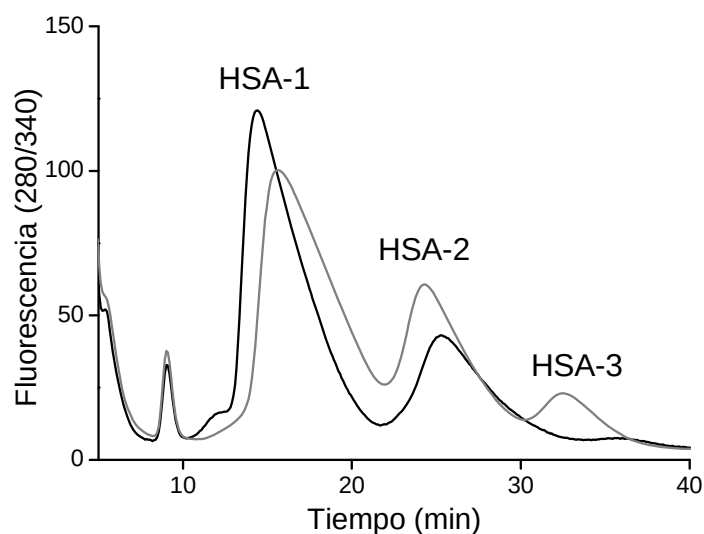


Figura 2.3. Análisis de plasma por cromatografía de intercambio iónico-interacción hidrofóbica. Se analizó plasma de un donante sano por HPLC utilizando una columna Shodex Asahipak ES-502N con un gradiente de etanol en sulfato de sodio 0.4 M/amortiguador acetato 0.05 M pH 4.85. Las fracciones HSA-1 (HSA-SH), HSA-2 (HSA-SSR) y HSA-3 (fracción no reducible con ditioneitol) pueden identificarse antes (trazo negro) y después de tratar con peróxido de hidrógeno (2 mM, 20 min, temperatura ambiente) (trazo gris). Adaptada de (91).

2.4.2 Reactividad del tiol de la HSA

La cisteína 34 se encuentra en la superficie del dominio I de la proteína y el átomo de azufre se encuentra orientado hacia el interior de la misma en una hendidura de ~ 9.5 Å.

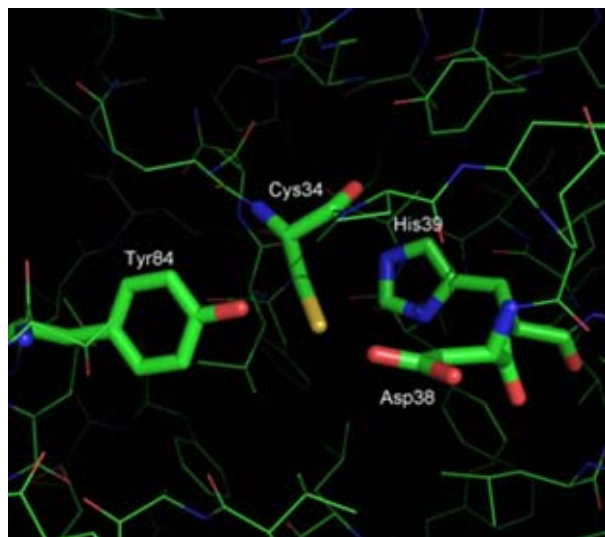


Figura 2.4. Estructura tridimensional de la zona próxima a la Cys34. Se destacan Asp38, His39 y Tyr84. Las coordenadas atómicas se obtuvieron del PDB, código de acceso 1AO6 (60). La figura se generó utilizando PyMOL v0.99 (www.pymol.org).

Se encuentra rodeado por las cadenas laterales de la Pro35, Val77, His39, Tyr84 y Asp38. Los últimos tres resultan particularmente relevantes dado que se trata de grupos ionizables (60, 92) (Figura 2.4). Según las estructuras cristalográficas obtenidas para HSA sin ligandos (cadenas A y B de 1AO6 y 1BM0), el oxígeno del grupo hidroxilo de la Tyr84 se encuentra a 3.1 ± 0.2 Å, los oxígenos carboxílicos del Asp38 se encuentran a 4.5 ± 0.3 y 6.0 ± 0.1 Å y los átomos de nitrógeno del anillo imidazol de la His39 se encuentran a 4.2 ± 0.3 y 4.4 ± 0.2 Å (60, 93). Se ha reportado que la Tyr84 y en menor grado la His39, afectan la reactividad del tiol. La Tyr84 se encuentra en un loop que parece vital en el control de la accesibilidad a la Cys34 (92).

La constante de acidez (pK_a) del tiol de la HSA es controversial. Mediante titulaciones potenciométricas se determinó el pK_a del tiol de la albúmina sérica bovina (BSA) obteniéndose un valor menor a 5 (94). Por otro lado, mediante el estudio de reacciones de intercambio tiol disulfuro se determinó que el pK_a de la HSA es menor a 6.7 (92). Sin embargo, resultados obtenidos por nuestro grupo utilizando diversas técnicas, indican que el pK_a de la Cys34 es similar al de la cisteína libre, obteniéndose un valor promedio de 8.0 ± 0.2 (93, 95).

Experimentos de RMN sugieren que el tiol de la Cys34 existe en dos conformaciones y que el tiol reducido predomina en un estado “enterrado” que cambia a un estado más expuesto luego de modificaciones químicas (96, 97). Los cambios estructurales que sufre la

HSA por cambios de pH también afectan la reactividad del tiol. Por ejemplo, la reacción de la HSA con el disulfuro 2,2'-ditiodipiridina mostró, además de un aumento a pH>7 indicativo de la deprotonación del tiol, un aumento a pH<5 probablemente debido a un cambio conformacional de la proteína (98).

El efecto que pueda tener la oxidación del tiol sobre la conformación es un área aún poco explorada. Se ha reportado que la oxidación del tiol determina cambios en la unión de ligandos y susceptibilidad a degradación proteolítica (99, 100). Sin embargo, ensayos de unión realizados con el ácido *cis*-parinárico (ácido graso de 18 carbonos fluorescente) y HSA-SH o HSA-SO₂H no mostraron correlación entre el estado de oxidación del tiol y la capacidad de la proteína para unir ácidos grasos (93).

El tiol de la HSA, a diferencia de los ácidos grasos y otros componentes del plasma, es el principal blanco de los oxidantes derivados del sistema xantina/xantina oxidasa (55, 101). Este residuo es también el principal blanco del peroxinitrito (ONOO⁻) obteniéndose una constante de $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4) para la reacción de oxidación (101). Además, se determinó la constante de la reacción entre el tiol y el peróxido de hidrógeno obteniéndose un valor de $2.26 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4) (42).

2.4.3 Ácido sulfénico en HSA

La primera evidencia reportada de que la oxidación de la HSA da lugar a un producto diferente a un disulfuro provino de la observación en la década de 1950 de que se necesitaba 1 mol de iodo para la oxidación de 1 mol de tiol de HSA, siendo que para formar un disulfuro se necesitarían 0.5 moles de yodo (20). La estequiometría uno a uno fue luego confirmada para el peróxido de hidrógeno como oxidante (42). Trabajos posteriores mostraron que la Cys34 reacciona con los oxidantes derivados del sistema xantina oxidasa/xantina y que dicha oxidación implica la formación de ácido sulfénico (HSA-SOH) pues es reversible en presencia de arsenito de sodio y no implica la formación de disulfuros intermoleculares (55, 102). También se obtuvo evidencia de la formación de HSA-SOH cuando se estudió su reacción con glutatión dado que el HSA-SOH reacciona con tioles dando lugar a la formación de un disulfuro (42, 43).

Finalmente, el análisis de espectrometría de masa de HSA oxidada con peróxido de hidrógeno y posteriormente derivatizada con dimedona demostraron de forma definitiva la

formación de ácido sulfénico a nivel de la Cys34. En muestras control de HSA reducida se detectó el fragmento tríptico de la Cys34 como el derivado carboximetilado, dado que la muestra fue alquilada previamente con ácido iodoacético para evitar reacciones con cisteínas de otros péptidos. En la muestra tratada con peróxido de hidrógeno se observó un péptido con un incremento de masa consistente con la reacción de la dimedona con el HSA-SOH. En ambos casos la naturaleza de los péptidos y la presencia de las modificaciones a nivel de la Cys34 fueron confirmadas con los espectros de masa en tándem (MS/MS) (42).

Como se mencionó antes, el NBD-Cl se ha utilizado para la detección de ácido sulfénico en otras proteínas. El sulfóxido, producto de la reacción entre el ácido sulfénico y NBD-Cl absorbe a 350 nm, mientras que el producto con el tiol, un tioéter, absorbe a 420 nm. En el marco de la tesina de grado, previa a esta tesis, se caracterizó su reacción con el HSA-SOH. Cuando se incubó HSA reducida con NBD-Cl dos veces en exceso y luego se eliminó el NBD-Cl remanente, se observó un máximo a 400 nm, que corresponde a la suma del producto con el tiol y el producto con una tirosina (382 nm) (Figura 2.5, panel A). De hecho, cuando se adicionaron cantidades estequiométricas de NBD-Cl se observó un máximo a 388 nm indicando que, en el caso de la HSA el NBD-Cl reacciona preferentemente con alguna tirosina que posteriormente se identificó como la Tyr411. Además, el NBD-Cl se une no covalentemente a la HSA, pero de manera muy fuerte pues no puede ser eliminado por gel filtración, y absorbe a 343 nm (Figura 2.5, panel B). Esto dificulta la distinción entre NBD-Cl unido no covalentemente y el producto de la reacción con el ácido sulfénico. Por lo tanto, en el caso de la HSA, el NBD-Cl no resulta un reactivo adecuado si la detección es espectrofotométrica, aunque puede utilizarse en estudios de espectrometría de masa (103, 104). Estos experimentos con NBD-Cl ilustran sobre algunas de las dificultades del trabajo con la HSA, dado que es capaz de unir en forma inespecífica y no covalente, pero sí fuertemente, muchas moléculas.

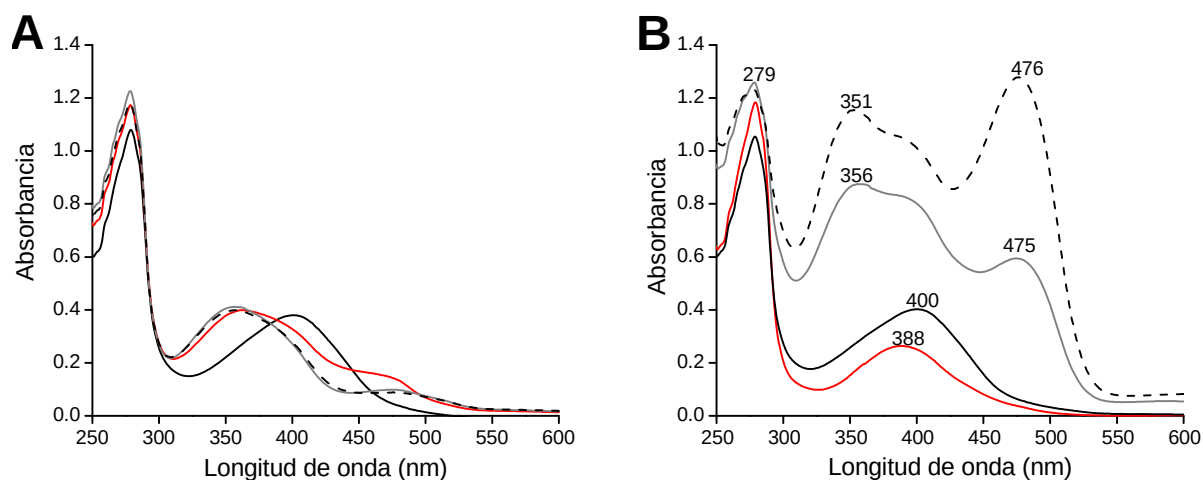


Figura 2.5. Espectos UV-vis de los productos formados a partir de NBD-Cl y HSA. (A) Se incubó NBD-Cl (1 mM, 30 min, 37 °C) con HSA reducida (0.5 mM, 0.8 SH/HSA, trazo negro), HSA tratada con HgCl₂ (trazo negro discontinuo), HSA enriquecida en HSA-SOH (4 mM H₂O₂, 4 min, 37 °C, trazo rojo) y HSA tratada con HgCl₂ y oxidada (4 mM H₂O₂, 4 min, 37 °C, trazo gris) seguido de gel filtración para eliminar el exceso de NBD-Cl. (B) Se incubó HSA (0.5 mM, 0.86 SH/HSA) con NBD-Cl 0.5 (trazo rojo), 1 (trazo negro), 4 (trazo gris) y 10 mM (trazo negro discontinuo) por 30 min y 37 °C seguido de gel filtración. Adaptada de (104).

2.4.4 HSA y patología

Hasta el momento se han detectado 77 mutaciones en el gen de la HSA y se han registrado 43 casos de analbuminemia que dan lugar a hipotensión arterial, edema, fatiga, hipercolesterolemia e hiperlipidemia (61, 105).

Un gran número de patologías son acompañadas por condiciones de estrés oxidativo. Por lo tanto, es de esperar que el estado redox de la HSA se encuentre alterado en condiciones fisiopatológicas. Si bien la HSA es susceptible a diversas modificaciones oxidativas, la Cys34 es un sitio particularmente sensible a la oxidación y por lo tanto es legítimo referirse al estado redox de la HSA en términos del estado de oxidación de la Cys34. En este sentido, diversos estudios han analizado el estado redox de la HSA en diversas condiciones patológicas utilizando fundamentalmente espectrometría de masa y la técnica cromatográfica mencionada antes (sección 2.4.1). Estos estudios demuestran que, en situaciones patológicas variadas, existe un aumento en las formas oxidadas de la Cys34 que correlaciona con una disminución en la forma reducida de la proteína. Los análisis no

sólo se restringen a la albúmina plasmática sino también a la albúmina presente en el humor acuoso, líquido sinovial, medio de cultivo de células y albúmina comercial. En la Tabla 2.1 se resumen las patologías y otras condiciones evaluadas en la literatura.

Como se mencionó antes, además de actuar como un antioxidante directo, la Cys34 también está involucrada en la detoxificación de los subproductos de la lipoperoxidación lipídica tales como los aldehídos α,β -insaturados dando lugar a la formación de aductos carbonilados. Estos últimos se han observado en condiciones de estrés oxidativo tales como patologías renales y diabetes (106).

Todas estas modificaciones postraduccionales de la Cys34 que aparecen o se ven incrementadas en procesos patológicos no se encuentran presentes cuando la HSA es secretada del hígado. Por lo tanto pueden constituir marcadores potenciales de la existencia de procesos oxidativos y de la capacidad antioxidante del tiol de la HSA.

Tabla 2.1. HSA oxidada en condiciones patológicas y de estrés oxidativo elevado.

Condición	Método	Observaciones/modificaciones	Referencias
Envejecimiento	Cromatografía ^a Medida de tioles Medida de tioles por HPLC	Disminución en la fracción HSA-SH Disminución en la relación SH/HSA Disminución en los tioles proteicos reducidos	(107-109)
Glomeruloesclerosis focal y segmentaria	Espectrometría de masa (LC-ESI-MS/MS para péptidos, ESI-MS para proteína entera) ^b	Detección de ácido sulfónico en HSA	(89, 110)
Disfunción renal	Cromatografía ^c	Incremento de las fracciones oxidadas con una disminución de la función renal	(111)
Diabetes mellitus	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(112)
Desórdenes de la articulación temporomandibular	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas del líquido sinovial	(113)
Catarata senil	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas del humor acuoso	(114)
Enfermedad hepática (cirrosis, falla hepática aguda y crónica)	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(115)
Ejercicio intenso	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(116)
Restricción de crecimiento intrauterino	Espectrometría de masa (LC-ESI-TOF de proteína entera) ^d	Altos niveles de HSA materna cisteinilada	(117)
Hemodiálisis	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(118)
Cirugía invasiva y anestesia	Cromatografía ^a	Aumento en las fracciones oxidadas	(119)

^aCromatografía de intercambio iónico-interacción hidrofóbica. Columna Asahipak GS-520H, amortiguador de elución fosfato de sodio 0.03M, citrato de trisodio 0.3 M, pH 6.86-6.80.

^bLC, cromatografía líquida; ESI, ionización por electrospray; MS, espectrometría de masa.

^cCromatografía de intercambio iónico-interacción hidrofóbica. Columna Shodex Asahipak ES-502, fase móvil sulfato de sodio 0.4 M, acetato 0.05 M, pH 4.85 y elución con gradiente de etanol de 0 a 5-10%.

^dLC, cromatografía líquida; ESI, ionización por electrospray; TOF, tiempo de vuelo.

2.5 Defensas antioxidantes en el espacio intravascular

El proteoma del plasma es de elevada complejidad presentando más de 3000 componentes proteicos en concentraciones que varían dentro de 12 órdenes de magnitud. Entre las proteínas más abundantes se encuentran la HSA, que constituye la mitad de las proteínas plasmáticas, inmunoglobulinas, apolipoproteínas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, factores del complemento y proteínas transportadoras. Sin embargo, en lo que respecta a las defensas antioxidantes el plasma es un compartimento pobre. De hecho, de las 150 proteínas presentes en plasma en concentraciones mayores a $0.06 \mu\text{M}$, la única que se encuentra con un posible rol antioxidante, además de la HSA, es la glutatión peroxidasa 3(120).

Los antioxidantes plasmáticos de bajo peso molecular incluyen al ácido ascórbico o vitamina C ($30\text{-}150 \mu\text{M}$ (121)), ácido úrico ($160\text{-}450 \mu\text{M}$ (121)), tocoferol ($15.4 \mu\text{M}$ (122)), bilirrubina ($5.1\text{-}17 \mu\text{M}$), carotenoides y tioles, entre otros. En el caso de los tioles de bajo peso molecular se observa que la concentración de la forma reducida es muy baja ($15\text{-}20 \mu\text{M}$) (Tabla 2.2). En contraste a la situación intracelular, caracterizada por una relación tiol/disulfuro alta y concentraciones de tioles totales de $\sim 50 \text{ mM}$ y de glutatión reducido de $\sim 5 \text{ mM}$, el plasma es un compartimento extracelular oxidante caracterizado por relaciones tiol/disulfuro menores a 0.1 para cisteína, cisteinilglicina y homocisteína. Las excepciones son el glutatión (tiol/disulfuro ~ 2) y la HSA (tiol/disulfuro ~ 3). Los diferentes pares tiol/disulfuro no se encuentran en equilibrio, lo que sugiere la existencia de barreras cinéticas para mantener las concentraciones del estado estacionario. Estos “cuellos de botella” aún no han sido completamente identificados y probablemente impliquen no solo velocidades de las reacciones químicas sino también velocidades de transporte entre compartimentos.

Los tioles reducidos más abundantes en plasma son los proteicos, siendo el tiol de la HSA el mayoritario dado que aporta el 80 % de los tioles plasmáticos. La glutatión peroxidasa (Gpx) es una selenoproteína que existe en cinco isoformas, encontrándose en plasma solo la isoforma 3 (Gpx3). Esta enzima es capaz de reducir hidroperóxidos a expensas de glutatión y los sistemas tioredoxina y glutarredoxina (123). Se ha reportado que la misma reacciona con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito con constantes de $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (124) y $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (125) por tetrámero de Gpx, respectivamente. En plasma de donantes sanos se encuentra en una concentración de $0.5\text{-}0.8 \mu\text{M}$ (126) y puede

aumentar en diferentes condiciones, como por ejemplo el asma (127).

En lo que respecta a otras proteínas que pueden participar en procesos redox de tioles, es de mencionar la selenoproteína P. Ésta glicoproteína extracelular rica en selenocisteína participa en la homeostasis de selenio. En plasma humano se encuentra en concentraciones del orden de 0.1 μM . Esta proteína posee la capacidad de reducir hidroperóxidos fosfolipídicos y peroxinitrito a expensas de glutatión y tiorredoxina pero no reduce peróxido de hidrógeno (128). La constante de reacción con peróxido de fosfatidilcolina es de $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (129). Por su parte, la tiorredoxina se encuentra en concentraciones del orden de 0.07-1 nM y puede verse aumentada en pacientes sépticos alcanzando valores de 8.4 nM (130). La glutarredoxina se encuentra a una concentración de 1.1 nM (131). La tiorredoxina reductasa también se encuentra presente en plasma a una concentración de 0.3 nM (132). No existen reportes de la presencia de glutatión reductasa. Por último, se ha detectado en plasma la presencia de peroxirredoxina 2 (Prx2) en pacientes con síndrome respiratorio agudo severo (133) y la presencia de peroxirredoxina IV la que cual se ve aumentada en condiciones de sepsis y artritis reumatoidea (134).

A diferencia de lo que ocurre en el plasma, los eritrocitos llevan a cabo una importante función como atrapadores circulantes de especies reactivas. Estas células se encuentran equipadas con una importante batería antioxidante. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el ácido ascórbico, vitamina E y glutatión. Además, los eritrocitos presentan altas actividades de algunas de las enzimas antioxidantes más importantes tales como CuZn superóxido dismutasa, glutatión reductasa, el sistema metahemoglobina reductasa/NADH/glicólisis para mantener la hemoglobina con el hierro en estado Fe^{2+} , catalasa, glutatión peroxidasa y el sistema peroxirredoxina/tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (135). La Prx2, la peroxirredoxina más abundante del eritrocito, se encuentra a una concentración de 240 μM y reacciona con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito con constantes de 1.0×10^8 y $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4), respectivamente (136). Por lo tanto, es capaz de competir con la catalasa (0.6 μM (137), $k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y la glutatión peroxidasa (Gpx1) (~50 μM (138), $k = 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) por la reducción del peróxido de hidrógeno.

Tabla 2.2. Concentración de tioles en plasma de hombres adultos sanos

Especie	Concentración (μM)	Referencias
Albúmina total	650	(61)
Tioles proteicos	452	(109)
Cisteína		
Total	202 - 268	(80, 81, 139)
Reducida	8.3 - 10.7	(80, 81, 109)
Disulfuros bajo peso molecular	85 - 122	(80, 81, 109)
Disulfuros mixtos proteicos	145 - 176	(80, 81, 109)
Cisteinilglicina		
Total	31.8 - 35.8	(80, 81)
Reducida	2.6 - 2.9	(80, 81, 109)
Disulfuros bajo peso molecular	9.7 - 13.5	(80, 81, 109)
Disulfuros mixtos proteicos	12 - 20	(80, 81, 109)
Homocisteína		
Total	8.3 - 11.9	(80, 81, 139)
Reducido	0.17 - 0.32	(80, 81, 109)
Disulfuros bajo peso molecular	1.9 - 2.4	(80, 81, 109)
Disulfuros mixtos proteicos	7.3 - 10.4	(80, 81, 109)
Glutación		
Total	6.2 - 7.3	(80, 81)
Reducido	3.3 - 5.1	(80, 81, 109)
Disulfuros bajo peso molecular	1.4 - 3.2	(80, 81, 109)
Disulfuros mixtos proteicos	0.7 - 1.9	(80, 81, 109)
γ-glutamilcisteína		
Total	3.1 - 5.4	(81, 139)
Reducidos	0.06	(81)
Disulfuros bajo peso molecular	1.8	(81)
Disulfuros mixtos proteicos	1.2	(81)

2.6 HSA recombinante

2.6.1 Sistemas de expresión

Dado que se trata de una proteína no glicosilada ha sido posible evaluar la producción de HSA recombinante en diversos sistemas de expresión entre los que se encuentran diversos microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*. En muchos de estos sistemas, la proteína no es secretada correctamente lo que dificulta la obtención de cantidades razonables de proteína para uso biomédico e industrial. Además, se han hecho ensayos en animales (140) y plantas transgénicas (141). Recientemente, se han obtenido buenos resultados en sistemas de expresión basados en semillas de arroz (142).

De todos los candidatos evaluados quien resultó más adecuado, junto con la expresión en arroz, fue la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, existiendo al momento abundante literatura sobre la utilización de este sistema para la producción de HSA recombinante (143-147).

2.6.2 *Pichia pastoris*

La levadura *Pichia pastoris* presenta diversas ventajas como sistema de expresión de proteínas recombinantes. Comparado con células de mamífero, *P. pastoris* no requiere medios o condiciones de cultivo complejos y es genéticamente fácil de manipular, sin embargo posee una vía de síntesis de proteínas eucariota lo cual representa una importante ventaja.

Esta levadura metilotrófica es capaz de usar metanol como única fuente de carbono. Las enzimas que participan en la vía de metabolización del metanol sólo están presentes cuando las células crecen en metanol. La enzima alcohol oxidasa (AOX) cataliza el primer paso en la vía de utilización de metanol. Existen dos genes que codifican para esta enzima: *AOX1* y *AOX2*. El primero es el responsable de la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa en la célula y su expresión está regulada a nivel de la transcripción. En células que están creciendo en metanol, aproximadamente el 5 % del ARN total corresponde al ARN poli(A)+ de *AOX1*, mientras que en células creciendo en presencia de

otra fuente de carbono el mensajero de *AOX1* es indetectable. Por todo lo mencionado antes, para la mayoría de las proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris* se utiliza el promotor de *AOX1* (148, 149).

Los vectores de expresión que contienen el gen de la proteína que se busca expresar se integran al genoma de la levadura lo que maximiza su estabilidad. Generalmente, el vector se digiere en un único punto a nivel del promotor de *AOX1* y éste recombina en el genoma de la levadura. La secreción requiere de la presencia de un péptido señal. Se han utilizado una gran variedad de péptidos señal, entre los que se encuentran la señal de secreción nativa de la proteína heteróloga o el propéptido (factor α) de *S. cerevisiae* (148).

Para la selección de transformantes, se suele utilizar el antibiótico Zeocina (Invitrogen). Este antibiótico, de la familia de la bleomicina, es altamente tóxico para bacterias, hongos (incluyendo levaduras), plantas y líneas celulares de mamíferos dado que se une al ADN e induce la formación de cortes en las hebras causando la muerte celular. Por lo tanto, la Zeocina es activa tanto en bacterias como en levaduras por lo que puede utilizarse como un único marcador de resistencia a drogas en ambos sistemas. Generalmente, los vectores disponibles comercialmente presentan la secuencia codificante para una proteína que se une estequiométricamente con el antibiótico y lo inhibe. La expresión de esta proteína se da tanto en hospederos procariotas como en eucariotas.

Usualmente en *P. pastoris* se obtienen altos niveles de producción de proteínas heterólogas. Además, la levadura es capaz de llevar a cabo modificaciones postraduccionales observadas en células de eucariotas superiores tales como procesamiento proteolítico, plegamiento, formación de disulfuros y glicosilación (150). Esto determina que un gran número de proteínas puedan plegarse y secretarse correctamente. El hecho de que las proteínas recombinantes sean secretadas sumado a que *P. pastoris* libera niveles mínimos de proteínas endógenas al medio y que los medios de cultivo necesarios no contienen proteínas, hace que la proteína recombinante sea la mayoritaria en el medio. Esto representa un primer paso en la purificación de la proteína que se está expresando.

2.6.3 Propiedades y uso clínico de la HSA recombinante

Estudios estructurales y de funcionalidad han demostrado que la HSAr producida en *Pichia pastoris* es muy similar a la albúmina purificada de plasma. La estructura secundaria, así como la posición de los puentes disulfuro resultan ser iguales a la albúmina purificada de plasma. Además, mediante ensayos de dicroísmo circular y de cristalografía de rayos X se determinó que la HSAr presenta la misma estructura terciaria (60, 151). Por otro lado, estudios *in vivo* han demostrado que la vida media, excreción, antigenicidad y distribución en tejidos es también comparable a la obtenida de plasma (152, 153).

En el año 2007, se autorizó el uso médico de HSAr producida en *P. pastoris* y un año después se lanzó para uso terapéutico en Japón. De hecho, ya ha sido utilizada con éxito en pacientes con síndrome nefrótico, shock hemorrágico, cirrosis hepática y pacientes sometidos a cirugía cardíaca (153-155). Por otro lado, la disponibilidad de la proteína en forma recombinante ha permitido desarrollar nuevas aplicaciones farmacéuticas tales como productos de fusión con citoquinas, interferón α -2b, interleuquina 2, el factor estimulante de granulocitos y péptidos bioactivos (156). El producto de fusión con interferón α -2b, cuyo nombre comercial es Albuferol o Albinterferón, alcanzó la fase clínica III. Sin embargo, en el año 2010 por indicación del FDA, Novartis y Human Genome Science cesaron el desarrollo de la droga cuando uno de los miembros del equipo de investigación fue acusado de fraude al ocultar efectos adversos de la droga sobre algunos pacientes.

Además de los aspectos clínicos, la HSA recombinante presenta varias ventajas en cuanto al trabajo de investigación *in vitro* en el laboratorio. En primer lugar, representa una fuente inagotable de proteína lo que disminuye los costos. En segundo lugar, disminuye la heterogeneidad de la proteína en cuanto a modificaciones postraduccionales lo cual es un problema en la albúmina comercial dado que la misma es aislada de plasma de diversos donantes. Por último, el contar con sistemas de expresión de la proteína en forma recombinante permite la generación de mutantes en residuos de interés.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

En este trabajo se plantea desarrollar estrategias para la detección y cuantificación del ácido sulfénico formado en albúmina sérica humana tras la exposición a oxidantes. Asimismo, se plantea caracterizar la formación, estabilidad y reactividad de dicho ácido sulfénico.

3.2 Objetivos específicos

1. Utilizar la reacción con tionitrobenzoato para caracterizar la reactividad y estabilidad del ácido sulfénico formado en la albúmina sérica humana expuesta a peróxido de hidrógeno y su modulación por ácidos grasos.
2. Desarrollar estrategias cromatográficas y de espectrometría de masa para la separación y análisis de las diferentes isoformas oxidadas de la albúmina.
3. Producir albúmina humana recombinante en *Pichia pastoris* y generar variantes mutantes en residuos clave.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y soluciones

Materiales. En la mayor parte de este trabajo se utilizó HSA en solución (25 %) para uso clínico obtenida de ZLB Bioplasma (Suiza). En los experimentos con ácidos grasos se utilizó HSA de Sigma (fracción V) y en los de cromatoenfoque y posterior análisis por espectrometría de masa se utilizó HSA en solución (20 %) obtenida de Green Cross (Corea). Excepto que se especifique lo contrario, los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Preparación de soluciones. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , J. T. Baker Co.) se preparó en agua nanopura y su concentración se determinó mediante absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (157). Para la medida de tioles se preparó una solución madre de DTNB 10 mM en amortiguador pirofosfato 100 mM, pH 9, a partir de la cual se preparó una solución 0.2 mM en este amortiguador. La dimedona (1 M) se preparó en etanol 95 % y la N-etilmaleimida (100 mM) en agua. Ascorbato (0.5 M) y arsenito (0.2 M) se prepararon en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4 y el pH se ajustó a 7.4 adicionando HCl 5 M. El ácido úrico (0.05 M) se preparó en NaOH (0.3 M). L-Alanina, L-histidina, L-lisina y L-arginina se prepararon en agua nanopura. Las soluciones de ácidos grasos (200 mM) se prepararon en el momento en metanol con agitación sobre plancha a 80 °C hasta la completa disolución de los mismos. Los experimentos de exposición de HSA a peróxido de hidrógeno y posterior detección de ácido sulfénico fueron llevados a cabo en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM. Este último se adiciona con el objetivo de quelar posibles trazas de metales presentes en el amortiguador.

Deslipidación de albúmina. La albúmina fue deslipidada por el método del carbón activado, con el objetivo de eliminar ácidos grasos y otras moléculas contaminantes (158). Se acidificó (pH = 3) una solución 10 % de la proteína mediante el agregado de HCl concentrado (~ 5 M). Por cada gramo de albúmina se adicionaron 0.5 g de carbón activado y se incubó durante 1 hora bajo agitación a 4 °C. El carbón activado se eliminó mediante centrifugación y posterior filtración de la solución utilizando filtros de 0.8 y 0.22 μm simultáneamente. Por último, la solución se llevó a pH 7.4 mediante el agregado de NaOH y se almacenó a -18 °C. La concentración de albúmina se determinó a partir de su absorbancia a 279 nm ($\epsilon = 0.531 \text{ (g/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), asumiendo un peso molecular de 66438

g/mol (61). Como alternativa al carbón activado se evaluó la utilización de la resina Lipophilic Sephadex (hidroxialcoxipropildextrano) (Sigma, equivalente a Lipidex-1000). La resina se empaquetó en una columna, se equilibró con agua destilada y se termostatóizó a 37 °C. Se cargaron 0.05 g de HSA por gramo de resina seca. La elución se llevó a cabo con agua destilada a 37 °C y un flujo de 1 mL/min. El resultado de la deslipidación se evaluó mediante espectros UV-Vis de la HSA observándose que la deslipidación con carbón activado fue más efectiva.

Reducción del tiol de la albúmina. El tiol de la albúmina, como consecuencia del proceso de purificación y almacenamiento, se encuentra parcialmente oxidado. Para revertir esta situación se incubó la albúmina deslipidada con 2-mercaptoetanol 10 mM toda la noche a 4°C en agitación. El exceso de reductor se eliminó mediante una gel filtración en columnas PD-10 (GE Healthcare). Luego de este proceso se obtuvieron soluciones con una concentración de albúmina de ~1 mM. Los moles de tiol por mol de albúmina, SH/HSA, determinados utilizando DTNB, se encontraron en el rango de 0.7-0.9. Esta solución de albúmina, cuyo tiol se encontraba mayoritariamente reducido, se denominó HSA reducida.

Bloqueo del tiol. Se incubó HSA reducida (~1 mM) con N-etilmaleimida (NEM) siete veces en exceso durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo agitación continua. Para eliminar el exceso de NEM se realizó una gel filtración en PD-10 equilibrada con amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM.

Lipidación de albúmina. Se incubó HSA (~1 mM en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM) previamente deslipidada y reducida con cantidad suficiente de una solución metanólica del ácido graso (200 mM) para alcanzar una relación ácido graso-HSA de 5/1 durante 1 h con agitación a temperatura ambiente. El exceso de ácidos grasos y el metanol se eliminaron mediante gel filtración en columna PD-10 equilibrada con el amortiguador.

Oxidación de albúmina. Para obtener una mezcla enriquecida en HSA-SOH, se incubó HSA reducida (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno (4 mM) durante 4 minutos a 37 °C en amortiguador fosfato (100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM). Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó catalasa suficiente para consumir el 98 % del peróxido de hidrógeno remanente en 5 segundos. Esta solución se conservó en hielo y se utilizó en el día. Para obtener fracciones enriquecidas en el producto de descomposición de HSA-SOH, HSA-SX, se incubó HSA reducida (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno (4 mM, 37 °C, pH 7.4), se detuvo la reacción con catalasa y la mezcla se incubó a 37 °C durante 40 min. Para obtener

fracciones enriquecidas en formas sobreoxidadas del tiol, se incubó HSA reducida (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno (15 mM, 4 min, 37 °C, pH 7.4) y se detuvo la reacción con catalasa.

Catalasa. La catalasa se preparó en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM, obteniéndose una concentración final de 2 mg/mL. Debido al elevado K_M de la enzima, es necesario utilizar la constante de velocidad de pseudoprimer orden en lugar de las unidades de enzima tradicionales (159). Por este motivo se determinó la concentración de la solución madre midiendo experimentalmente la constante de pseudoprimer orden para peróxido de hidrógeno 10 mM, calculándose luego la concentración de catalasa necesaria para consumir el 98 % del peróxido de hidrógeno en 5 segundos.

Soluciones de tioles de bajo peso molecular. Las soluciones de L-cisteína (100 mM), L-glutación (100 mM), L-cisteinilglicina (50 mM), 2-mercaptoetanol (50 mM), L-cisteína etiléster (50 mM), N-acetil-L-cisteína (150 mM) y cisteamina (71.6 mM) se prepararon en agua nanopura. La homocisteína (200 mM) se preparó a partir de DL-homocisteína tiolactona incubando con NaOH (5 M) por 5 minutos a 37 °C y luego neutralizando con HCl (5 M) y amortiguador fosfato 0.2 M, pH 7.4. Todas las soluciones fueron purgadas con N₂ o Ar por 5 minutos para evitar la oxidación. La concentración de tiol se determinó utilizando DTNB antes y después de realizado el experimento.

Determinación de tioles. La concentración de tioles en las distintas muestras de HSA se determinó mediante la reacción con DTNB. Las muestras de albúmina (~25 µM) se incubaron con DTNB (0.2 mM) durante 5 minutos en amortiguador pirofosfato 100 mM, pH 9, a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción libera TNB el cual es cuantificado por absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (160). En todos los casos se realizó un control sin proteína dado que a pH alcalino el DTNB se hidroliza dando lugar a la liberación de TNB. Dado que el éste último reacciona con HSA-SOH, cuando se trabajó con HSA enriquecida en HSA-SOH, los tioles se cuantificaron utilizando *p*-cloromercuribenzoato (*p*-CMB) (161). En este caso, se tituló la HSA (30 µM) adicionando alícuotas de *p*-CMB en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.5) y registrando la absorbancia a 250 nm. Se obtuvieron dos rectas con pendientes diferentes y de la intersección de las mismas se determinó la concentración de tioles.

Síntesis de TNB. El TNB se sintetizó a partir de su disulfuro, DTNB, según protocolo puesto a punto en la tesina de grado (162). Se preparó una solución de DTNB (5 mM) en agua

destilada y se alcalinizó hasta la completa disolución del DTNB. Luego se adicionó 2-mercaptoetanol ~30 veces en exceso y la mezcla se incubó a temperatura ambiente, bajo agitación, durante 30 minutos. La completa reducción del disulfuro se confirmó midiendo la absorbancia a 412 nm. Para purificar el TNB se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico considerando que a pH neutro el 2-mercaptoetanol no presenta carga neta y el TNB presenta carga negativa. Para ello se utilizó una columna de Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) previamente equilibrada con amortiguador Tris 20 mM, pH 7.5. La columna se lavó con 10 volúmenes del mismo amortiguador y luego con 10 volúmenes de agua destilada. Para eluir el TNB se utilizó HCl 50 mM (pH 1.3), el cual neutraliza al TNB. La solución ácida se alícuotó y almacenó a -20 °C. Antes de cada experimento se verificó la ausencia de DTNB adicionando glutatión, 2-mercaptoetanol o HSA reducida, observándose que no había aumentos en la absorbancia a 412 nm.

4.2 Caracterización de ácido sulfénico en albúmina mediante la reacción con tionitrobenzoato

Reacción entre HSA-SOH y TNB. Se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μ M) con TNB (70 μ M) en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM y se registró la absorbancia a 412 nm y 25 °C. Se incluyeron controles sin HSA y con HSA reducida, con su tiol bloqueado o HSA enriquecida en HSA-SO₂H (H₂O₂ 15 mM, 4 min, 37 °C). Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible. En algunos casos, se utilizó el accesorio de flujo detenido Applied Photophysics RX2000 Rapid Kinetics y el Cary Single Cell Peltier.

Aceleración de la reacción entre TNB y peróxido de hidrógeno por la HSA. Se mezcló peróxido de hidrógeno (10 mM) con TNB (60 μ M) en ausencia y presencia de distintas concentraciones de HSA reducida ([SH] = 3-12 μ M) y se registró la disminución de la absorbancia a 412 nm y 25 °C durante ~7 min.

Estabilidad de HSA-SOH. Se obtuvo HSA enriquecida en HSA-SOH como se indicó anteriormente y se detuvo la reacción con catalasa. La mezcla se incubó a 4, 25 o 37 °C en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM y a tiempos crecientes se tomaron alícuotas (50 μ M) que se mezclaron con TNB (70 μ M) previamente equilibrado a 25 °C. Se registró la velocidad inicial de decaimiento en la absorbancia a 412 nm y 25 °C, indicativa de la concentración de HSA-SOH. Para evaluar la dependencia con el pH de la cinética de

decaimiento se preparó HSA enriquecida en HSA-SOH en amortiguador fosfato 1 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM y se detuvo la reacción con catalasa. Se tomó una alícuota que se mezcló en una jeringa del accesorio de flujo detenido con amortiguador de tres componentes (ácido acético 20 mM, MES 20 mM, Tris 40 mM) de pH variable (3.75-8.35). En la segunda jeringa se mezcló TNB (140 μ M) en amortiguador Tris 1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM. A tiempos crecientes se realizaron disparos y se registró el decaimiento en la absorbancia a 412 nm y 25 °C.

Reacción de HSA-SH y HSA-SOH con peróxido de hidrógeno. Se incubó HSA reducida (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno (4 mM) a 37 °C. A tiempos crecientes se tomaron alícuotas (50 μ M) y se mezclaron con catalasa y TNB (70 μ M) previamente equilibrado a 25 °C. Se registró la absorbancia a 412 nm durante 30 s y se determinó la velocidad inicial de disminución de la absorbancia para evaluar la concentración de HSA-SOH.

Reacción de HSA-SOH con dimedona, arsenito de sodio, urato y ascorbato. Se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH a 37 °C en presencia y ausencia de arsenito de sodio (8.3-30 mM), dimedona (90-167 mM), urato (1 mM) o ascorbato (20 mM). A tiempos crecientes se tomaron alícuotas (50 μ M) y se mezclaron con TNB (70 μ M) previamente equilibrado a 25 °C. Se registró la absorbancia a 412 nm durante 30 s y se determinó la velocidad inicial de consumo de TNB.

Reacción de HSA-SOH con tioles y aminos. Las constantes de reacción entre HSA-SOH y tioles de bajo peso molecular se determinaron mediante competencia por la reacción con TNB. Se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μ M) con TNB (70 μ M) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de cisteína (0.2-1 mM), cisteinilglicina (0.11-0.42 mM), glutatión (1-7 mM), homocisteína (1-5 mM), 2-mercaptoetanol (0.25-1 mM), cisteína etiléster (0.06-0.22 mM), N-acetilcisteína (1.6-6.5 mM) y cisteamina (0.07-0.16 mM) utilizando un accesorio de flujo detenido. Se registró la absorbancia a 412 nm y 25 °C durante 5-15 minutos y los datos obtenidos se ajustaron a una función exponencial más una recta. Este mismo abordaje experimental se utilizó para evaluar la reactividad de HSA-SOH con alanina (10 mM), histidina (20 mM), lisina (10 mM) y arginina (10 mM).

Análisis por espectrometría de masa “Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)” de la reacción entre HSA-SOH y TNB. Para el análisis de la proteína entera se incubó HSA reducida y enriquecida en HSA-SOH (50 μ M) con TNB (70 μ M) a 25 °C y se tomaron alícuotas a los 10 minutos y a las dos horas. Las muestras fueron tratadas o no con

ditiotreitol (DTT, 10 mM, 20 min) y se pasaron dos veces por microcolumnas de gel filtración (Sephadex G-25, GE Healthcare) equilibradas con ácido acético 1 %. Las muestras se diluyeron en ácido acético 1 % y metanol 50 % hasta una concentración final de 1 μ M y se inyectaron directamente al espectrómetro de masa QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS Sciex) a un flujo de 10 μ L min⁻¹. Se colectaron los espectros en modo positivo utilizando un rango m/z de 1000-1700, un “ion spray voltage (IS)” de 5500 V, un “declustering potential (DP)” de 50 V y un “entrance potential (EP)” de 10 V. Los datos se adquirieron durante 2 min con un promedio de 140 espectros de masa. La masa final de la proteína entera se calculó mediante deconvolución utilizando el programa Analyst 1.4.

Análisis por ESI-MS de HSA oxidada y tripsinizada. Para analizar el fragmento tríptico que contiene a la Cys34 en las muestras de HSA (0.5 mM) expuestas a peróxido de hidrógeno (4 mM, 37 °C, pH 7.4) por distintos períodos de tiempo (0, 4 y 30 min), se diluyó la proteína a 75 μ M en amortiguador bicarbonato de amonio (50 mM, pH 8.2) y se incubó con tripsina toda la noche (HSA:tripsina, 200:1). La mezcla de péptidos se diluyó 26 veces en ácido acético 1 % y metanol 50 %, se inyectó directamente en el espectrómetro de masa (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS Sciex) y se analizó en el modo “Enhanced Resolution” (ER) para obtener mayor resolución y confirmar la carga del péptido. El análisis por espectrometría de masa en tándem (MS/MS) para iones específicos se obtuvo en el modo “Enhanced Product Ion (EPI)” utilizando un rango de m/z de 100-1700, con IS = 5000 V, DP = 20 V, 150 °C y una “collision energy (CE)” de 50 V.

Análisis por “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)” de HSA oxidada y tripsinizada. Las muestras tripsinizadas del experimento anterior se analizaron en un sistema 4800 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems) utilizando una solución matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 50 % acetonitrilo y 0.2 % ácido trifluoroacético.

4.3 Utilización de tionitrobenzoato para caracterizar a la alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE)

Determinación de la concentración de AhpE, reducción y medida de tioles. La enzima alquilhidroperóxido reductasa E de *Mycobacterium tuberculosis* (MtAhpE) se expresó en *Escherichia coli* como proteína recombinante con cola de histidina y se purificó según (163). Su concentración se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm utilizando un

coeficiente de absorptividad molar de $23950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ calculado según (164). La concentración de enzima también se determinó por el método de Biuret y el método de Bradford y en ambos casos se observó una sobreestimación de la concentración de enzima. El tiol de la enzima se redujo inmediatamente antes de ser utilizada mediante incubación con DTT 1 mM (30 min, 4°C). El exceso de reductor se eliminó mediante gel filtración. La concentración de tioles se determinó utilizando DTNB obteniéndose típicamente 0.9 moles de tiol por mol de enzima.

Reacción de AhpE-SH, peróxido de hidrógeno y TNB. En una jeringa del accesorio de flujo detenido se colocaron concentraciones crecientes de AhpE reducida (0.5-2.5 μM) y TNB (70 μM) que se mezclaron con peróxido de hidrógeno (20 μM) presente en la segunda jeringa. Se registró la absorbancia a 412 nm y 25 °C.

Reacción entre AhpE-SH y DTNB. Se mezcló AhpE reducida (10 μM) con concentraciones crecientes de DTNB (100-500 μM) utilizando el accesorio de flujo detenido. Se registró la absorbancia a 412 nm y 25 °C y se determinó la velocidad inicial de formación de TNB.

4.4 Purificación de isoformas de la HSA por cromatoenfoco y análisis por espectrometría de masa

Preparación de soluciones de HSA de uso clínico para su análisis por cromatoenfoco. Se utilizó HSA en solución (20 %, Green Cross, Corea) la cual se deslipidó con carbón activado según se indicó antes. El tiol se redujo incubando con 2-mercaptoetanol 10 mM por 6 h a temperatura ambiente. El exceso de reductor se eliminó por gel filtración utilizando columnas PD-10 o Hi-Trap (GE Healthcare). La concentración de HSA y SH se determinó como ya se mencionó antes. Para bloquear el tiol se adicionó cloruro de mercurio 1.2 veces en exceso con respecto a la proteína. Para enriquecer la solución en las distintas formas oxidadas de la HSA (HSA-SOH/SX, HSA-SO₂H) se incubó HSA reducida (0.76 mM, 10 mg) con peróxido de hidrógeno (30 mM, 10 min, temperatura ambiente, pH 7.5). Luego se adicionó cloruro de mercurio para bloquear los tioles remanentes y se procedió a analizar la muestra por cromatografía. Por otro lado se utilizó HSA en solución (20 %) para uso clínico de tres laboratorios distintos (1, 2 y 3) las cuales se analizaron por cromatografía sin tratamiento previo.

Preparación de muestras de plasma. Previo consentimiento escrito, se extrajeron 5 mL de sangre a un voluntario sano utilizando un tubo conteniendo heparina. La muestra se centrifugó (10 min, 1000 g, temperatura ambiente) y se separó el plasma del resto de los componentes. El plasma se gel filtró en una columna PD-10 previamente equilibrada con NaCl 0.15 M con el objetivo de eliminar los componentes de bajo peso molecular, se alicuotó y almacenó a -20 °C por menos de una semana. La muestra se analizó sin mayor purificación. Por otro lado, la muestra de plasma se oxidó con peróxido de hidrógeno (15 mM, 10 min, temperatura ambiente) y la reacción se detuvo con catalasa. Además, la muestra de plasma sin tratar y la oxidada se incubaron con N-acetilcisteína (1 mM, 1 h, temperatura ambiente).

Cromatoenfoque con gradiente externo de pH. La cromatografía líquida se llevó a cabo utilizando un sistema de FPLC Akta Purifier equipado con una unidad de control UPC-900 (GE Healthcare). Se utilizó una columna comercial de intercambio aniónico débil de alta resolución (TSK DEAE 5PW glass 7.5 cm x 8 mm I.D., 10 µm) de Tosoh Biosciences LLC, (Japón). Los amortiguadores A y B consistieron en acetato de amonio 10 mM a los que se les ajustó el pH a 5.35 y 3.95 respectivamente, adicionando ácido acético glacial. Todas las soluciones se filtraron utilizando filtros de 0.22 o 0.45 µm. Las muestras se inyectaron manualmente y en el caso de las muestras de plasma la columna se lavó con amortiguador A para eliminar el material no unido. La elución se llevó a cabo con un gradiente de amortiguador B de 0 a 40 % en 60 min, a un flujo de 1 mL/min. Se registró el pH y la absorbancia a 280 nm a la salida de la columna. El electrodo de pH se calibró con los amortiguadores A y B recién preparados. Las fracciones eluidas se colectaron y almacenaron a -20 °C menos de un mes para su caracterización.

Análisis por espectroscopía de masa de HSA-SH, HSA-SOH/SX, HSA-SO₂H y HSA-S-Hg⁺. En las muestras eluidas del cromatoenfoque se analizó la proteína entera por espectrometría de masa. Se inyectaron 10 µL de cada muestra previamente diluida en ácido fórmico 1 %, (HSA-SH 570 µg, HSA-SO₂H 25.2 µg, HSA-S-Hg⁺ 11.3 µg) en una columna C3. La elución se realizó mezclando la solución A (agua/0.1 % ácido fórmico) con un gradiente de 3 a 100 % de solución B (acetonitrilo/0.1 % ácido fórmico) en 15 min a un flujo de 250 µL/min. Los espectros de masa “CID, Collision-induced dissociation” se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masa LTQ Orbitrap Velos equipado con una fuente de electrospray HESI II. Los parámetros de la fuente de ionización por electrospray fueron: “source temperature” 450 °C; “ion transfer capillary temperature” 270 °C; “Source voltage” 4.00

kV; “sheath gas flow” 30 %; “auxiliary gas flow” 10; “sweep gas flow” 15. Se obtuvieron los espectros de masa en modo positivo, en un rango de m/z 850-2000 utilizando el analizador de masas Orbitrap, en formato “Profile” y una resolución de 7500. Los datos crudos se procesaron utilizando Xcalibur software (versión 2.1, Thermo Fisher Scientific), y la deconvolución se llevó a cabo con el ProMass software (version 2.5 SR-1, Novatia, Monmouth Junction, NJ, USA) utilizando los parámetros por defecto del programa para el análisis de proteínas grandes y factor de substracción del “background” de 2.5.

Análisis de la reacción de NEM con HSA-SOH/SX y HSA-SH por espectrometría de masa. Se adicionó NEM (0.5 mM) a las fracciones HSA-SOH/SX y HSA-SH (0.025 mM) obtenidas a partir del cromatoenfoco y se incubó 1 h a 37 °C. Las muestras (5 µL) se inyectaron en una columna C8. La elución se realizó mezclando la solución A (agua/0.1 % ácido fórmico) con un gradiente de 3 a 100 % de solución B (acetonitrilo/0.1 % ácido fórmico) en 10 min a un flujo de 250 µL/min. El análisis por espectrometría de masa se llevó a cabo utilizando el espectrómetro LTQ Orbitrap Velos y los mismos parámetros que se describieron antes.

Análisis por espectrometría de masa de proteína tripsinizada. HSA-SX (1.25 µg/µL, 100 µg) y HSA-SH (5 µg/µL, 100 µg) fueron tratadas o no con 2-mercaptoetanol en exceso de 20 veces en bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8.2, 4 h, 4 °C. Las muestras fueron tratadas con N-etilmaleimida (NEM) (10 mM, 1 h, 37 °C) y luego digeridas con tripsina (4 µg, 37 °C, 16 h). La mezcla de péptidos (4 µg en 50 % solución A/50 % solución B) se inyectó en una columna C3 a un flujo de 220 µL/min. La elución se llevó a cabo con un gradiente de 3 a 60 % acetonitrilo/0.1 % ácido fórmico en 40 min. Los espectros de masa “CID, Collision-induced dissociation” se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masa LTQ Orbitrap Velos. Los parámetros de la fuente de ionización por electrospray fueron: “source temperature” 500 °C; “ion transfer capillary temperature” 390 °C; “Source voltage” 3.75 kV; “sheath gas flow” 50 %; “auxiliary gas flow” 20; “sweep gas flow” 5. Se obtuvieron los espectros de masa en modo positivo, en un rango de m/z 450-1000 utilizando el analizador de masas Orbitrap, en formato “Profile” y una resolución de 15000. El MS/MS se llevó a cabo con el analizador de masas Ion Trap en formato “Profile”. Los datos crudos se procesaron utilizando Xcalibur software (versión 2.1, Thermo Fisher Scientific) y se analizaron utilizando Thermo Proteome Discoverer 1.0.

Análisis por espectrometría de masa del curso temporal de la reacción entre peróxido de hidrógeno y HSA-SH. Se adicionó peróxido de hidrógeno (5 mM) a un vial que contenía HSA-SH (0.025 mM) en amortiguador Tris 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM y la mezcla se incubó a 37 °C. Cada 10 min se inyectaron alícuotas (10 µL) en una columna C3 conectada al espectrómetro de masa. La elución se llevó a cabo mezclando solución A con un gradiente de solución B de 3 a 100 % en 30 s a un flujo de 300 µL/min. Luego la columna se lavó con 100 % de solución B y se reequilibró a las condiciones iniciales. La reacción se siguió durante 2.5 h. Los espectros de masa “CID, Collision-induced dissociation” se obtuvieron utilizando el equipo LTQ Orbitrap Velos equipado con los parámetros recién descritos. Se obtuvieron los espectros de masa en modo positivo, en un rango de m/z 850-2000 utilizando el analizador de masas Orbitrap, en formato “Profile” y una resolución de 15000. Los datos crudos se procesaron utilizando Xcalibur software (versión 2.1, Thermo Fisher Scientific), y la deconvolución se llevó a cabo con el ProMass software (version 2.5 SR-1, Novatia, Monmouth Junction, NJ, USA) utilizando los parámetros por defecto del programa para el análisis de proteínas grandes y factor de substracción del “background” de 2.5.

4.5 Expresión, purificación y generación de mutantes de HSA recombinante

Obtención del ADN copia de la HSA. Para la obtención del ADN copia de la HSA se llevaron a cabo dos estrategias. En primer lugar, se intentó obtenerlo a partir de la cepa GS115/albumin de *Pichia pastoris* (Mut^s, Invitrogen). Esta cepa, disponible comercialmente y diseñada para la producción de proteínas recombinantes, presenta como control positivo de expresión de proteínas de secreción a la HSA. La secuencia incluye el péptido señal nativo de la HSA para su secreción al medio de cultivo. En primer lugar se realizó la extracción de ADN total de la levadura siguiendo el protocolo del kit (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen). La secuencia codificante se amplificó utilizando 0.85 µg de ADN genómico, la ADN polimerasa Dream Taq DNA Polymerase (0.25 µL, Fermentas) y los cebadores HSAEcoRI F y HSAXhoI R (1 µM, ver anexo). Estos cebadores hibridan en los extremos 5' y 3' del ADN copia de la HSA e introducen sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Se eligieron estas dos enzimas dado que, utilizando el programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor (v7.0.0) (165), se determinó que no cortan dentro de la secuencia de la HSA. Las condiciones para la amplificación fueron las

siguientes: desnaturalización inicial: 4 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 51 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Por otro lado, se realizó la extracción de ARN total de un cultivo de HepG2 (línea celular de hepatocarcinoma humano, cedido por el Institut Pasteur de Montevideo) utilizando el kit comercial RNeasy Mini (Quiagen) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la retrotranscripción se utilizó la enzima Superscript II reverse (Invitrogen), 2.5 µg de ARN total y 2 pmoles de un oligo específico de la HSA (HSA-R) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo con las ADN polimerasas Dream Taq (0.25 µL) y U taq (SBS GeneTech, 0.5 µL) en un volumen final de reacción de 50 µL. En ambos casos se utilizaron 5 µL del producto de la retrotranscripción y los cebadores utilizados para la amplificación (1 µM, HSAEcoRI F y HSAXhoI R). Las ADN polimerasas utilizadas adicionan una adenina al final de la secuencia amplificada lo que permitió el clonado en un vector pGEM-T Easy (Promega). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 4 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 51 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C.

En todos los casos, la presencia del fragmento amplificado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8 %) utilizando bromuro de etidio 0.5 µg/mL. Cuando fue necesario, el ADN amplificado se purificó del gel de agarosa utilizando el kit disponible comercialmente AxyPrep DNA Extraction Kit (Axygen Bioscience).

Clonado. El ADN amplificado se insertó en primer lugar en el vector pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este vector está diseñado para la rápida ligación de productos de PCR por lo que permite obtener un buen rendimiento del producto de ligación. Con este último se transformaron bacterias *Escherichia coli* XL-1 blue quimiocompetentes. Los transformantes se seleccionaron en medio LB mediante resistencia a ampicilina (100 µg/mL) conferida por el vector. La presencia del inserto se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % visualizando con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Para corroborar que se logró clonar la secuencia codificante de la HSA se secuenció el inserto utilizando cebadores que hibridan en los extremos y en el interior de la secuencia de la HSA (HSAEcoRI F, HSAXhoI R, SqF1, SqF2, SqF3, SqR1, SqR2 y SqR3, ver anexo). Las secuenciaciones se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo o en MacroGen Inc. (Corea del Sur). Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el programa BioEdit Alignment Editor (v7.0.0) (165).

Subclonado. Se digirió el vector pGEM-T (300 ng/μL) con las enzimas de restricción Xho I (1 μL, Fermentas) y Eco RI (1 μL, Promega) en un volumen final de 20 μL e incubando durante 4 h a 37 °C. El fragmento codificante se purificó desde el gel de agarosa (0.8 %). El vector pPICZA (Invitrogen) se digirió con las mismas enzimas y se ligó con el fragmento purificado. Luego se transformó la cepa quimiocompetente XL-1 blue de *E. coli* con el pPICZA-HSAwt y los transformantes se seleccionaron en LB-low salt (1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl, pH 7.0) utilizando el antibiótico Zeocina (25 μg/mL, Invitrogen). Nuevamente se llevó a cabo una secuenciación para confirmar que el gen se insertó correctamente en el vector.

Mutagénesis. Para llevar a cabo las mutagénesis sitio dirigidas se utilizó el kit disponible comercialmente QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Las mismas se realizaron sobre el vector pPICZA-HSAwt siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron las siguientes mutantes: Trp214Phe/Phe36Trp para estudios conformacionales y Tyr84Phe, His39Leu y Asp38Ala con el objetivo de estudiar el efecto de estos residuos en la reactividad y estabilidad de HSA-SOH. Los cebadores utilizados para la mutagénesis se describen en el anexo.

Transformación de *Pichia pastoris*. Se utilizó la cepa GS115, His⁻, Mut⁺ de *Pichia pastoris* (Invitrogen). Se linealizó el vector pPICZA-HSAwt con la enzima de restricción PmeI (Fermentas) y luego se transformó por electroporación (Gene Pulser XCell, Biorad) en el programa para *Pichia pastoris* y siguiendo las recomendaciones del kit (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen). Los transformantes se seleccionaron sembrando distintos volúmenes (10, 25, 50, 100 y 250 μL) en 5 placas con medio YPDS agar (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % dextrosa, 1 M sorbitol, 2 % agar) utilizando Zeocina (100 μg/mL) (el vector confiere resistencia a este antibiótico solo cuando ocurrió la recombinación con el genoma de la levadura) luego de incubar las placas durante 6 días a 30 °C. Todas las transformantes se volvieron a plaquear en medio YPDS agar con Zeocina (700 μg/mL) y se incubaron durante 48 h a 30 °C.

Expresión de HSA. Para el primer ensayo de expresión se seleccionaron aquellos transformantes con mayor nivel de resistencia a las altas concentraciones de Zeocina (700 μg/mL). Se inocularon 25 mL de medio BMGY (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, fosfato de potasio 10 mM, pH 6.0, 1.34 % base de nitrógeno de levadura, 4 x 10⁻⁵ % biotina, 1 % glicerol) con las colonias seleccionadas y se incubó con agitación a 28-30 °C hasta

alcanzar una Abs a 600 nm (Abs_{600}) de 2-6 (~16 h). Se centrifugó el cultivo y las levaduras se resuspendieron en 100 mL de medio BMMY (similar al anterior pero conteniendo 0.5 % metanol en lugar de glicerol). La inducción se llevó a cabo durante 96 h adicionando metanol (0.5 %) cada 24 h y tomando una alícuota del medio de cultivo con la misma frecuencia. Una vez culminado el tiempo de inducción se evaluó por SDS-PAGE la presencia de la proteína en los sobrenadantes.

En los ensayos de expresión posteriores, con el objetivo de evitar la lisis de las levaduras, se procedió a controlar mejor las condiciones del inóculo, cuidando que todos los matraces fueran inoculados con la misma cantidad de células y que estas procedieran de cultivos en fase exponencial. Por lo tanto, se partió de colonias aisladas en YPD agar (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % dextrosa, 2 % agar). Se inocularon 5 mL de YPD y se incubaron por 6-7 h a 30 °C en agitación. Posteriormente se inocularon 25 mL de medio BMGY a una Abs_{600} inicial de 0.031 y se incubó durante ~17 h alcanzando una Abs_{600} de 2-6. Luego se procedió igual que en el primer ensayo de expresión.

Purificación por precipitación con sulfato de amonio. Transcurridas 96 h de inducción se centrifugó dos veces el cultivo (3000 g, 5 min). El sobrenadante se llevó a 40 % de saturación de sulfato de amonio y se centrifugó a 9300 g, 30 min, 4 °C. El precipitado se resuspendió en el menor volumen de agua destilada posible. El sobrenadante se llevó a 60 % de saturación de sulfato de amonio a temperatura ambiente y luego se colocó en baño de hielo y se ajustó el pH a 4.4 para minimizar las cargas en la proteína. Se centrifugó a 12000 g y 4 °C durante 30 min (152). Nuevamente, el precipitado se resuspendió en el menor volumen de agua posible. Por último se realizó una electroforesis SDS-PAGE con las fracciones obtenidas. Previamente las muestras se pasaron dos veces por micro columnas de gel filtración (Sephadex G-25, GE Healthcare) equilibradas con agua para eliminar el sulfato de amonio.

Purificación por cromatografía de intercambio iónico. El precipitado obtenido luego de la precipitación con 60 % de saturación de sulfato de amonio se resuspendió en amortiguador Tris 20 mM, pH 7.2 y se aplicó en una columna Hi Prep DEAE (GE-Healthcare) previamente equilibrada con el mismo amortiguador. Se lavó con 200 mL de amortiguador a un flujo de 5 mL/min y luego se realizó un gradiente de 0 a 100 % de amortiguador Tris 20 mM, pH 7.2, 1 M NaCl en 40 min. El eluido se recogió en fracciones de 5 mL que se analizaron por SDS-PAGE.

Purificación por cromatografía de afinidad. El precipitado obtenido con 60 % de saturación de sulfato de amonio se resuspendió en agua destilada, se dializó por 48 h contra agua destilada y luego 24 h contra amortiguador fosfato 20 mM, pH 7. La muestra se aplicó en una columna de Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE-Healthcare), previamente equilibrada con el mismo amortiguador y se lavó durante 40 min a un flujo de 3 mL/min. La elución se llevó a cabo con un salto de 0 a 66 % de amortiguador fosfato 20 mM, pH 7, 3 M NaCl. El eluido se recogió en fracciones de 5 mL que se analizaron por SDS-PAGE.

4.6 Procesamiento y análisis de datos

Los datos se graficaron y analizaron utilizando OriginPro 6.1 y 8.0 (Microcal Software). Excepto que se especifique lo contrario, los resultados se expresan como el promedio $\pm$ la desviación estándar de experimentos independientes. El análisis de las estructuras cristalográficas publicadas se realizó con PyMol 0.99rc6 (www.pymol.org). Como apoyo para los análisis cinéticos se utilizó el programa Gepasi 3.30 que permite obtener los cursos temporales a partir de valores de constantes y concentraciones iniciales resolviendo numéricamente las ecuaciones diferenciales (166).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del ácido sulfénico formado en la albúmina sérica humana mediante la reacción con tionitrobenzoato

5.1.1 Reacción entre HSA-SOH y TNB

Para poder cuantificar el HSA-SOH y así poder estudiar su reactividad y estabilidad desarrollamos una técnica basada en su reacción con el tiol coloreado tionitrobenzoato (TNB). En esta reacción el ácido sulfénico reacciona como electrófilo lo cual es de relevancia debido al número limitado de grupos electrofílicos en proteínas. Además, los tioles no reaccionan entre sí, por lo tanto otros tioles reducidos no interfieren con la técnica. Este abordaje comenzó a desarrollarse en el marco de la tesina de grado (162) y continuó durante el posgrado.

Cuando se expuso HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μM) a TNB (70 μM) se observó una disminución en la absorbancia a 412 nm. Los gráficos de concentración de TNB versus tiempo fueron bifásicos con una primera fase relativamente rápida que duró ~15 min seguida de una fase más lenta que continuó aún luego de 2 h (Figura 5.1, panel A). El registro ajustó a una función doble exponencial (Ec. 5.1),

$$[\text{TNB}] = A_1 \exp(-k_{\text{obs1}}t) + A_2 \exp(-k_{\text{obs2}}t) + \text{offset} \quad (5.1)$$

donde A_1 y A_2 son las amplitudes y k_{obs1} y k_{obs2} las constantes de pseudoprimer orden de la primera y segunda fase respectivamente. Este tipo de comportamiento puede deberse tanto a dos reacciones paralelas como a dos reacciones consecutivas cuyas constantes sean significativamente diferentes (167). Cuando solo se ajustaron los primeros 15 min de la reacción a una ecuación exponencial más una recta (Ec. 5.2),

$$[\text{TNB}] = A_1 \exp(-k_{\text{obs1}}t) + Pt + \text{offset} \quad (5.2)$$

donde P es la pendiente del término lineal, se obtuvieron los mismos parámetros para la primera fase (amplitud y constante de pseudoprimer orden) que del ajuste de los cursos temporales de 2 h a una función doble exponencial (Figura 5.1, panel B).

Para estimar las constantes de segundo orden fue necesario contar con la concentración de TNB durante el curso de la reacción. Éste es el reactivo que se encontraba en exceso (condiciones de pseudoprimer orden) respecto al ácido sulfénico que se forma en un porcentaje de ~18 % respecto a la HSA, como se explica más adelante. Sin embargo, es también el reactivo cuyo consumo se registró. Por lo tanto, para contar con un valor de concentración de TNB adecuado para los cálculos, el mismo se determinó como:

Primera reacción: $[\text{TNB}]_{\text{inicial}} - (A_1/2)$

Segunda reacción: $[\text{TNB}]_{\text{inicial}} - A_1 - (A_2/2)$

A partir de estos valores y teniendo en cuenta que $k = k_{\text{obs}}/[\text{TNB}]$ se estimaron los valores de las constantes de segundo orden para la primera y segunda fase obteniéndose valores de $105 \pm 11 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n = 18$) y $4.3 \pm 0.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$), respectivamente.

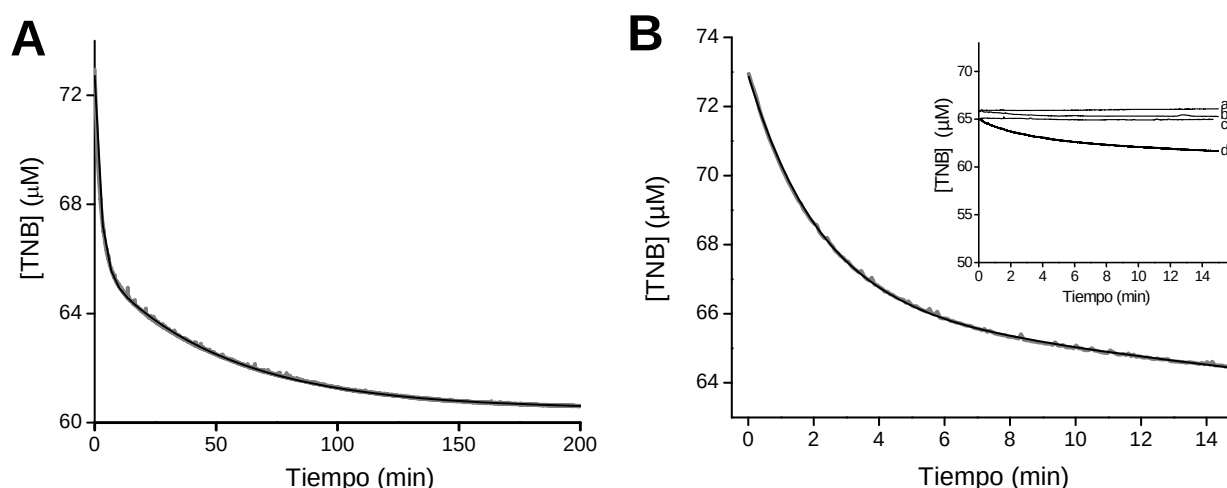
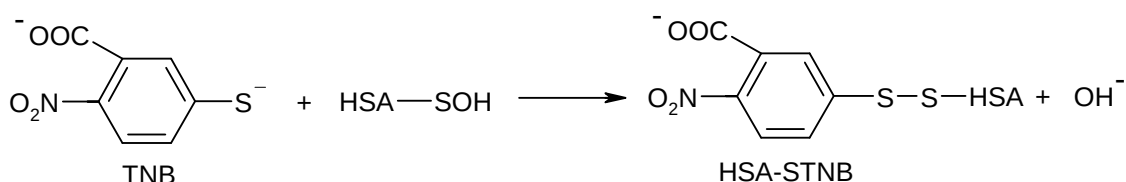


Figura 5.1. Reacción entre HSA oxidada y TNB. Se oxidó HSA (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno (4 mM, 37 °C, pH 7.4) y la reacción se detuvo con catalasa. Se tomó una alícuota (50 μM), se mezcló con TNB (73 μM) y se registró el descenso en la absorbancia a 412 nm, 25 °C, pH 7.4. (A) La reacción se registró durante 200 min y los datos ajustaron a la función doble exponencial (Ec. 5.1) $[\text{TNB}] = 7.0 \exp(-0.40t) + 5.3 \exp(-0.019t) + 60$ (línea negra). (B) Los primeros 15 minutos de la reacción ajustaron a la función exponencial más recta (Ec. 5.2) $[\text{TNB}] = 6.9 \exp(-0.45t) - 0.11t + 66.1$. *Inserto:* Se realizaron controles con TNB (65 μM) y HSA (50 μM): (a) reducida, (b) bloqueada con NEM, (c) bloqueada con NEM y oxidada (H_2O_2 4 mM, 4 min, 37 °C), (d) sobreoxidada (15 mM H_2O_2 , 4 min, 37 °C).

Como control, se siguió la reacción entre el TNB y albúmina reducida o albúmina con el tiol previamente bloqueado con NEM, expuesta o no a peróxido de hidrógeno (Figura 5.1, Inserto panel B). Dado que no se observó una disminución significativa de la absorbancia a 412 nm, es posible concluir que el TNB no reacciona con disulfuros internos u otros aminoácidos de la proteína, incluso aquellos potencialmente oxidables en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, es posible asignar la primer fase a la reacción entre HSA-SOH y TNB (Esquema 5.1).

Esquema 5.1. Reacción entre HSA-SOH y TNB



A partir de la amplitud de la primera fase, se obtuvo una relación HSA-SOH/HSA de 0.18 ± 0.02 ($n = 25$) lo que representó un 32 % en relación a los tioles oxidados dado que luego de la exposición a peróxido de hidrógeno (4 mM, 4 min, 37 °C) la cantidad de tioles por mol de HSA disminuyó de 0.66 ± 0.09 a 0.09 ± 0.02 . Cuando la HSA se expuso a mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno (15 mM, 4 min, 37 °C) la amplitud disminuyó obteniéndose una relación HSA-SOH/HSA de 0.05 (Figura 5.1, Inserto panel B). Esto sugiere que, en estas condiciones de oxidación, el tiol se encontraba parcialmente oxidado a estados de oxidación superiores tales como HSA-SO₂H y HSA-SO₃H, y que éstos no reaccionan con TNB.

Cuando la reacción se llevó a cabo con concentraciones crecientes de TNB se observó un incremento proporcional en la constante de pseudoprimer orden, pero no se observaron cambios en la amplitud (Figura 5.2, panel A). Estos resultados confirmaron que la reacción es de orden uno en TNB. A partir de la pendiente del gráfico k_{obs} versus TNB fue posible determinar la constante de segundo orden para la reacción obteniéndose un valor de $104 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4), lo cual coincide con el valor recién calculado ($105 \pm 11 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). La ordenada en el origen de ese mismo gráfico es prácticamente cero, lo cual dentro del error experimental, es indicativo de la irreversibilidad de la reacción en nuestras condiciones. Cuando se varió la concentración de HSA enriquecida en HSA-SOH se observó un aumento proporcional en la amplitud de la primera fase. Esto corrobora que la amplitud

presenta una relación estequiométrica con HSA-SOH. Además, a partir de la pendiente se confirmó que la cantidad de HSA-SOH formado por mol de HSA es de 0.18. El gráfico de k_{obs} versus la concentración de HSA enriquecida en HSA-SOH, reactivo en defecto, no mostró dependencia entre estos parámetros, lo cual era de esperar para una reacción de primer orden en HSA-SOH (Figura 5.2, panel B). Si en lugar de graficar la amplitud versus la concentración de HSA-SOH se grafica la velocidad inicial de consumo de TNB (cuando se formó menos del 10 % de producto) también se obtiene una relación lineal (Figura 5.2, panel C). Si la pendiente de este gráfico se divide entre la concentración de TNB y la constante de segundo orden se obtiene la relación HSA-SOH/HSA. De hecho, utilizando este abordaje se obtuvo una relación HSA-SOH/HSA de 0.18, lo cual coincide con la obtenida a partir de la amplitud.

Para confirmar la formación de disulfuros mixtos entre TNB y HSA-SOH en la primera fase de la reacción se realizaron experimentos de espectrometría de masa con la proteína entera. Cuando se analizaron muestras de HSA enriquecida en HSA-SOH e incubada con TNB durante 10 minutos, se observó un pico con un incremento de masa de $+(194 \pm 4)$ Da respecto a la masa de HSA-SH, correspondiente al ~46 % de la proteína (datos no mostrados). Este pico es consistente con la incorporación de un TNB (PM =198 g/mol). Cuando la muestra se trató con DTT, el pico revirtió parcialmente lo cual apoya la formación de un disulfuro. Sin embargo, este pico también se observó, aunque en un porcentaje menor (~25 % del total de proteína) cuando se trató HSA reducida con TNB. Esto sugiere que, aún en las condiciones analíticas ácidas, el TNB se une en forma inespecífica pero fuertemente a la HSA.

Por otro lado, se realizaron espectros UV-visible de HSA enriquecida en HSA-SOH e incubada con TNB por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo gel filtrando la mezcla dos veces para eliminar el exceso de TNB. Se adicionó SDS 1 % y se incubó 20 min a 37 °C para desnaturalizar y promover la salida del TNB pegado no covalentemente a la HSA. La muestra se ultrafiltró en presencia de SDS para eliminar componentes de bajo peso molecular y se concentró. Posteriormente se realizaron espectros UV-vis antes y después de adicionar DTT (10 mM). A partir de la absorbancia a 280 nm en ausencia de reductor se determinó la concentración de proteína y a partir de la diferencia en la absorbancia a 412 nm con y sin reductor se determinó la concentración de TNB liberado que se encontraba formando disulfuros. En este caso se obtuvo una relación $TNB_{liberado}/HSA$ de 0.21. Este valor coincide con lo observado a partir de los cursos

temporales de reacción con TNB de esta misma muestra (HSA-SOH/HSA = 0.19) y confirma que en la primera fase de la reacción se forman disulfuros mixtos entre HSA y TNB.

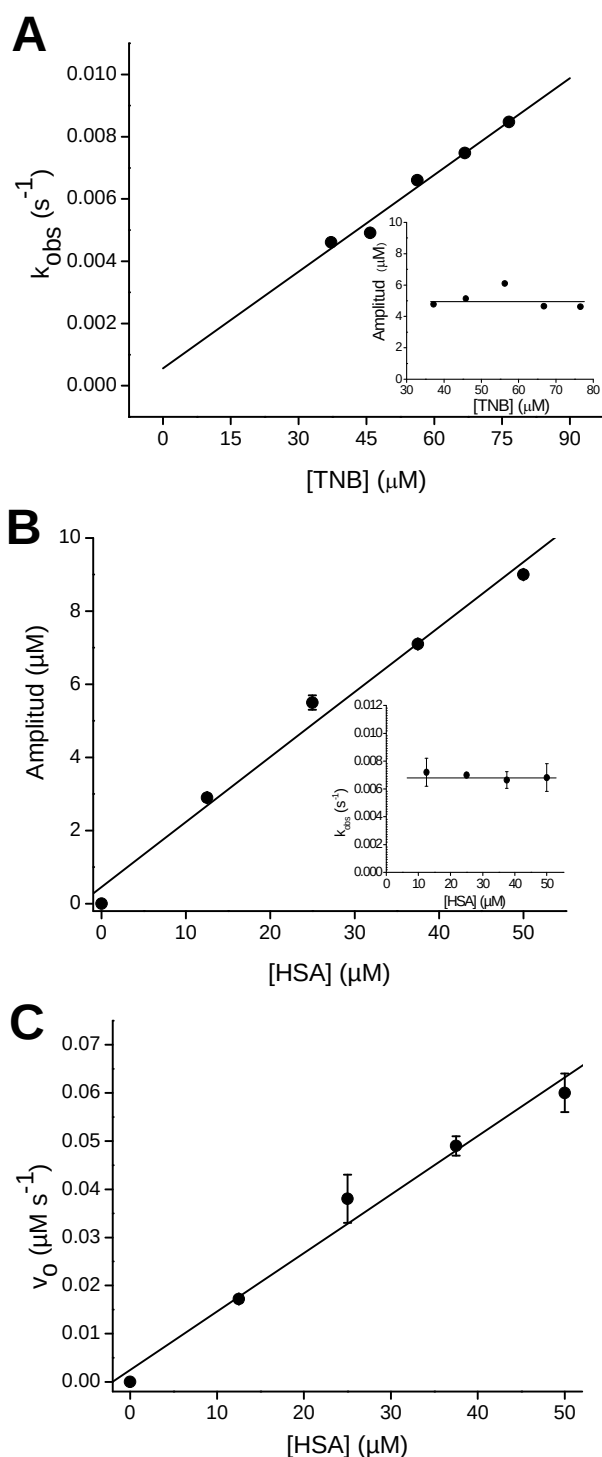


Figura 5.2. Dependencia de la reacción entre TNB y HSA-SOH con las concentraciones. (A) Se adicionaron alícuotas (35 μM) de HSA enriquecida en HSA-SOH (H_2O_2 4 mM, 4 min, 37 $^{\circ}C$) a concentraciones crecientes de TNB. Se registró la absorbancia a 412 nm por 15-30 min (412 nm, 25 $^{\circ}C$, pH 7.4). Para cada concentración de TNB se determinó la k_{obs} y la amplitud (*inserto*) de la primera fase a partir del ajuste de los datos a una función exponencial más una recta (Ec. 5.2). (B) Se adicionaron concentraciones crecientes de HSA enriquecida en HSA-SOH a TNB (70 μM). Se registró la absorbancia a 412 nm y se determinaron la k_{obs} (*inserto*) y la amplitud de la reacción. (C) Los primeros 30 s de reacción se ajustaron a una recta y se determinó la velocidad inicial.

5.1.2 Naturaleza de la segunda fase de la reacción entre HSA-SOH y TNB

Como se mencionó antes, la existencia de dos fases exponenciales sugiere la existencia de dos reacciones paralelas o dos reacciones consecutivas. Tomando esto en consideración, y sabiendo que la primera fase se debe a la reacción entre HSA-SOH y TNB, se plantearon varias hipótesis en relación a la naturaleza de la segunda fase. Aun así, independientemente de a qué se deba la segunda fase, del análisis de los cursos temporales y de los controles realizados (Figura 5.1) se valida que la primera fase se puede utilizar como herramienta para cuantificar HSA-SOH.

Primera hipótesis: la segunda fase se debe a la reacción de un segundo TNB con el disulfuro mixto para regenerar HSA-SH (Ec. 5.3).



Si el TNB fuera capaz de reducir el disulfuro mixto (HSA-STNB) y recuperar al tiol reducido (HSA-SH) es de esperar entonces que en presencia de TNB y peróxido de hidrógeno, la HSA sea capaz de tener una cierta actividad peroxidasa, catalítica. En primer lugar se determinó la constante de reacción entre peróxido de hidrógeno y TNB en ausencia de proteína obteniéndose un valor de $1.06 \pm 0.01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4). En presencia de concentraciones crecientes de HSA se observó un aumento en la constante observada de la reacción entre peróxido de hidrógeno y TNB (Figura 5.3, paneles A y B). Si este aumento se debiera a una actividad peroxidasa de la HSA entonces, en presencia de la proteína, se debería observar un mayor consumo de TNB al comienzo de la reacción y dicho consumo debería ser mayor que la concentración de HSA. Sin embargo, solo se observó un aumento en el consumo de TNB de 6 μM , es decir, la mitad de la concentración de tiol ($[\text{SH}] = 12 \mu\text{M}$) utilizado en el ensayo (Figura 5.3, panel C). Por lo tanto se puede concluir que, en nuestras condiciones experimentales, la HSA no presenta actividad peroxidasa con TNB como sustrato reductor.

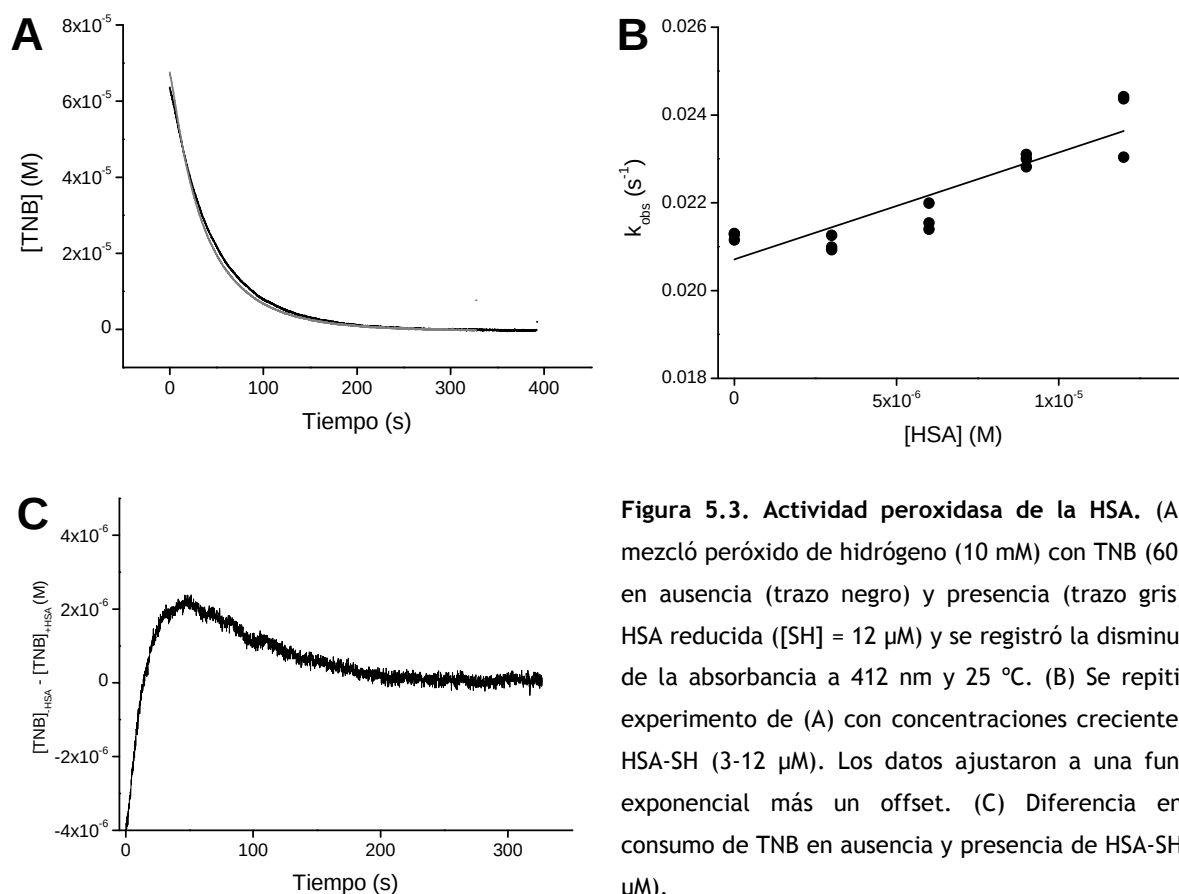


Figura 5.3. Actividad peroxidasa de la HSA. (A) Se mezcló peróxido de hidrógeno (10 mM) con TNB (60 μ M) en ausencia (trazo negro) y presencia (trazo gris) de HSA reducida ([SH] = 12 μ M) y se registró la disminución de la absorbancia a 412 nm y 25 °C. (B) Se repitió el experimento de (A) con concentraciones crecientes de HSA-SH (3-12 μ M). Los datos ajustaron a una función exponencial más un offset. (C) Diferencia en el consumo de TNB en ausencia y presencia de HSA-SH (12 μ M).

Por otro lado, si esta reacción ocurriera en nuestras condiciones experimentales, al final de la segunda fase se esperaría recuperar HSA-SH. Para corroborar esto, al igual que para el análisis de la primera fase, se realizaron espectros UV-vis en presencia y ausencia de reductor de muestras de HSA enriquecidas en HSA-SOH, incubadas con TNB durante 110 minutos, gel filtradas y tratadas con SDS (1 %, 20 min, 37 °C). En este caso se obtuvo una relación $\text{TNB}_{\text{liberado}}/\text{HSA}$ de 0.24, valor ligeramente superior al obtenido para la primera fase. Estos resultados muestran que la segunda fase no implica la reducción de la HSA, dado que si este fuera el caso se esperaría una disminución en la relación comparado a lo observado en la primera fase. Experimentos de espectrometría de masa tampoco mostraron recuperación de la forma reducida de la HSA. En suma, esta reacción no sería relevante en nuestras condiciones experimentales. La dificultad del TNB para reaccionar con HSA-STNB y regenerar HSA-SH se puede racionalizar teniendo en cuenta que el TNB es la base conjugada de un tiol relativamente ácido ($\text{pK}_a = 4.4$ (95)) y por lo tanto éste será el grupo que tenderá a salir de HSA-STNB y no el HSA-SH.

Por otro lado, se determinó la constante de segundo orden de la reacción reversa (Ec. 5.4) siguiendo la aparición de TNB a distintas concentraciones de DTNB. En este caso se obtuvo una constante de $14.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C , pH 7.4 y fuerza iónica 0.25 M.



Segunda hipótesis: la segunda fase se debe a que el TNB reacciona con disulfuros internos de la proteína.

Esta resulta la hipótesis menos probable dado que los controles de HSA reducida, bloqueada con NEM y bloqueada y oxidada ($4 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, 4 min, 37°C) no mostraron consumo de TNB en las condiciones ensayadas (TNB $70 \mu\text{M}$, 25°C , pH 7.4) (Figura 5.1, Inserto panel B). Sin embargo, cuando la reacción se llevó a cabo a mayores concentraciones de TNB ($210 \mu\text{M}$) se observó un mayor consumo de TNB una vez culminada la primera fase, acompañado de un aumento en la absorbancia a 280 nm , particularmente cuando la temperatura se elevó a 37°C . Probablemente, esto sí se deba a la reacción de TNB con disulfuros intramoleculares. Por esta razón, la reacción entre TNB y HSA-SOH siempre se llevó a cabo con concentraciones de TNB de $\sim 70 \mu\text{M}$ y a 25°C .

Tercera hipótesis: la segunda fase se debe a que el HSA-SOH decae en solución dando lugar a la formación de una nueva especie, HSA-SX, que también es capaz de reaccionar con TNB (Ec. 5.5).



Este punto se desarrollará en detalle a continuación.

5.1.3 Estabilidad de HSA-SOH en solución

Utilizando la técnica del TNB fue posible estudiar la estabilidad de HSA-SOH. En una primera instancia, se estudió el decaimiento espontáneo de HSA-SOH a 4°C determinándose la velocidad inicial de consumo de TNB, indicativa de la concentración de HSA-SOH, a tiempo 0, 10 min y luego de una hora de incubación. A esta temperatura el HSA-SOH fue estable dado que luego de 1 hora de incubación, se detectó más del 95 % de HSA-SOH inicial (datos no mostrados). Para determinar la estabilidad a 25 y 37°C se realizó el mismo experimento pero midiendo la concentración de HSA-SOH en intervalos de tiempo

menores. En ambos casos la descomposición de HSA-SOH ajustó a una exponencial simple más un offset (Figura 5.4, panel A: 25 °C, panel B: 37 °C). Del ajuste a dicha ecuación se obtuvo que el HSA-SOH decae espontáneamente en solución con constantes de $(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C y 37 °C, respectivamente. En ambos casos, aún después de 60 minutos de incubación de la muestra enriquecida en HSA-SOH, la mezcla mantenía aún cierta capacidad para consumir TNB (0.014 y $0.016 \mu\text{M s}^{-1}$ para las mezclas incubadas a 25 y 37 °C, respectivamente).

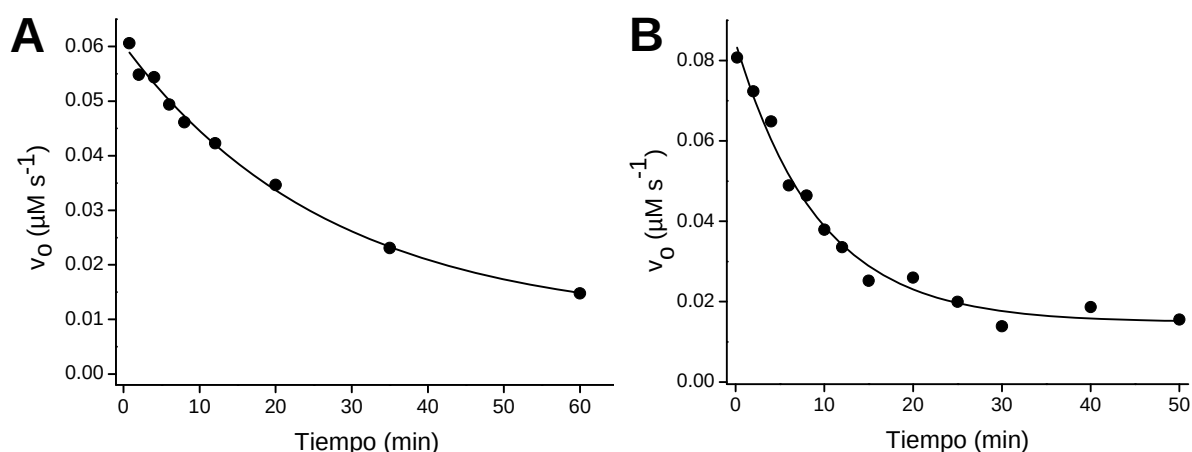


Figura 5.4. Estabilidad de HSA-SOH en solución. Se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH a (A) 25 o (B) 37 °C. A tiempos crecientes se tomaron alícuotas ($50 \mu\text{M}$) y se mezclaron con TNB ($70 \mu\text{M}$). La velocidad inicial del decaimiento en la concentración de TNB se determinó midiendo la absorbancia a 412 nm y 25 °C. La línea continua representa el mejor ajuste a la funciones exponenciales (A) $v_0 = 0.051 \exp(-0.037t) + 0.0269$ y (B) $v_0 = 0.070 \exp(-0.11t) + 0.0155$.

Cuando se estudió la estabilidad de HSA-SOH a distintos pHs realizando cursos temporales de decaimiento en distintos amortiguadores, se observó una máxima estabilidad a pH ~7 mientras que a pHs ácidos resultó considerablemente más inestable. A pHs alcalinos se observó un ligero aumento en la inestabilidad (Figura 5.5). Este tipo de perfil también se observó cuando se estudió la dependencia de la reacción de HSA-SOH con TNB (Figura 5.6) (95). Ambos resultados son compatibles con un pK_a para el HSA-SOH menor a 4.5, siendo la forma protonada (HSA-SOH) la especie reactiva. Este resultado va en la línea de que los oxiácidos serían más ácidos que los correspondientes tioles (28). Sin embargo, en el caso de la AhpE el pK_a del tiol es de 5.2 y el del derivado sulfénico es de 6.6 (168). Por otro lado, es sabido que la HSA sufre isomerizaciones cuando cambia el pH. Este cambio conformacional podría determinar que el HSA-SOH estuviera más expuesto o en una conformación más favorable para que ocurra la reacción. El ligero aumento a pH

alcalino puede explicarse de la misma forma.

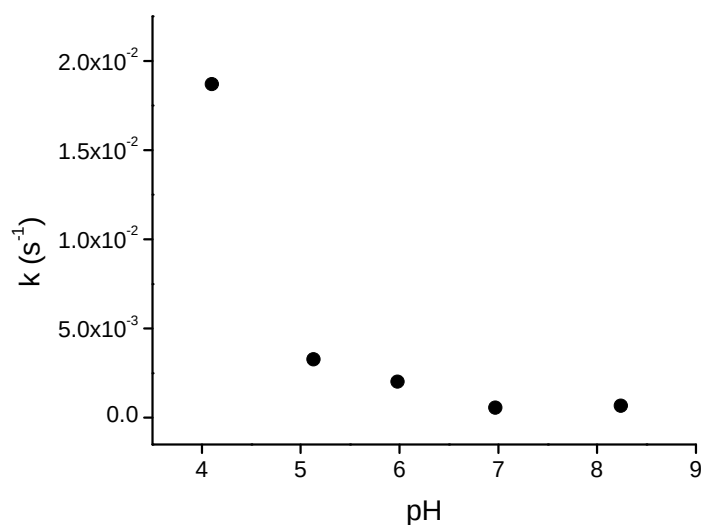


Figura 5.5. Dependencia del decaimiento espontáneo de HSA-SOH con el pH. En una jeringa del accesorio de flujo detenido se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH (100 μM) en amortiguadores de fuerza iónica constante (ácido acético 20 mM/MES 20 mM/Tris 40 mM) y pH variable a 25 °C. A tiempos crecientes se mezcló con el contenido de la otra jeringa (TNB 140 μM en amortiguador Tris 1 M, pH 7.4) y se registró la caída en la absorbancia a 412 nm y 25 °C durante 1 min. La velocidad inicial de la reacción con TNB se graficó en función del tiempo y se ajustó a una función exponencial, determinándose la constante de estabilidad (k) a cada pH.

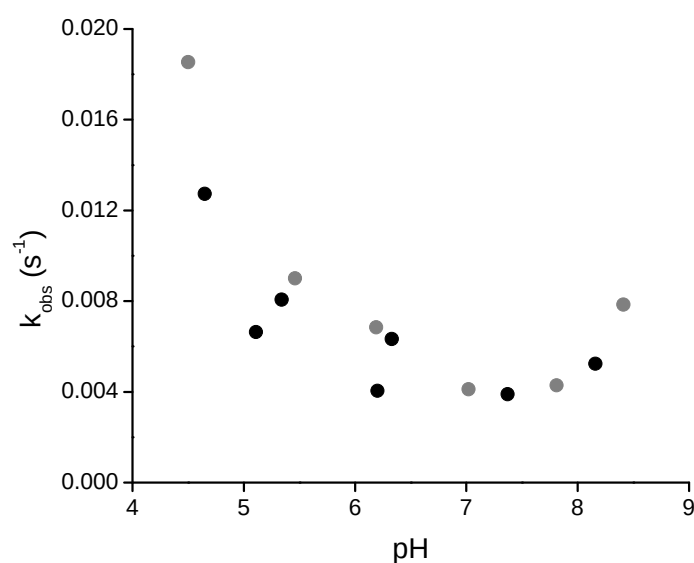


Figura 5.6. Constante de velocidad observada en función del pH para la reacción entre HSA-SOH y TNB. Se mezclaron alícuotas de HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μM) con TNB (70 μM), en el sistema amortiguador de tres componentes de fuerza iónica constante a diferentes pHs y utilizando el accesorio de flujo detenido. Se registró la disminución en la absorbancia a 412 nm y 25 °C. La constante de velocidad observada (k_{obs}) se obtuvo a partir del ajuste a una función exponencial más una línea recta. Los símbolos distintos corresponden a dos experimentos independientes. Tomada de (95).

La naturaleza de la especie a la cual decae el HSA-SOH no resulta obvia, y nos llevó a plantearnos varias hipótesis:

a. *Reacción de HSA-SOH con HSA-SH u otro HSA-SOH dando lugar a la formación de dímeros covalentes (HSA-SS-HSA y HSA-S(O)S-HSA).* Para evaluar esto se realizaron geles SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 5.7) pero no se observaron dímeros, por lo que se descartó esta hipótesis. Esto se puede racionalizar considerando que el tiol se encuentra en una hendidura por lo que estas reacciones podrían estar impedidas estéricamente.

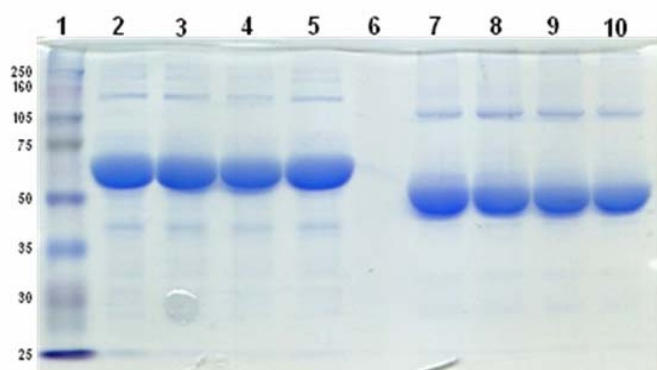


Figura 5.7. Análisis de dímeros por SDS-PAGE. Se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH durante 0 (carriles 3 y 8), 30 (carriles 4 y 9) y 60 min (carriles 5 y 10) a 37 °C y las muestras se analizaron por SDS-PAGE 10 % en presencia (carriles 3-5) y ausencia (carriles 8-10) de 2-mercaptoetanol. Se incluyó un control con HSA reducida (carriles 2 y 7) y un marcador de peso molecular (carril 1).

b. *Reacción con contaminantes presentes en la solución.* Dado que la reacción entre peróxido de hidrógeno y HSA-SH se detiene mediante el agregado de catalasa, una segunda hipótesis fue que contaminantes presentes en la preparación enzimática reaccionen con HSA-SOH. Sin embargo, cuando la mezcla de reacción fue gel filtrada en lugar de ser tratada con catalasa, se obtuvo el mismo resultado ($k = 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 37 °C, pH 7.4). Por otro lado, dado que la HSA es reducida con 2-mercaptoetanol previo a la oxidación, otra posibilidad es que trazas de 2-mercaptoetanol que no logren ser eliminadas con la gel filtración sean las responsables de la descomposición de HSA-SOH por reacción con este último formando disulfuros mixtos. Para evaluar esta hipótesis, por un lado se redujo la HSA con DTT en lugar de 2-mercaptoetanol y por otro lado, HSA previamente reducida fue sometida al tratamiento de deslipidación con el objetivo de eliminar posibles trazas del reductor. En ambos casos, las constantes de decaimiento espontáneo obtenidas fueron muy similares, lo que también nos permitió descartar esta hipótesis.

c. *Cambio conformacional.* Una vez formado el HSA-SOH, podría ocurrir un cambio conformacional que determine que el TNB se encuentre parcialmente impedido de

reaccionar con él. Para verificar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos donde se mezcló HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μM) con TNB (70 μM) en presencia de un agente desnaturizante como el SDS (1 %). En estas condiciones se observó un incremento de ~55 veces en las constantes de la primera y segunda fase, sin embargo no se observó ningún cambio en la suma de las dos amplitudes.

d. Reacción con una amina o amida dando una sulfenamida (HSA-SNHR). Ya ha sido reportado que el ácido sulfénico puede reaccionar con una amina dando lugar a una sulfenamida (23) por lo que, en primer lugar, se evaluó si el HSA-SOH podría reaccionar con aminoácidos circulantes. Sin embargo, cuando se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH con concentraciones milimolares de alanina, lisina, histidina y arginina no se observó un aumento en la velocidad del decaimiento espontáneo de HSA-SOH. En plasma, los aminoácidos libres alanina, histidina, lisina y arginina se encuentran a una concentración de 316, 87, 195 y 86 μM (169), lo que permite descartar una posible reacción *in vivo* entre estos aminoácidos y HSA-SOH. También se ha visto que la reacción puede ocurrir con el nitrógeno del enlace amida contiguo a la cisteína donde se forma el ácido sulfénico de tal manera que se forma una sulfenamida cíclica (24, 25). En el caso de la HSA esto no es posible dado que el residuo contiguo es una prolina. Sin embargo, sí sería posible una reacción de HSA-SOH con otros grupos amina, amida o imidazol de la misma HSA. La formación de una sulfenamida intermolecular con un residuo de otra molécula de HSA quedó descartado por la ausencia de dímeros (Figura 5.7). En caso de que la sulfenamida se forme intramolecularmente, se esperaría un cambio en la masa de -2 Da. Si la sulfenamida se oxidara a sulfinamida o sulfonamida se esperaría un cambio en la masa de +14 y +30 Da, respectivamente. En un primer intento para detectar alguna de estas especies se realizó un análisis de espectrometría de masa de la proteína tripsinizada. Sin embargo, no se observó ninguno de estos cambios de masa en el péptido de la Cys34 (21-41) lo cual sugiere que no se forma una sulfenamida con residuos presentes en el mismo fragmento triptico. Más adelante se retomará este punto (sección 5.5).

5.1.4 Relación entre la segunda fase de la reacción de HSA-SOH con TNB y la inestabilidad de HSA-SOH

Como se esbozó en el punto anterior, la segunda fase de la reacción entre TNB y HSA enriquecida en HSA-SOH podría deberse a la especie a la cual decae el HSA-SOH, es

decir, HSA-SX. Esto implicaría las siguientes reacciones (Ec. 5.6-5.8):



Para estudiar esta hipótesis se preparó HSA enriquecida en HSA-SOH y se dejó decaer a HSA-SX incubando 40 min a 37 °C. Luego se tomó una alícuota (HSA 50 μM) se mezcló con TNB (70 μM) y se registró la absorbancia a 412 nm durante 2 h (Figura 5.8). El registro ajustó a una función doble exponencial con una primera fase rápida de amplitud pequeña y una segunda fase más lenta y de mayor amplitud. Probablemente, la primera fase se deba a la reacción de HSA-SOH remanente con TNB, mientras que la segunda fase se deba a la reacción de HSA-SX con TNB. De hecho, la constante de reacción ($4.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es muy similar a la constante antes observada para la segunda fase (Figura 5.1, panel A, $4.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Si se suman las dos amplitudes se observa un consumo de TNB total de 14.7 μM y si se suman las dos amplitudes del registro de la Figura 5.1, panel A se obtiene un consumo total de 12.3 μM . El hecho de que ambas amplitudes sean similares apoya la hipótesis de que la segunda fase se deba a la reacción entre HSA-SX y TNB. Por lo tanto, es muy probable que la segunda fase de la reacción entre HSA-SOH y TNB se deba a la reacción entre HSA-SX y TNB, aunque no puede descartarse que existan otros procesos minoritarios en simultáneo.

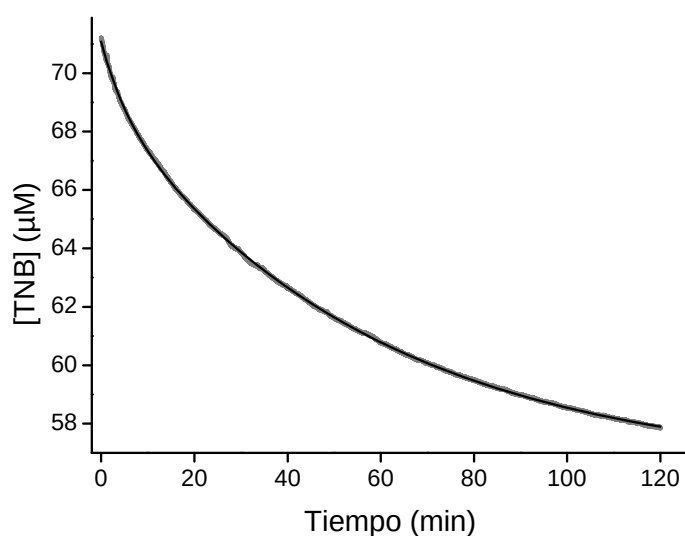


Figura 5.8. Reacción entre TNB y HSA-SX. Se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH a 37 °C durante 40 min y se tomó una alícuota (50 μM) que se mezcló con TNB (70 μM). Se registró la absorbancia a 412 nm y 25 °C durante 2 h. La línea negra representa el mejor ajuste a la función biexponencial: $[\text{TNB}] = 2.0 \exp(-0.19t) + 12.7 \exp(-0.018t) + 56$.

5.1.5 Reacción de HSA-SH y HSA-SOH con peróxido de hidrógeno

Ya hemos mostrado que el HSA-SH reacciona con peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación de HSA-SOH (Ec 5.9):



A su vez, el HSA-SOH puede reaccionar con un segundo peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación de un ácido sulfínico (HSA-SO₂H) (Ec 5.10):



Para estudiar la cinética de estos procesos, se siguió la velocidad inicial de consumo de TNB, la cual es proporcional a la concentración de HSA-SOH. En la Figura 5.9 se observa que, cuando se mezcló HSA reducida con peróxido de hidrógeno, al comienzo la velocidad de consumo de TNB se incrementó con el tiempo debido a la formación de HSA-SOH y luego disminuyó debido a la sobreoxidación y al decaimiento espontáneo de HSA-SOH. El gráfico obtenido ajustó a una función biexponencial con amplitudes de signo opuesto. Esto concuerda con un mecanismo de dos reacciones consecutivas con el HSA-SOH como intermediario (167). A partir del ajuste, y luego de corregir por el decaimiento espontáneo, fue posible determinar las constantes de reacción para ambos procesos.

La constante de segundo orden para la formación de HSA-SOH fue de $2.7 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$, 37°C , $\text{pH } 7.4$). Si se promedian todos los valores obtenidos hasta ahora por nuestro grupo utilizando diferentes métodos como decaimiento de tioles o consumo de peróxido de hidrógeno, se obtiene una constante de $2.3 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37°C , $\text{pH } 7.4$) para la reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno (42, 93, 95).

Por otro lado, la constante de segundo orden para la reacción de HSA-SOH con peróxido de hidrógeno fue de $0.4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$, 37°C , $\text{pH } 7.4$). Para confirmar estas constantes se intentó trabajar a mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno pero no fue posible debido a la aparición de burbujas de oxígeno debido a la reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno.

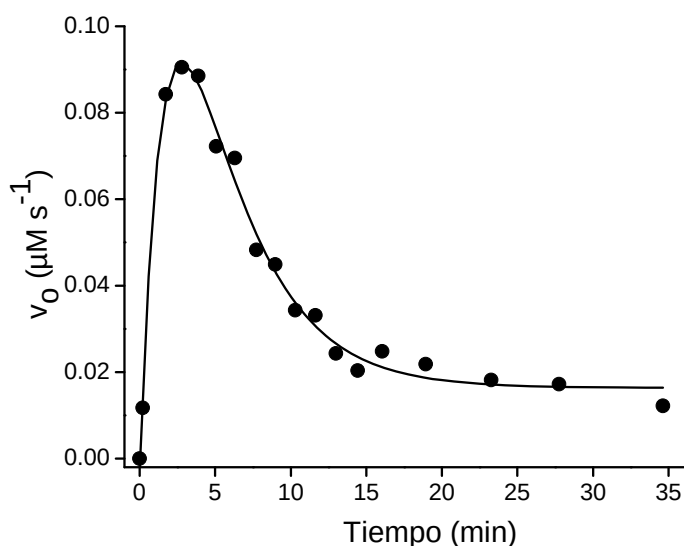


Figura 5.9. Reacción de HSA-SH y HSA-SOH con peróxido de hidrógeno. Se incubó HSA (0.5 mM, 0.77 SH/HSA) con peróxido de hidrógeno (4 mM, 37 °C). A tiempos crecientes se tomaron alícuotas (50 μM) y se mezclaron con TNB (70 μM) y catalasa y se determinó la velocidad inicial de disminución de la absorbancia (412 nm, 25 °C). La línea continua representa el mejor ajuste a la función biexponencial: $v_0 = -0.30 \exp(-0.56t) + 0.28 \exp(-0.25t) + 0.016$.

Para confirmar que en las condiciones ensayadas se forma HSA-SO₂H se realizó un análisis por espectrometría de masa de la muestra tripsinizada. En los fragmentos tripticos de HSA expuesta a peróxido de hidrógeno 4 mM por 30 min se detectó por ESI-MS un péptido con la masa esperada para el péptido que contiene a la Cys34 (21–41, ALVLIAFAQYLQQC₃₄PFEDHVK, 2432.2) +32 Da como la especie doblemente cargada $[M + 2H]^{2+}$ con un m/z de 1233.2 (Figura 5.10, panel A). El péptido también se detectó, aunque con menor intensidad, en la muestra control y en la muestra oxidada durante 4 min, lo cual era de esperar dado que las soluciones de HSA comerciales siempre presentan una fracción sobreoxidada. Cuando se realizó el MS/MS del péptido doblemente cargado se identificaron varios iones hijos b e y que confirmaron la identidad del fragmento. Particularmente, el ion b_{14} (1594.4) mostró claramente que el incremento de masa de 32 Da está asociado a la oxidación de la Cys34 a ácido sulfínico. El ion hijo de mayor intensidad resultó ser el y_7 lo cual, junto con el b_{14} , sugiere que el péptido se fragmentó predominantemente en el enlace Cys34(SO₂H)-Pro. Además, se observó un ion con la masa correspondiente a $b_{14} - 65$ Da consistente con la pérdida de la porción SO₂H (Figura 5.10, panel B). El análisis de las mismas muestras por MALDI-TOF-MS también mostró la presencia del péptido oxidado, pero únicamente luego de 30 min de exposición a peróxido de hidrógeno. El análisis MS/MS de este péptido permitió detectar únicamente los iones hijos b_{14} e y_7 , lo que confirma los resultados obtenidos por ESI-MS (datos no mostrados).

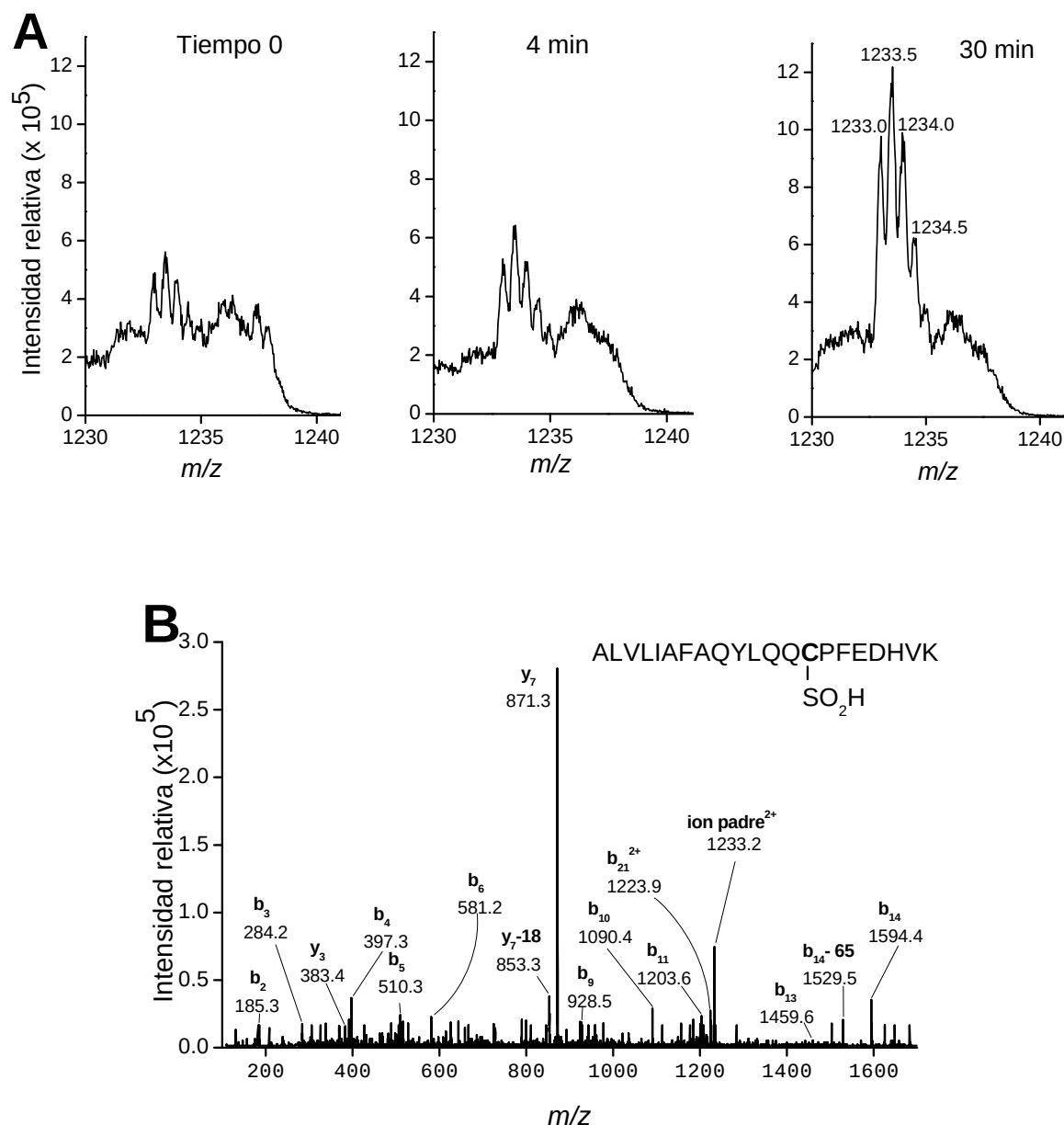


Figura 5.10. Análisis por espectrometría de masa de HSA-SO₂H. (A) Se incubó HSA con peróxido de hidrógeno igual que en la figura anterior. A los 0, 4 y 30 min de incubación se tomaron alícuotas que se digirieron con tripsina y se analizaron por ESI-MS. Se detectó como una especie doblemente cargada (m/z 1233.2) el péptido de la Cys34 (m/z 2432.2) con un incremento de masa de +32 Da. (B) MS/MS del péptido doblemente cargado mostrando los fragmentos *b* e *y*.

5.1.6 Reactividad con dimedona y arsenito

La dimedona y el arsenito son reactivos habitualmente utilizados para la detección de ácido sulfénico en proteínas. La reacción con TNB permitió medir la constante de reacción de segundo orden para la reacción con ambos reactivos obteniéndose valores de 0.027 ± 0.009 y $0.036 \pm 0.009 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37 °C y pH 7.4 para dimedona y arsenito respectivamente (Tabla 5.2). En ambos casos se controló que no hubiera reacción con TNB o DTNB. Dado que la dimedona se encuentra en etanol, fue necesario realizar un control de inestabilidad en presencia de la máxima concentración de etanol utilizada no observándose ningún efecto del solvente. En el caso del arsenito fue necesario controlar el pH del experimento para evitar la alcalinización de la mezcla de reacción. Por su parte, el arsenito reduce el HSA-SOH nuevamente a HSA-SH. Cuando se incubó HSA enriquecida en HSA-SOH con arsenito 0.167 M (10 min, 37 °C) se observó un aumento en SH/HSA de 0.051. Esto representa una recuperación de 28 % en relación a la cantidad inicial de HSA-SOH/HSA (0.18 ± 0.02). El hecho de que no se recupere un mayor porcentaje puede en parte explicarse debido al decaimiento espontáneo de HSA-SOH que compite con la reacción con arsenito. Estos resultados confirman que ambos reactivos pueden ser utilizados como sondas de ácido sulfénico.

5.1.7 Reactividad con ácido úrico y ascorbato

Los ácidos úrico y ascórbico son importantes antioxidantes biológicos. Concentraciones milimolares de estos reductores plasmáticos no fueron capaces de incrementar la velocidad de decaimiento de HSA-SOH a 37 °C y pH 7.4. Además, ninguno de los dos fue capaz de reducir el HSA-SOH de vuelta a HSA-SH. En ambos casos se controló el pH y no se observó reacción entre estos reductores y TNB o DTNB. En plasma, el ácido úrico se encuentra a una concentración de 160-450 μM y el ácido ascórbico a una concentración de 30-150 μM (121). Por lo tanto es posible concluir que, *in vivo*, estos reductores no reaccionarían significativamente con HSA-SOH. Si bien esto es lo que se observa para la HSA, existen reportes del que el ácido ascórbico es capaz de reducir al ácido sulfénico, como ocurre en el caso de una 1-Cys peroxirredoxina de *Saccharomyces cerevisiae* (170).

5.1.8 Reacción con tioles de bajo peso molecular

En primer lugar se evaluó la reactividad de HSA-SOH con los tioles de bajo peso molecular presentes en plasma (cisteína, cisteinilglicina, homocisteína y glutatión) mediante una reacción de competencia con TNB (Figura 5.11). A pesar que lo que se registró fue el consumo de TNB, la constante de reacción observada de la primera fase fue la suma de las constantes de pseudoprimer orden de la reacción de HSA-SOH con TNB y con los tioles. Por lo tanto, la constante observada se incrementó al aumentar la concentración del tiol (Figura 5.12). A partir de la pendiente fue posible determinar la constante de segundo orden para la reacción entre HSA-SOH y el tiol. En el caso de la cisteína se obtuvo un valor de $21.6 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) (Tabla 5.2). Por otro lado, la amplitud disminuyó hiperbólicamente con la concentración de tiol, lo cual es de esperar para un mecanismo de competencia (167). En el caso de la cisteína, el ajuste a una función hiperbólica arrojó un valor para la constante de segundo orden de $22 \pm 6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, el cual coincide con el obtenido a partir de la constante observada. Para el resto de los tioles se observaron perfiles similares obteniéndose constantes de segundo orden de 55 ± 3 , 9.3 ± 0.9 y $2.9 \pm 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) para cisteinilglicina, homocisteína y glutatión, respectivamente (Tabla 5.2). Llamativamente, en el caso de la homocisteína, la segunda fase de la reacción presentó una pendiente positiva. Probablemente esto se deba a la tendencia de este tiol a desplazar al TNB, más ácido, del disulfuro mixto (HSA-STNB). Los controles no mostraron reacción entre TNB y los cuatro tioles evaluados.

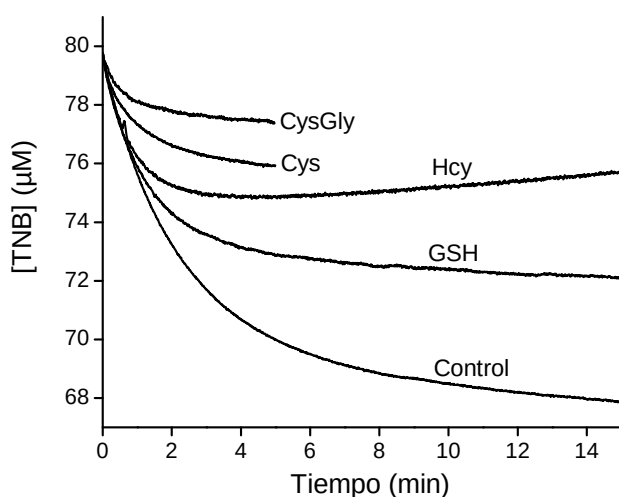


Figura 5.11. Reacción de tioles biológicamente relevantes con HSA-SOH por ensayo de competencia con TNB. Se tomaron alícuotas de HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μM) y se mezclaron con TNB (70 μM) en ausencia y presencia de cisteína (1 mM), cisteinilglicina (0.42 mM), homocisteína (1 mM) y glutatión (1 mM), utilizando un accesorio de flujo detenido. Se registró la disminución en la absorbancia a 412 nm y 25 °C durante 5-15 min.

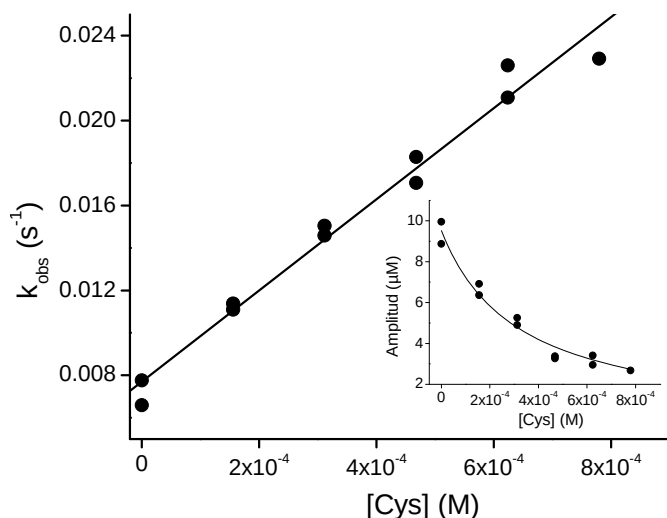


Figura 5.12. Reacción de HSA-SOH con cisteína. Se tomaron alícuotas de HSA enriquecida en HSA-SOH (50 μM) y se mezclaron con TNB (70 μM) en presencia de concentraciones crecientes de cisteína utilizando un accesorio de flujo detenido. Se registró la caída en la absorbancia a 412 nm y 25 °C durante 5-15 min. Los datos ajustaron a una ecuación exponencial más recta y se determinó la constante observada (k_{obs}) y la amplitud (*inserto*) para cada concentración de cisteína.

Como se vio antes, un HSA-SOH formado *in vivo* no será capaz de reaccionar con urato ni ascorbato y tampoco lo hará con aminas libres. Por lo tanto, uno de sus posibles destinos es la reacción con los tioles de bajo peso molecular presentes en plasma. En plasma, las concentraciones de estos tioles reducidos son 8.4, 2.9, 0.2 y 4.7 μM para cisteína, cisteinilglicina, homocisteína y glutatión respectivamente (80, 81). Los productos de las constantes de segundo orden y las concentraciones plasmáticas de estos tioles en forma reducida son 181×10^{-6} , 160×10^{-6} , 2×10^{-6} y $14 \times 10^{-6} s^{-1}$. Coincidentemente, a nivel de la HSA circulante los disulfuros mixtos se forman mayoritariamente con cisteína (146 μM) y cisteinilglicina (19.7 μM) y en menor grado con homocisteína (7.4 μM) y glutatión (0.7 μM) (80, 81). Esto va en la línea de que el HSA-SOH podría ser un intermediario en la formación de disulfuros mixtos en plasma. Por otro lado, los intercambios tiol disulfuro también contribuyen a la formación de disulfuros mixtos lo cual queda en evidencia al observar la alta concentración de disulfuros mixtos con homocisteína presentes en plasma. Esto refleja la tendencia de la homocisteína de formar disulfuros debido a su alto pK_a (171-173).

Si se consideran los pK_a macroscópicos para cisteína ($pK_a = 8.3$), cisteinilglicina ($pK_a = 6.9$), homocisteína ($pK_a = 10$) y glutatión ($pK_a = 8.6$) (171) es posible concluir que la reactividad aparente a pH 7.4 es mayor cuanto menor es el pK_a reflejando la disponibilidad de tiolato, la especie reaccionante. El glutatión desvía de esta tendencia, probablemente debido a restricciones estéricas y a su carga negativa adicional a pH 7.4.

Para verificar esto último, se determinaron las constantes de reacción de otros tioles de bajo peso molecular de diferente carga neta a pH 7.4 (Figura 5.13).

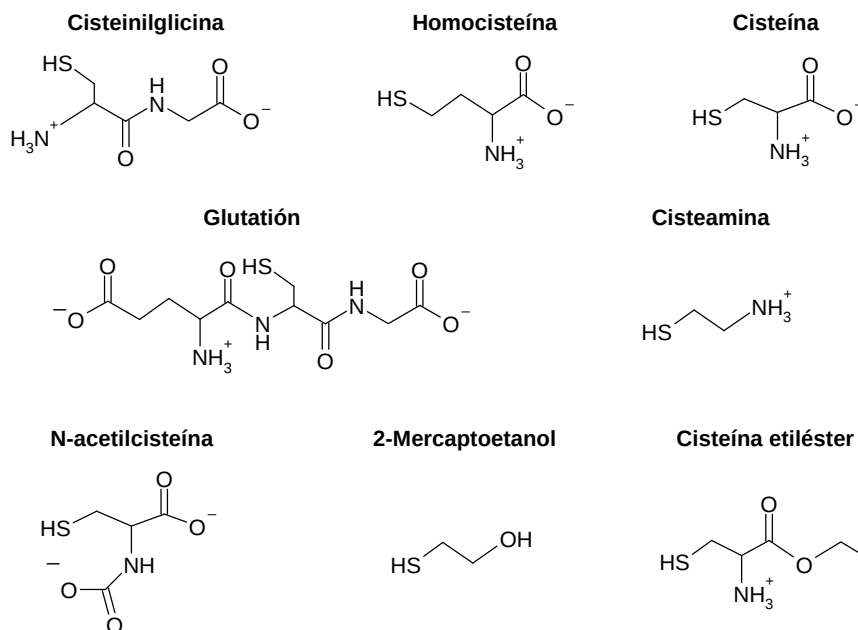


Figura 5.13. Estructuras de tioles de bajo peso molecular a pH 7.4 con el tiol en su forma protonada.

Las constantes de segundo orden obtenidas fueron $234 \pm 21 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para cisteamina ($\text{pK}_a = 8.2$ (171)), $7 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para 2-mercaptoetanol ($\text{pK}_a = 9.4$ (171)), $0.9 \pm 0.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para N-acetilcisteína ($\text{pK}_a = 9.6$ (171)) y 130 ± 16 para cisteína etiléster ($\text{pK}_a = 6.5$ (171)) a 25°C y pH 7.4. De estos resultados se desprende que aquellos tioles con carga neta negativa a pH 7.4 (glutatión, N-acetilcisteína) reaccionan más lento que aquellos con carga neutra (cisteína, homocisteína, cisteinilglicina, 2-mercaptoetanol), confirmando lo visto para el glutatión. Por el contrario, aquellos con carga positiva (cisteamina, cisteína etiléster) reaccionan más rápido que los que presentan carga neutra. En primer lugar, esto puede explicarse si se tiene en cuenta que a pH neutro la HSA presenta 19 cargas negativas. Además, si se observa la superficie electrostática de la región cercana al tiol (Figura 5.14), se puede ver que el mismo se encuentra en un ambiente electronegativo.

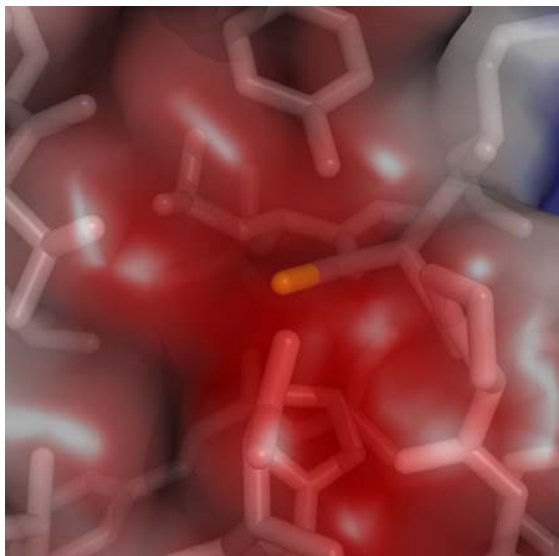


Figura 5.14. Superficie electrostática del ambiente de la Cys34. El átomo de azufre se muestra en amarillo, las regiones positivas se muestran en azul y las negativas en rojo. Para el cálculo se utilizó el PDB 1A06 (60) y PyMol v0.99 (www.pymol.org).

El hecho de que la reactividad aparente a pH 7.4 sea mayor con tioles de menor pK_a sugiere que la especie reactiva con el HSA-SOH es el tiolato. Por otro lado, como la reacción es de orden uno en HSA-SOH y en tiol, por analogía con las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, se sugiere un mecanismo de desplazamiento directo SN_2 lo que implica un ataque nucleofílico del tiolato sobre el HSA-SOH. Si esto es así es de esperar que la reactividad del tiolato, o sea, la constante independiente del pH (correspondiente a 100 % del tiol en forma de tiolato) aumente con el pK_a del tiol, pues la nucleofilia correlaciona con la basicidad (38). Tomando en cuenta todas las constantes determinadas hasta el momento y los valores de pK_a de cada tiol es posible determinar la constante independiente del pH (Tabla 5.1) y construir así un gráfico de Brønsted (Figura 5.15):

$$\log k_{RS^-} = \beta_{Nuc} pK_a^{RSH} + C$$

donde k_{RS^-} es la constante independiente del pH, β_{Nuc} es la constante de nucleofilicidad, pK_a^{RSH} es el $-\log$ de la constante de ionización del tiol. Estas relaciones de Brønsted son usuales en reacciones que involucran al tiolato como nucleófilo y en general se obtienen valores de β_{Nuc} entre 0 y 1. En nuestro caso se obtuvo una β_{Nuc} de 0.52 cuando solo se consideran los tioles con carga neutra a pH 7.4 para el ajuste.

Tabla 5.1. Constantes de velocidad a pH 7.4 e independientes de pH para la reacción de HSA-SOH con tioles de bajo peso molecular de diferente pK_a .

Tiol	$k_{pH\ 7.4}^1$ ($M^{-1}\ s^{-1}$)	pK_a (171)	Fracción de tiolato (RS^-) a pH 7.4	$k_{ind\ pH}$ ($M^{-1}\ s^{-1}$)	$\log k_{ind\ pH}$
Cisteína	21.6 ± 0.2	8.3	0.14	154	2.18
Cisteinilglicina	55 ± 3	6.9	0.76	72	1.86
Homocisteína	9.3 ± 0.9	10.4	0.001	8857	3.95
Glutatión	2.9 ± 0.5	8.6	0.05	53	1.73
Cisteamina	234 ± 21	8.2	0.13	1745	3.24
2-Mercaptoetanol	7 ± 1	9.4	0.01	740	2.87
N-acetilcisteína	0.9 ± 0.1	9.6	0.006	131	2.12
Cisteína etiléster	130 ± 16	6.5	0.88	148	2.17

¹Constantes determinadas en amortiguador fosfato 100 mM, 25 °C y pH 7.4.

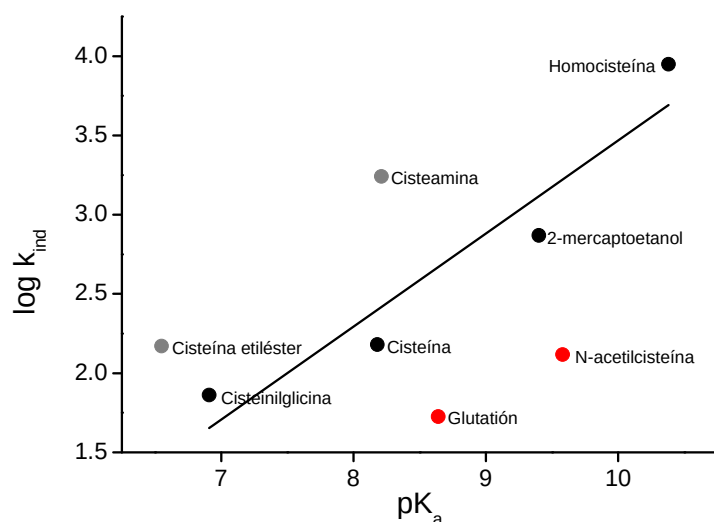
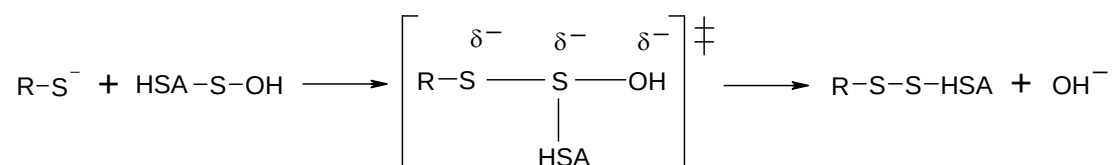


Figura 5.15. Gráfico de Brønsted para la reacción entre HSA-SOH y tioles de bajo peso molecular. Se determinaron las constantes de reacción entre HSA-SOH y tioles de bajo peso molecular con carga neta neutra (símbolos negros), negativa (símbolos rojos) y positiva (símbolos grises) a pH 7.4, mediante un experimento de competencia con TNB. Las constantes independientes del pH se calcularon a partir de la constante a pH 7.4 de acuerdo a la ecuación: $k_{7.4} = k_{ind} K_a / (K_a + [H^+])$ y teniendo en cuenta el pK_a de cada tiol (171). Para el ajuste se consideraron solo los tioles con carga neutra a pH 7.4.

Esto sugiere que la reacción ocurre por un mecanismo concertado, donde el estado de transición podría ser el que se observa en el Esquema 5.2. Además, del valor de β_{Nuc} (0.52) se desprende que la carga estaría repartida entre los tres átomos y el estado de transición tendría características intermedias a las de reactivos y productos.

Esquema 5.2. Mecanismo propuesto para la reacción entre HSA-SOH y tiolatos.



El hecho que los tioles cargados desvíen de la tendencia puede explicarse si se tiene en cuenta que la reacción implica un estado de transición cargado negativamente, por lo cual la velocidad será sensible a factores electrostáticos. De hecho, han sido reportados aspectos comparables en cuanto a la reactividad de tiolatos con disulfuros de carga neutra, positiva o negativa (174). En nuestro caso, los tiolatos con carga negativa adicional, como glutatión y N-acetilcisteína interactuarán menos favorablemente con la albúmina, negativa, que los cargados positivamente.

Estos experimentos proveen por primera vez de información mecanística sobre la reacción de un ácido sulfénico con un tiol para formar un disulfuro.

Tabla 5.2. Reactividad de HSA-SOH a pH 7.4

Molécula blanco	Constante de reacción ($M^{-1} s^{-1}$)
Tionitrobenzoato	105 ± 11^a
Dimedona	0.027 ± 0.009^b
Arsenito de sodio	0.036 ± 0.009^b
Ascorbato	ND ^c
Urato	ND ^c
Peróxido de hidrógeno	0.4 ± 0.2^b
Cisteína	21.6 ± 0.2^a
Cisteinilglicina	55 ± 3^a
Homocisteína	9.3 ± 0.9^a
Glutación	2.9 ± 0.5^a
N-acetilcisteína	0.9 ± 0.1^a
2-mercaptoetanol	7 ± 1^a
Cisteamina	234 ± 21^a
Cisteína etiléster	130 ± 16^a
Alanina	ND ^c
Lisina	ND ^c
Histidina	ND ^c
Arginina	ND ^c

^a Constantes determinadas a 25 °C.

^b Constantes determinadas a 37 °C.

^c No se detectó reacción.

5.2 Efecto de la unión de ácidos grasos en las propiedades del tiol y del ácido sulfénico en la HSA

Como parte de la tesina de grado de María José Torres, de la cual fui cotutora, se evaluó el efecto de la unión de distintos ácidos grasos sobre la reactividad del tiol y del ácido sulfénico. En esta sección se presenta un resumen de los resultados obtenidos (93, 175).

En primer lugar, se evaluó la reactividad del tiol con DTNB en presencia de distintos ácidos grasos (ácidos láurico 12:0, mirístico 14:0, palmítico 16:0, estearico 18:0 y oleico 18:1 $\Delta 9$) en proporción 5/1, a 25 °C y pH 7.4. La constante de reacción en ausencia de ácidos grasos fue $16 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a una fuerza iónica de $\sim 0.26 \text{ M}$. Este valor concuerda con el determinado previamente de $14.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) (sección 5.1.2). Para los complejos con ácidos grasos saturados, la constante de segundo orden se incrementó aproximadamente seis veces. En el caso del ácido láurico (12:0) se obtuvo una constante de segundo orden de $95 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para el ácido mirístico (14:0) fue de $117 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para ácido palmítico (16:0) de $92 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y para ácido estearico (18:0) fue de $104 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. También se ensayó el efecto de la lipidación con ácido oleico (18:1 $\Delta 9$) para evaluar el efecto de una insaturación en la cadena carbonada obteniéndose una constante de $102 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo cual sugiere que la insaturación no afecta. Estos resultados concuerdan con reportes previos donde se mostraba una mayor susceptibilidad del tiol a DTNB en presencia de ácidos grasos (176, 177).

La constante de reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno se determinó en HSA deslipidada y lipidada con ácido estearico (5/1) obteniéndose valores de 1.4 ± 0.3 y $2.7 \pm 0.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4), respectivamente. Esto implica que en presencia de ácidos grasos la constante de formación de HSA-SOH se duplicó. Resultados similares se obtuvieron para el peroxinitrito, con quien la constante global aumentó de $(7.5 \pm 0.3) \times 10^3$ a $(14.7 \pm 0.6) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4). La lipidación de HSA (ácido estearico-HSA, 5/1) determinó también un cambio en el pK_a del tiol. En presencia de ácidos grasos se obtuvo un pK_a de 7.4 ± 0.1 , mientras que en ausencia se obtuvo un pK_a de 7.9 ± 0.1 . Esta diferencia de 0.5 unidades de pH puede explicarse en términos de cambios en el microambiente electrostático debido a cambios conformacionales que determinan una mayor exposición al solvente lo que determina que el tiol se encuentre en un medio más polar. La disminución en el pK_a implica una mayor proporción de tiolato (50 versus 24 %) a pH 7.4. Si el aumento

en la reactividad del tiol se debiera exclusivamente al cambio en el pK_a esto implicaría que, tras la lipidación, las constantes de reacción del tiolato con cualquier molécula deberían incrementarse por el mismo factor. Sin embargo, observamos un aumento de seis veces en la reacción con DTNB mientras que con peróxido de hidrógeno la constante solo se duplicó. Por lo tanto, un cambio en el pK_a del tiol no es suficiente para explicar los cambios observados en la reactividad siendo necesario considerar otros cambios que se produzcan en las propiedades de HSA-SH. El análisis de los datos cristalográficos mostró que el área accesible al solvente del átomo de azufre de la Cys34 es de $0.7 \text{ \AA}^2$ en ausencia de lípidos y aumenta a $6.4 \text{ \AA}^2$ en HSA complejada con ácido hexadecanoico (ácido palmítico, 16:0) (Figura 5.16). Este aumento en la exposición del tiol determinaría una disminución en los impedimentos estéricos lo que permitiría un mejor alineamiento geométrico de los reactivos.

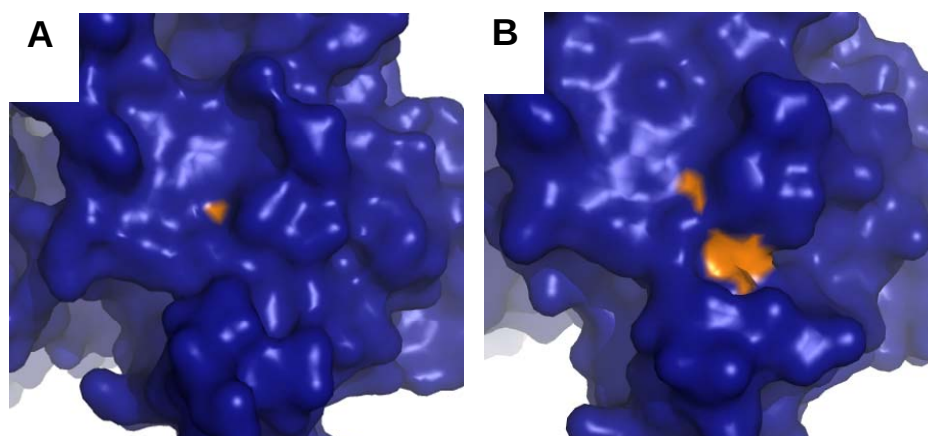


Figura 5.16. Exposición de la Cys34 en ausencia y presencia de ácidos grasos. (A) HSA deslipidada, código de acceso PDB 1AO6 (60) y (B) HSA con ácido palmítico unido, código de acceso PDB 1E7H (178). La superficie expuesta de la Cys34 se muestra en naranja. La figura se generó utilizando PyMOL v0.99 (www.pymol.org).

En suma, el aumento en la reactividad de HSA-SH en presencia de lípidos puede explicarse considerando que el cambio conformacional que determina una mayor exposición de HSA-SH tiene como consecuencia un aumento en la disponibilidad del tiolato debido a una disminución en el pK_a y además disminuye el impedimento estérico para la reacción.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la lipidación con ácido esteárico (5/1) sobre la reactividad de HSA-SOH utilizando las mismas estrategias experimentales que para la HSA

deslipidada. Al igual que lo observado para el tiol, en el caso de HSA-SOH se observó un incremento en la reactividad en presencia de ácidos grasos. En la Tabla 5.3 se resumen los resultados obtenidos. Por otro lado, la relación HSA-SOH/HSA determinada a partir de la amplitud de la primera fase de la reacción entre HSA-SOH y TNB resultó ser casi el doble (0.29 ± 0.4) que la observada en ausencia de lípidos (0.18 ± 0.2). Esto puede explicarse por el aumento en la constante de formación de HSA-SOH y por el hecho de que no se observaron cambios en la constante de decaimiento espontáneo en presencia de ácidos grasos.

Tabla 5.3. Caracterización de HSA-SOH en presencia y ausencia de ácidos grasos.

Molécula blanco	HSA deslipidada k ($M^{-1} s^{-1}$)	Ácido esteárico - HSA (5/1) k ($M^{-1} s^{-1}$)
Tionitrobenzoato (primera fase)	105 ± 11^a	545 ± 42^a
Tionitrobenzoato (segunda fase)	4.3 ± 0.9^a	10.2^a
Cisteína	21.6 ± 0.2^a	69 ± 7^a
Homocisteína	9.3 ± 0.9^a	27 ± 5^a
Cisteinilglicina	55 ± 3^a	131 ± 1^a
Glutación	2.9 ± 0.5^a	9 ± 2^a
Peróxido de hidrógeno	0.4 ± 0.2^b	0.4 ± 0.1^b

^a25 °C, pH 7.4 (amortiguador fosfato 100 mM, 0.1 mM DTPA), promedio $\pm$ desviación estándar.

^b37 °C, pH 7.4, promedio $\pm$ desviación estándar.

Este aumento en la reactividad de HSA-SH y HSA-SOH al unirse los ácidos grasos podría tener relevancia fisiológica. En ciertas condiciones tales como diabetes mellitus, estimulación adrenérgica, ejercicio intenso (179, 180), entre otras, se observa un aumento en el número de ácidos grasos unidos a la HSA circulante. En estos casos, un aumento en la capacidad antioxidante de la HSA podría constituir un mecanismo de protección. De hecho, en estas condiciones se observa un aumento en las isoformas oxidadas de la HSA (112, 116, 181). Además, el hecho que la reactividad de HSA-SOH con tioles de bajo peso molecular aumente tres veces en presencia de ácidos grasos podría tener impacto sobre el destino final de un HSA-SOH formado *in vivo*. Esto tendería a aumentar la proporción de disulfuros

mixtos, los cuales son intermediarios reversibles, en relación a otras formas oxidadas del tiol tales como los ácidos sulfínico y sulfónico, los cuales son modificaciones irreversibles.

5.3 Reducción catalítica de peróxido de hidrógeno por AhpE a expensas de tionitrobenzoato

En el marco de una colaboración con la Dra. Madia Trujillo, se utilizó la técnica del TNB con el objetivo de caracterizar el ácido sulfénico que se forma en la peroxirredoxina de una cisteína alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE) de *Mycobacterium tuberculosis*. Como era de esperar, cuando se expuso la enzima previamente reducida (2.5 μM) y TNB (70 μM) a peróxido de hidrógeno (20 μM) se observó una disminución en la concentración de TNB (Figura 5.17). La constante de reacción entre el tiol de la enzima y el peróxido de hidrógeno, que da lugar a la formación de ácido sulfénico, es $8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) (168). Tomando en cuenta esta constante podemos concluir que en nuestras condiciones experimentales el ácido sulfénico se forma casi inmediatamente después que la enzima y el oxidante se mezclan ($t_{1/2} = 0.42 \text{ s}$). Además, en nuestras condiciones experimentales, la oxidación de TNB por peróxido de hidrógeno es despreciable ($k = 1.06 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Si el TNB reaccionara solo con el ácido sulfénico se esperaría una cinética de consumo de TNB del tipo exponencial simple. Sin embargo, los registros de concentración de TNB versus tiempo fueron bifásicos, con una disminución rápida de la concentración de TNB por aproximadamente 30 s seguido de una disminución más lenta (Figura 5.17). Estos datos ajustaron a una función exponencial más una recta (Ec. 5.11),

$$[\text{TNB}] = A \exp(-k_{\text{obs}}t) + Pt + \text{offset} \quad (5.11)$$

donde A representa la amplitud, k_{obs} la constante de pseudoprimer orden de la primera fase y P la pendiente de la segunda fase.

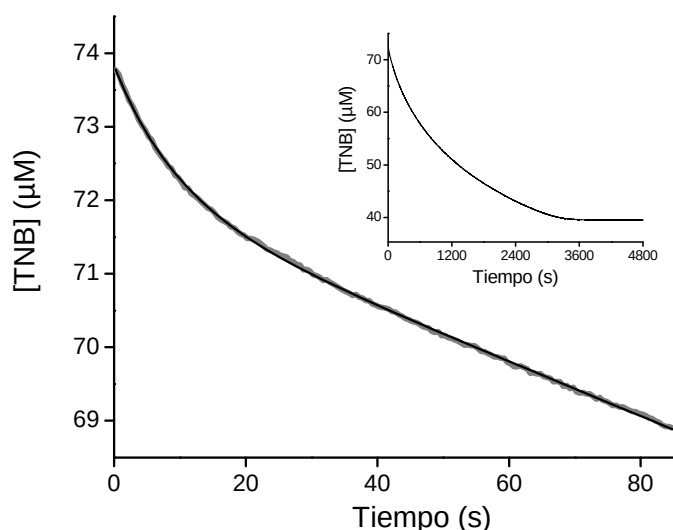


Figura 5.17. Reacción entre AhpE oxidada y TNB. En una jeringa del accesorio de flujo detenido se colocó AhpE reducida (2.5 μM) y TNB (70 μM) y se mezclaron con peróxido de hidrógeno (20 μM) presente en la segunda jeringa. La disminución en la concentración de TNB se siguió a 412 nm, 25 °C y pH 7.4 (trazo gris). El trazo negro representa el ajuste a la ecuación exponencial más recta: $[TNB] = 1.80 \exp(-0.105t) - 0.037t + 72.03$. *Inserto:* La misma reacción se registró durante 60 min.

Estos resultados sugirieron que el TNB no solo reaccionó con el ácido sulfénico sino también con el disulfuro mixto dando lugar a la formación de enzima reducida, quien luego podría ser nuevamente oxidada por el peróxido de hidrógeno remanente constituyendo un ciclo catalítico (Ec. 5.12-5.14),



El decaimiento bifásico observado corresponde a una cinética de estado preestacionario de estallido típica, donde existe una primera fase de consumo rápido del TNB por parte del ácido sulfénico, seguido de la reducción de la enzima, lo que constituye el paso limitante de la reacción. Por otra parte, una vez culminada la reacción (~60 min), el consumo de TNB fue dos veces la concentración de peróxido de hidrógeno utilizada en la reacción y 16 veces mayor que la concentración de enzima, lo que apoya el mecanismo catalítico propuesto (Figura 5.17, Inserto).

La amplitud de la fase exponencial o estallido, que representa la concentración de disulfuro mixto formado (AhpE-STNB), fue proporcional a la concentración de enzima como era de esperar según el mecanismo propuesto (Figura 5.18, panel A). La pendiente de este gráfico se corresponde a la cantidad de ácido sulfénico que puede ser detectado por la

técnica, obteniéndose un valor de 77 % en relación a la concentración de enzima. Por otro lado, la constante de la reacción entre TNB y AhpE-SOH resultó ser independiente de la concentración de enzima y se obtuvo un valor de $(1.5 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) (Figura 5.18, panel B). Si se grafica la velocidad de la segunda fase en función de la concentración de enzima también se obtiene una dependencia lineal (Figura 5.18, panel C). En este caso el corte en el eje de las abscisas corresponde a la velocidad de reacción en ausencia de enzima, es decir, la reacción entre TNB y peróxido de hidrógeno. Dado que se conoce la concentración de ambos reactivos fue posible estimar una constante de reacción de $0.8 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, valor en el orden del obtenido antes.

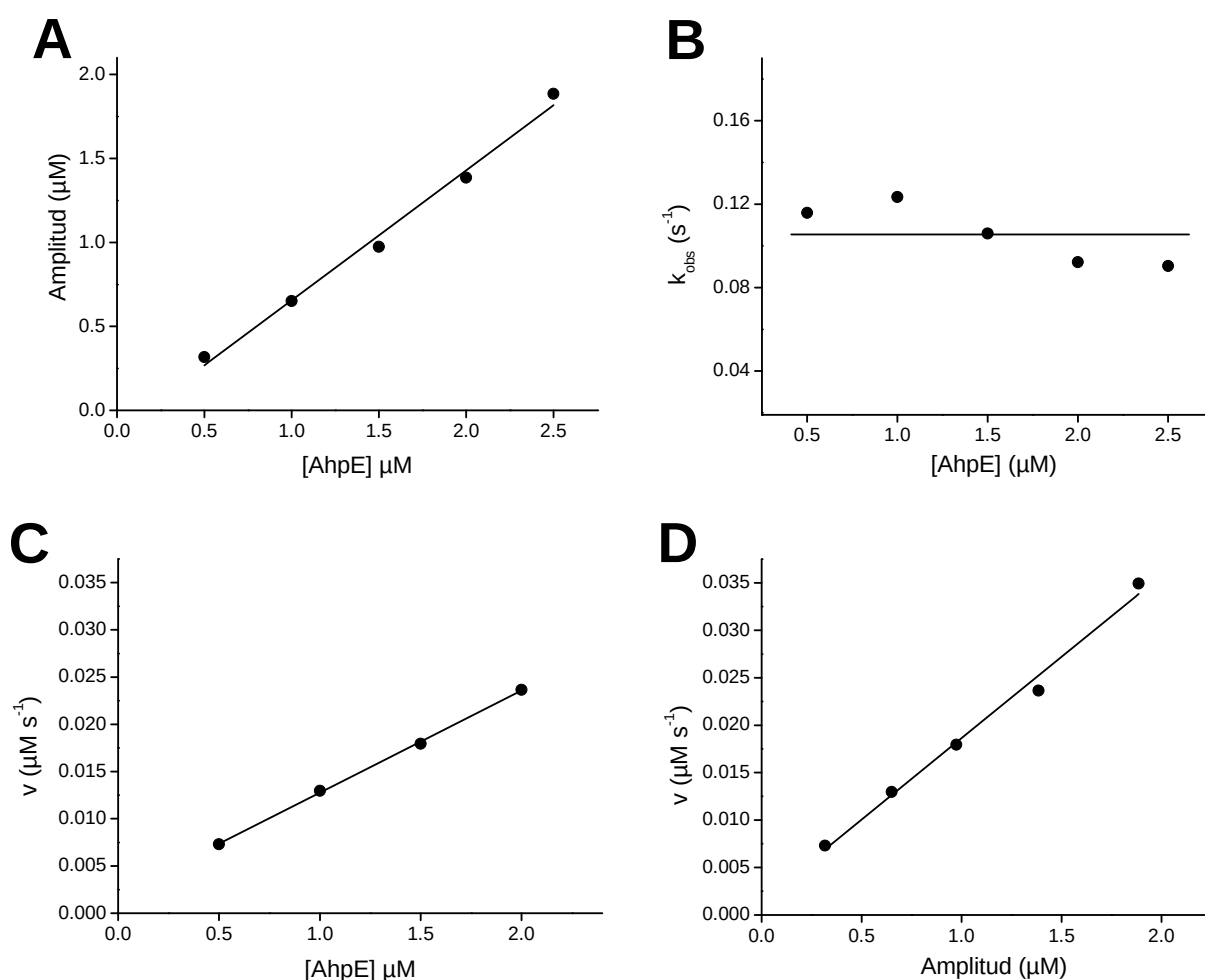


Figura 5.18. Dependencia de la reacción entre AhpE oxidada y TNB con la concentración de AhpE. Se mezclaron concentraciones crecientes de AhpE (0.5-2.5 μM) y TNB (70 μM) con peróxido de hidrógeno (20 μM) y se registró la caída en la concentración de TNB (412 nm, 25 °C, pH 7.4). Del ajuste a la Ec. 5.11 se obtuvieron (A) amplitud, (B) k_{obs} y (C) velocidad de la segunda fase, que se graficaron en función de la concentración de AhpE. (D) La velocidad de la segunda fase se graficó en función de la amplitud.

La constante de segundo orden para la reacción entre el disulfuro mixto y TNB se determinó a partir del gráfico velocidad de la segunda fase *versus* amplitud pues ésta representa la concentración de AhpE-STNB formado. Considerando que para la segunda fase (Ec. 5.15):

$$v = k[\text{AhpE-STNB}][\text{TNB}] \quad (5.15)$$

si se divide la pendiente por la concentración de TNB se obtiene un valor de $266 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) (Figura 5.18, panel D).

Por último, se midió la constante de la reacción reversa de la Ecuación 5.14, o sea, la constante de reacción entre AhpE-SH y DTNB. En este caso, se determinó la velocidad inicial de la reacción para minimizar la interferencia de la reacción de los productos, TNB y AhpE-STNB. Con este abordaje experimental se obtuvo un valor de $180 \pm 9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) para la constante de reacción entre AhpE-SH y DTNB (Figura 5.19).

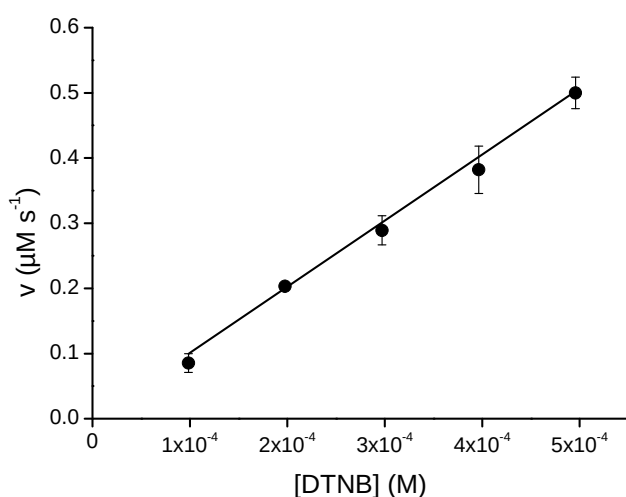


Figura 5.19. Reacción entre AhpE reducida y DTNB. Se mezcló AhpE reducida (10 μM) con concentraciones crecientes de DTNB (100-500 μM) a 25 °C y pH 7.4 utilizando un accesorio de flujo detenido. Se registró la velocidad inicial del aumento en la absorbancia a 412 nm.

En base a las constantes determinadas y las concentraciones utilizadas en los ensayos se realizó una simulación utilizando Gepasi 3.30 (166). Los datos ajustaron muy bien al modelo propuesto e indicaron que, en nuestras condiciones experimentales, se debería detectar un 78 % de AhpE-SOH en relación a la enzima total lo cual coincide con el valor de 77 % obtenido experimentalmente.

Estos resultados aportaron la primera evidencia de que esta enzima puede actuar de forma catalítica ya que no se conocía su sustrato reductor natural. Posteriormente se utilizó ditioneitol (DTT) como sustrato reductor artificial (182) y actualmente se está

intentando determinar cuál es el sustrato natural de esta enzima (Madia Trujillo, comunicación personal).

Los resultados obtenidos con esta enzima, además, validan la técnica del TNB para el estudio de ácido sulfénico formado en proteínas y resaltan la importancia de realizar análisis cinéticos para cada proteína en particular.

5.4 Purificación de isoformas del tiol de la HSA por cromatoenfoco y análisis por espectrometría de masa

Para poder profundizar en la caracterización de las formas oxidadas del tiol de la HSA era necesario desarrollar un método que permitiera purificar cada una de ellas y así analizarlas en forma independiente. Con este objetivo, Horacio Botti y Lucía Bonilla diseñaron un método cromatográfico capaz de separar las distintas formas del tiol de la HSA según las diferencias en sus puntos isoelectrónicos (pI). Este procedimiento fue retomado y desarrollado en la presente tesis. Contrario a lo que ocurre en una cromatografía de intercambio iónico tradicional, en el cromatoenfoco la elución ocurre por cambios en el pH de la fase móvil, que debe ser de baja fuerza iónica. Sluyterman y Elgersma (183) establecieron que, durante un cromatoenfoco, existe una diferencia de pH entre la fase móvil y la fase estacionaria debido a que esta última tiene las cargas fijas. Esto determina que el pI observado para la proteína sea menor que el real cuando se utiliza un intercambiador aniónico como en nuestro caso. Los puntos isoelectrónicos reportados para la HSA varían entre 5.67 y 5.9 cuando se determinan mediante cálculos teóricos (184, 185) y entre 4.7 y 5.8 cuando se determinan experimentalmente (61).

En este trabajo se utilizó una columna comercial de intercambio aniónico débil de alta resolución (TSK DEAE). Cuando se inyectó HSA reducida, se observó un pico mayoritario que eluía a 23.5 % B y pH 4.64 (Figura 5.20, pico a). El pH de elución fue el mismo en varias determinaciones independientes. Cuando se analizó este pico por espectrometría de masa se obtuvo una masa de 66435 ± 3 Da, lo cual concuerda con la masa esperada para HSA-SH (66438 Da) (Figura 5.21, panel A) (61). La masa de HSA-SH se expresa como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar calculada a partir de medidas de los espectros deconvolucionados de 10 muestras. El error se encuentra dentro del esperado considerando la resolución del equipo.

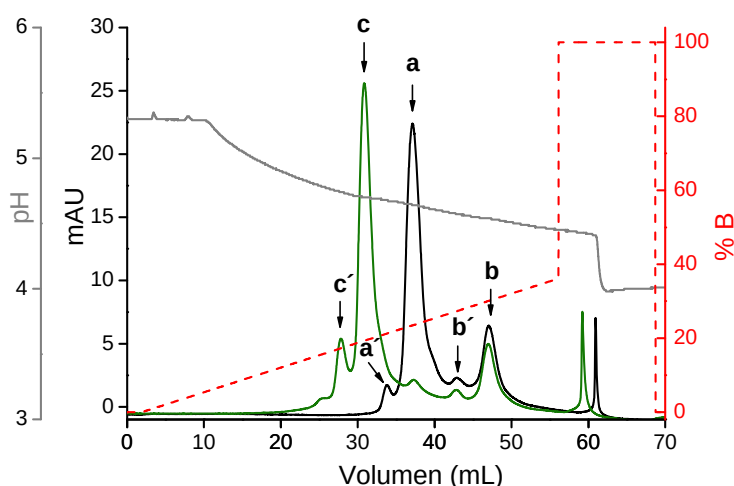


Figura 5.20. Cromatograma de HSA comercial reducida. Se inyectó 1 mg de HSA reducida (0.8 SH/HSA) (trazo negro) y 1 mg de HSA reducida y tratada con HgCl_2 (trazo verde). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0 a 40 % de amortiguador B en 60 min a un flujo de 1 mL/min. Se registraron la absorbancia, el pH (trazo gris) y el % B (trazo rojo). El pico a corresponde a HSA-SH, b a HSA-SO₂H, a' a HSA-SH- $\Delta(\text{Asp1-Ala2})$, b' a HSA-SO₂H- $\Delta(\text{Asp1-Ala2})$, c a HSA-SHg y c' a HSA-SHg- $\Delta(\text{Asp1-Ala2})$.

Como ya se mencionó antes, las preparaciones comerciales de HSA siempre contienen una fracción no reducible, mayoritariamente HSA-SO₂H. El pK_a esperado para un grupo sulfínico (RSO₂H) es 2.2 -2.3 (186), mientras que el pK_a del tiol reducido en la HSA es de ~8 (93, 95, 101). Por lo tanto, si el tiol se encuentra oxidado a ácido sulfínico, se espera que en el rango de pH utilizado en la técnica, la HSA presente una carga negativa adicional lo cual determina una disminución en el pI. Como resultado de esto, la HSA-SO₂H eluiría a un pH menor y mayor porcentaje de B. Teniendo esto en consideración, podemos asignar al segundo pico en orden de intensidad (pico b, Figura 5.20) que eluye a pH 4.54 y 30.2 % B a HSA-SO₂H. El análisis por espectrometría de masa de esta fracción arrojó un valor de masa para esta isoforma de 66469 Da, lo que coincide con la adición de dos oxígenos ($\Delta 32$ Da) (Figura 5.21, panel B). La adición de peróxido de hidrógeno llevó, como era de esperar, a un aumento en el pico b (datos no mostrados).

Previamente, ha sido reportado para preparaciones comerciales de HSA la pérdida de los primeros dos aminoácidos del extremo amino terminal, aspartato y alanina, lo cual lleva a la isoforma HSA- $\Delta(\text{Asp1-Ala2})$. Además, esta forma de la HSA también ha sido detectada en la circulación en pequeñas cantidades (88). El pK_a esperado para el grupo carboxilo de un residuo de aspartato es ~4 por lo que, en el rango de pH utilizado en nuestra técnica, la pérdida de este residuo implica la pérdida de una carga negativa y el consecuente aumento en el punto isoeléctrico de la HSA. Por lo tanto, los pequeños picos que aparecen antes de HSA-SH y HSA-SO₂H (picos a' y b', Figura 5.20, respectivamente)

pueden deberse a la pérdida de estos dos aminoácidos.

En este método cromatográfico, HSA-SOH, HSA-SX y HSA-SSR (si el tiol de bajo peso molecular no aporta una carga neta) coeluyen con HSA-SH. Para lograr separar este último se adicionó cloruro de mercurio a las muestras. Éste solo reacciona con el tiol en la forma reducida y adiciona una carga positiva extra, lo que determina un aumento en el punto isoeléctrico de la proteína. De hecho, luego del tratamiento de HSA reducida con cloruro de mercurio apareció un nuevo pico que eluyó a pH 4.70 y 19.6 % B (pico c, Figura 15), mientras que el pico a disminuyó. Es importante destacar que el pico b no cambió dado que el HSA-SO₂H no reaccionó con el cloruro de mercurio. El análisis por espectrometría de masa del pico c arrojó una masa de 66661 Da (Figura 5.21, panel C). La masa esperada para el tiol reducido con un ion mercurio unido es 66637.6 Da. La diferencia de +23 Da podría deberse a un ion sodio unido (22.989 Da). Además, se observó un pico más pequeño con una masa consistente con la de HSA-SH (66441 Da).

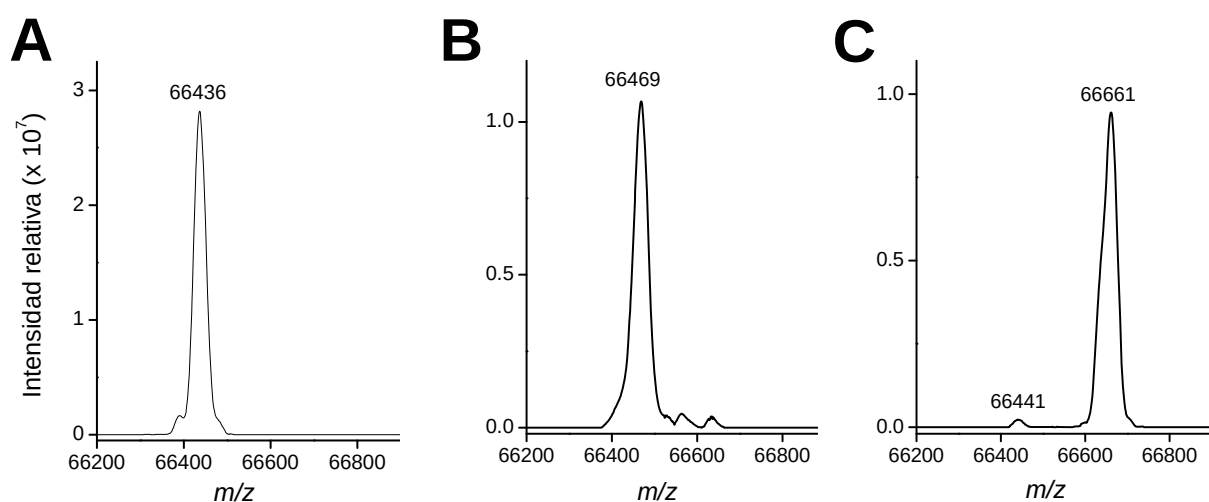


Figura 5.21. Análisis por espectrometría de masa de la proteína entera. Los picos a (A), b (B) y c (C) obtenidos en el cromatofoco de la Figura 5.20 se colectaron y analizaron en un espectrómetro de masa LTQ Orbitrap Velos. La deconvolución se llevó a cabo usando ProMass software (versión 2.5).

Para poder racionalizar cualitativamente los resultados obtenidos en la cromatografía, se estimó la carga total de la HSA-SH a distintos pHs a partir de datos estructurales utilizando el programa PROPKA Web Interface (185). Luego se estimó la carga total de HSA-SO₂H y HSA-SHg⁺ a los distintos pH. Como se observa en la Figura 5.22, a partir del corte en eje de las x, se obtiene un valor de pI para HSA-SH de 5.90. Cuando el tiol se encuentra oxidado a HSA-SO₂H se obtiene un pI menor (5.87), mientras que cuando

el tiol reacciona con cloruro de mercurio se obtiene un valor de pI mayor (5.93). Si bien los valores no coinciden exactamente con lo observado experimentalmente, sí apoyan cualitativamente la interpretación de los resultados cromatográficos. Probablemente, las diferencias se deban a las dificultades inherentes a estimar constantes de acidez a partir de datos estructurales.

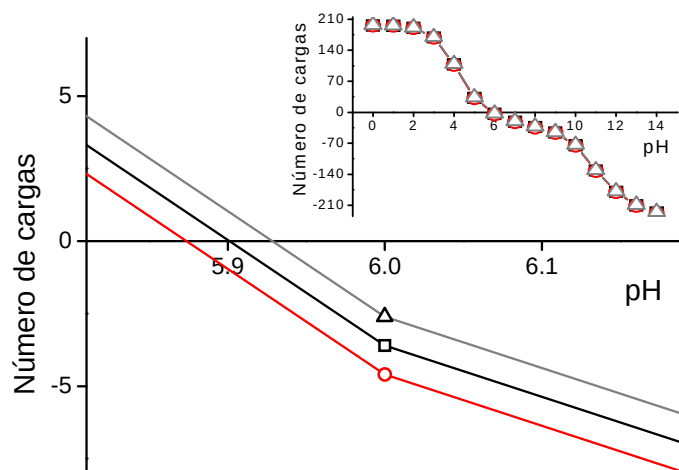


Figura 5.22. Número de cargas en la HSA en función del pH. En base a datos estructurales (PDB 1A06) y utilizando PROPKA Web Interface (185) se determinó el número de cargas en HSA-SH en función del pH (cuadrados negros). Para HSA-SO₂H (círculos rojos) se estimó un pK_a de 2 y para HSA-SHg⁺ (triángulos grises) se asumió la adición de una carga positiva en todo el rango de pH.

5.4.1 Análisis de distintas HSA comerciales

Dado que esta técnica permite resolver las distintas isoformas del tiol de la HSA, resulta una herramienta muy útil para evaluar el nivel de oxidación de las HSA comerciales. Como una primera aproximación, se analizaron tres HSA comerciales de distintos fabricantes sin ninguna purificación ni tratamiento previo. Estas HSA comerciales se obtienen a partir de plasma humano, por lo tanto es de esperar que un cierto porcentaje de la misma (>25 %) se encuentre formando disulfuros mixtos (HSA-SS-R), los cuales se espera sean con cisteína en forma mayoritaria. Dado que la cisteína no presenta carga neta a pH 7.4 (una vez que se encuentra como disulfuro) es de esperar que el disulfuro con HSA (HSA-SSCys) coeluya con HSA-SH y HSA-SX. Como se ve en la Figura 5.23, los niveles de oxidación de estas tres muestras de HSA difieren en forma notoria, sobretudo en el caso de la HSA del laboratorio 3 (Tabla 5.4). Actualmente no existe, como parte del control de calidad de las HSA comerciales, un análisis de este tipo donde se evalúe el nivel de oxidación del tiol. En este sentido, esta técnica representa una contribución potencial.

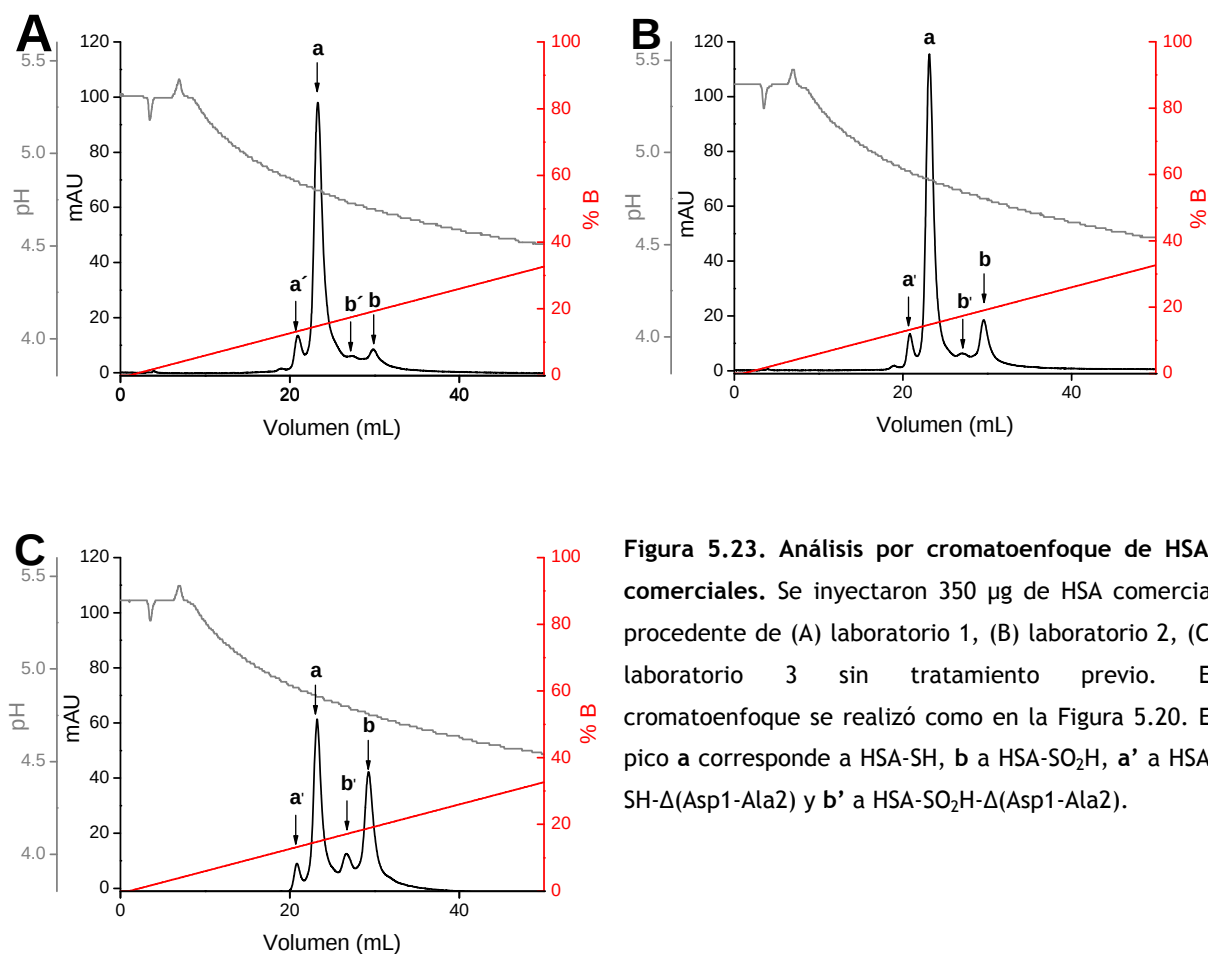


Figura 5.23. Análisis por cromatoenfoque de HSAs comerciales. Se inyectaron 350 µg de HSA comercial procedente de (A) laboratorio 1, (B) laboratorio 2, (C) laboratorio 3 sin tratamiento previo. El cromatoenfoque se realizó como en la Figura 5.20. El pico a corresponde a HSA-SH, b a HSA-SO₂H, a' a HSA-SH-Δ(Asp1-Ala2) y b' a HSA-SO₂H-Δ(Asp1-Ala2).

Tabla 5.4. Análisis de isoformas del tiol en HSA para uso clínico.

Laboratorio	Vigencia ¹	% a ²	% a' ²	% b ²	% b' ²
1	2	76.3	8.0	10.5	5.2
2	8	72.0	6.4	16.6	5.4
3	9	46.2	4.1	38.8	10.9
Plasma		88.7	6.1	2.3	-

¹ meses que transcurrieron desde la fecha de envasado hasta la fecha del análisis.

² los porcentajes se determinaron a partir del área bajo la curva de los gráficos de las Figuras 5.23 y 5.24.

5.4.2 Análisis de muestras de plasma

Finalmente, para evaluar si este método puede ser aplicado a muestras más complejas, se utilizó plasma fresco sin ningún paso de purificación previo (Figura 5.24, panel A). Cuando se evaluó la muestra se observó un pico mayoritario, pico **a**, el cual corresponde a una mezcla de HSA-SH y HSA-SSR (donde R es fundamentalmente cisteína). Además se observó un pequeño pico, pico **b**, correspondiente a HSA-SO₂H y el pico **a'**, correspondiente a la pérdida de los dos primeros aminoácidos del extremo amino terminal. Midiendo las áreas de cada pico es posible estimar que la cantidad de HSA-SO₂H circulante de este donante sano es de 2.3 %, mientras que la cantidad de HSA carente de los dos primeros aminoácidos es de 6.1 % lo cual coincide con reportes previos (88). Se destaca también que el plasma fresco presentó un nivel de oxidación mucho menor que las muestras comerciales (Tabla 5.4)

Por otro lado, la muestra de plasma fue oxidada con peróxido de hidrógeno y luego analizada. Como era de esperar, se observó un aumento en el pico **b**, correspondiente a HSA-SO₂H (Figura 5.24, panel C). Por otro lado se espera que tras la reacción de HSA-SH con peróxido de hidrógeno se forme HSA-SOH y que el mismo decaiga a HSA-SX. Como ya se mencionó antes, tanto HSA-SH, HSA-SSR, HSA-SOH y HSA-SX coeluyen, por lo tanto, no es posible distinguirlos. Como estrategia para separar HSA-SOH y HSA-SX del pico **a**, se decidió adicionar N-acetilcisteína (NAC). Este tiol de bajo peso molecular presenta carga neta negativa al pH de trabajo y por lo tanto se espera que afecte el pI de la proteína. Por otro lado, se espera que reaccione preferentemente con HSA-SOH/SX. Para confirmar esto se incluyó un control donde el plasma sin oxidar se incubó con NAC, no observándose ningún cambio en el pico **a** (Figura 5.24, panel B). Esto indica que la reacción con HSA-SSCys no ocurre en forma significativa. Además, sugiere que la concentración de HSA-SOH/SX en el plasma fresco era muy baja como para ser detectada. Para esta estrategia también se pudo haber utilizado GSH, sin embargo, éste se encuentra naturalmente en el plasma formando disulfuros mixtos, aunque en muy baja proporción, lo que podría dificultar futuros análisis por espectrometría de masa. Como conocemos la constante de velocidad de reacción de NAC con HSA-SOH (Tabla 5.2) el tiempo de reacción se ajustó de manera de permitir que la reacción se complete aproximadamente en un 95 %. En el panel D de la Figura 5.24 se observa que tras la adición de NAC al plasma previamente oxidado, aparece un nuevo pico, pico **d**. A pesar de que no fue posible resolver completamente el pico correspondiente a HSA-SSNAC del pico de HSA-SO₂H utilizando estas condiciones

experimentales, puede observarse que este nuevo pico se forma a expensas del pico **a** y no del pico **b**. En su conjunto, estos resultados reafirman que HSA-SOH/SX coeluyen con HSA-SH y HSA-SSCys y muestran que HSA-SSNAC puede separarse de HSA-SH y HSA-SSCys. Por último, el hecho que HSA-SOH coeluya con HSA-SH es un argumento a favor de que el aumento de reactividad a pH ácido del HSA-SOH no se deba a que el pK_a sea menor que 4 sino a cambios conformacionales de la proteína.

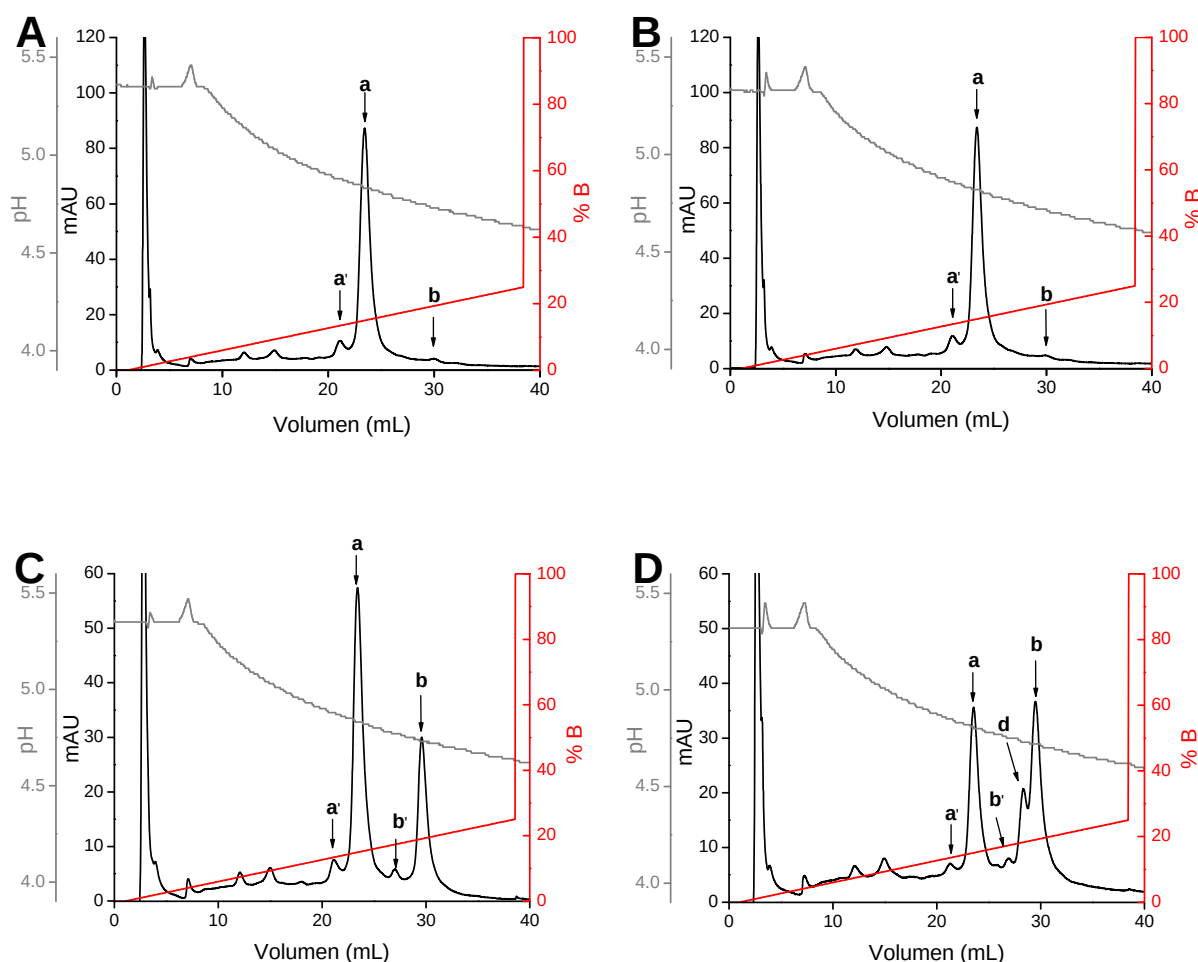


Figura 5.24. Análisis por cromatoenfoque de plasma fresco, oxidado y tratado con N-acetilcisteína. Se inyectó (A) plasma (~350 µg HSA), (B) plasma tratado con NAC (1 mM, 1 h, temperatura ambiente), (C) plasma oxidado con peróxido de hidrógeno (15 mM, 10 min, temperatura ambiente) y (D) plasma oxidado y tratado con NAC. La elución se llevó a cabo igual que siempre. El pico **a** corresponde a HSA-SH, **b** a HSA-SO₂H, **a'** a HSA-SH-Δ(Asp1-Ala2), **b'** a HSA-SO₂H-Δ(Asp1-Ala2) y **d** a HSA-SSNAC.

5.5 Caracterización de HSA-SX por espectrometría de masa

Para profundizar en la identificación y caracterización de la forma HSA-SX era necesario primero obtenerla en forma pura. Con este objetivo se utilizó la técnica de cromatoenfoco descrita antes. Se partió de una HSA reducida la cual se oxidó con peróxido de hidrógeno (30 mM, 10 min, temperatura ambiente) y luego se trató con cloruro de mercurio 1.2 veces en exceso. Ahora, el pico a corresponde a HSA-SOH o HSA-SX, dado que todo el HSA-SH reaccionó con el cloruro de mercurio. Teniendo en cuenta que la cromatografía tiene lugar a pH ácido (3.95-5.35) y que se mostró antes que el decaimiento espontáneo de HSA-SOH es mayor cuanto menor es el pH, es de esperar que la especie presente en el pico a sea el producto de descomposición de HSA-SOH, es decir, HSA-SX. Cuando esta fracción fue analizada por espectrometría de masa se obtuvo un pico de 66436 ± 4 Da (Figura 5.25), masa que coincide con la esperada para HSA-SH (66438 Da). Para descartar que se trate de HSA-SH se incubó HSA-SX y HSA-SH con NEM y se volvió a analizar su masa. En el caso de HSA-SH, se observó un pico mayoritario de 66564 ± 1 Da, es decir +126 Da en relación a la masa esperada para HSA-SH. Esto se corresponde con la adición de una molécula de NEM (125.1 g/mol). Sin embargo, en el caso de HSA-SX se observó una masa de 66436 ± 4 lo cual implica que el alquilante no reacciona con HSA-SX descartando así la posibilidad de que se trate de HSA-SH (datos no mostrados). Por otro lado, estos resultados sugieren que HSA-SX podría ser una sulfenamida, es decir, HSA-SNHR, dado que la masa esperada para esta especie es de -2 Da en relación a la forma reducida y esta diferencia se encuentra dentro del error de las determinaciones.

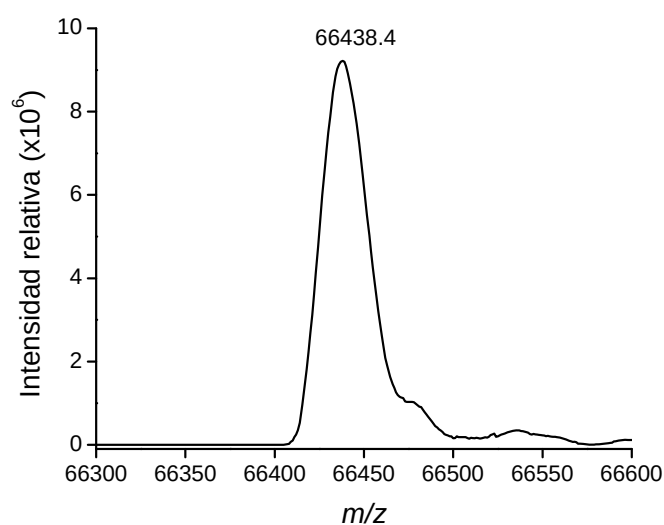


Figura 5.25. Análisis por espectrometría de masa de la proteína entera. El pico a obtenido en el cromatoenfoco luego del tratamiento con peróxido de hidrógeno y cloruro de mercurio se analizó en un espectrómetro de masa LTQ Orbitrap Velos. La deconvolución se llevó a cabo usando ProMass software (versión 2.5).

Para intentar identificar esta especie se comenzó a trabajar con la muestra tripsinizada. En primer lugar, HSA-SX fue tratada o no con 2-mercaptoetanol, incubada con NEM en exceso y luego digerida con tripsina. Cuando la muestra fue previamente reducida se encontró un péptido triplemente cargado $[M + 3H]^{3+}$ cuyo m/z de 853.45 se corresponde

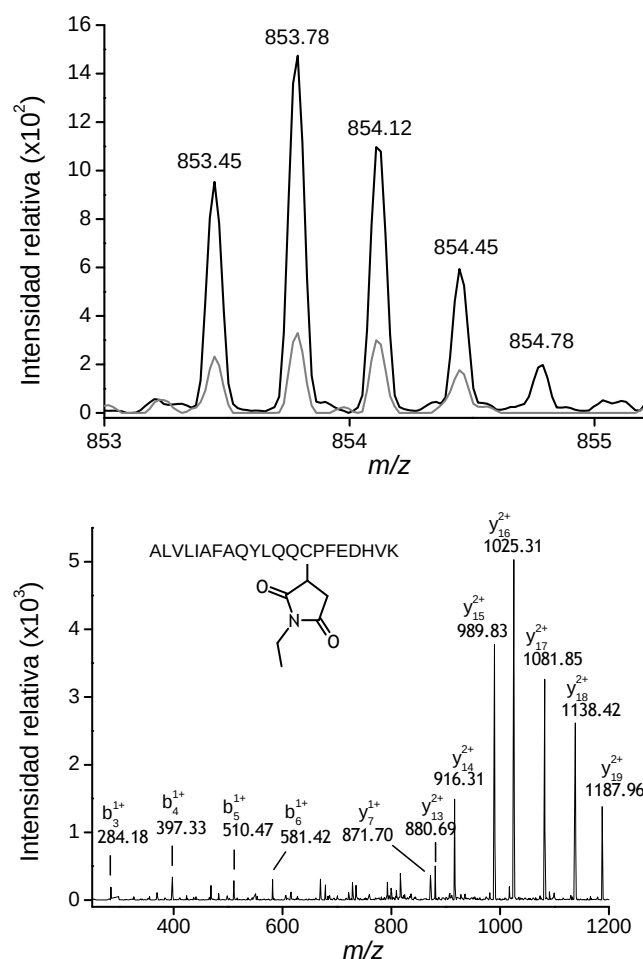


Figura 5.26. Reacción de HSA-SX con NEM y 2-mercaptoetanol. HSA-SX (1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 100 μg) se trató (trazo negro) o no con 2-mercaptoetanol (trazo gris) 20 veces en exceso (amortiguador bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8.2, 4 h, 4 °C). Ambas muestras se trataron con NEM (10 mM, 1 h, 37 °C) y se analizaron por espectrometría de masa. (A) El péptido de la Cys34 se detectó como la especie triplemente cargada (m/z 853.45) +125 Da. (B) MS/MS del péptido triplemente cargado mostrando los iones hijos b e y .

con el del péptido de la Cys34 (21-41, 2432.9 Da) +125 Da debido a la alquilación por el NEM (Figura 5.26, panel A). El MS/MS de este péptido mostró varios iones hijos b e y que confirmaron que se trataba del péptido alquilado con NEM a nivel de la Cys34 (Figura 5.26, panel B). Cuando se analizó la muestra de HSA-SX sin reducir, no se detectó significativamente el péptido, apenas se observaron unos picos de muy baja intensidad que no fueron suficientes para realizar el análisis por MS/MS. Estos resultados sugieren que HSA-SX es una especie reducible por tioles y que el producto de dicha reducción es HSA-SH. Una vez más, los resultados sugirieron que se podría tratar de una sulfenamida (HSA-SNHR). Otra hipótesis es que el HSA-SOH pudiera reaccionar con el oxígeno fenólico de la Tyr84 que se encuentra espacialmente muy próxima (Figura 2.4), aunque esta modificación no ha sido reportada todavía.

Como se había mencionado previamente, de tratarse de una HSA-SNHR, ésta no se formaría con el nitrógeno amídico contiguo dado que se trata de una prolina. Tampoco parece hacerlo con un residuo del propio fragmento tríptico (21-41), pues no se detectó el

péptido (21-41) con una diferencia de masa de -2 Da. A su vez, se descartó la reacción con un residuo de otra molécula de HSA, lo que llevaría a la formación de dímeros (Figura 5.7).

Con el objetivo de identificar con qué amina o amida reacciona el HSA-SOH se realizaron diversos experimentos de masa evaluando posibles uniones entre péptidos e incluso la formación de enlaces intrapéptido pero los resultados no fueron concluyentes. Sin duda, este análisis presenta grandes dificultades debido a que la HSA es una proteína relativamente grande que además presenta 17 puentes disulfuro. Estos pueden sufrir reacciones de transulfuración que complican el análisis, más aún si se tiene en cuenta que no es posible reducirlos y bloquearlos pues HSA-SX reacciona con reactivos de tioles como el 2-mercaptoetanol.

5.6 Caracterización de la reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno por espectrometría de masa

Se analizó la reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno por espectrometría de masa de la proteína entera. Cuando los espectros se deconvolucionaron utilizando los parámetros por defecto del programa ProMass software para el análisis de proteínas grandes se observó a tiempo 0 un pico predominante correspondiente a HSA-SH (66438, +0 Da). A los 30 min de reacción se observó un pico correspondiente a HSA-SH +16 Da y a los 140 min un pico correspondiente a HSA-SH +32 Da. Probablemente el pico +16 Da corresponda a HSA-SOH y el pico +32 Da se deba a HSA-SO₂H (Figura 5.27). Esta es la primera vez que se observa en forma directa la formación de HSA-SOH.

Otras condiciones de deconvolución permitieron resolver mejor los picos y por lo tanto determinar el porcentaje de la intensidad relativa de los picos +0 (Figura 5.28, panel A), +16 (Figura 5.28, panel B) y +32 Da (Figura 5.28, panel C) a distintos tiempos.

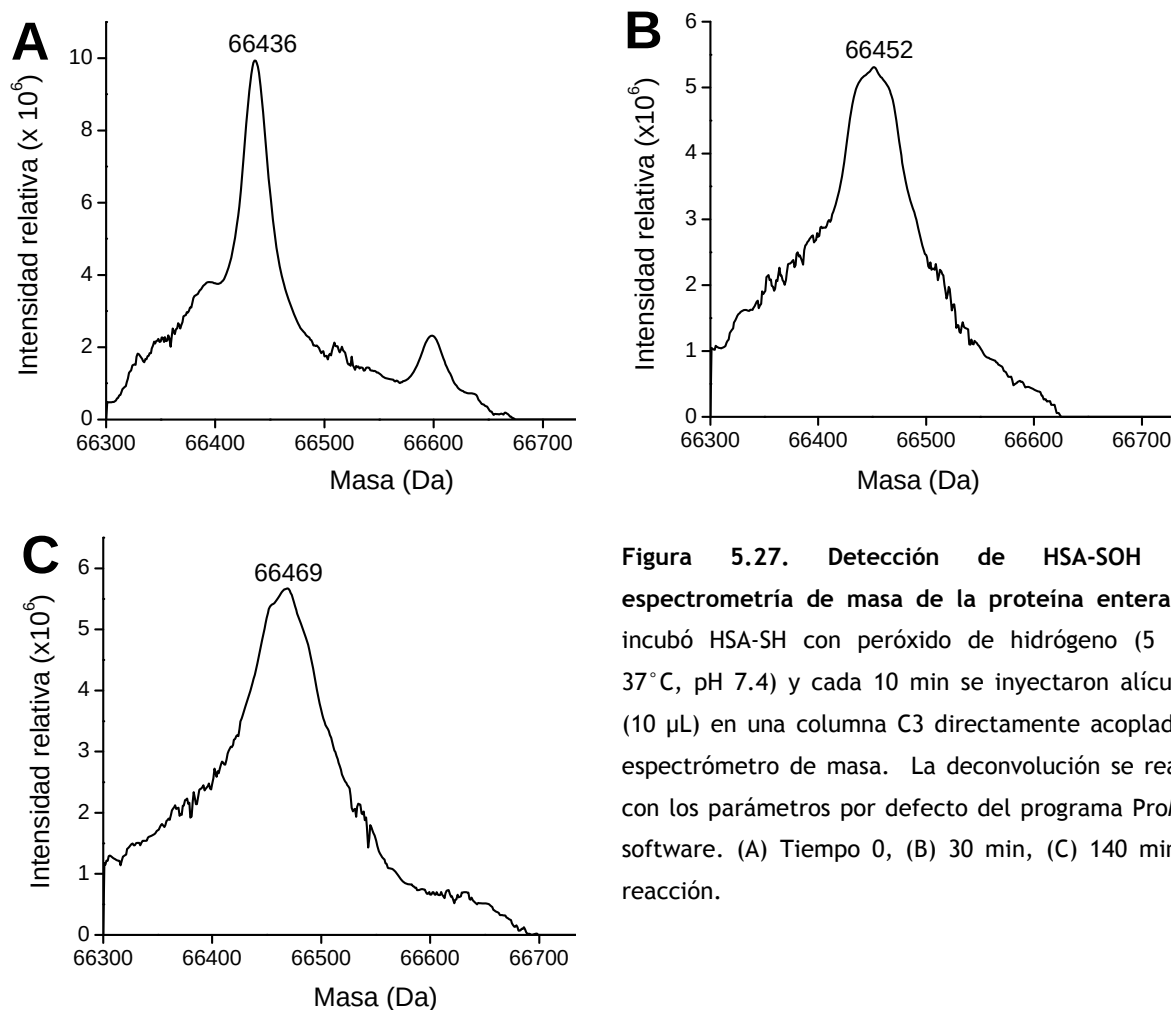


Figura 5.27. Detección de HSA-SOH por espectrometría de masa de la proteína entera. Se incubó HSA-SH con peróxido de hidrógeno (5 mM, 37°C, pH 7.4) y cada 10 min se inyectaron alícuotas (10 μ L) en una columna C3 directamente acoplada al espectrómetro de masa. La deconvolución se realizó con los parámetros por defecto del programa ProMass software. (A) Tiempo 0, (B) 30 min, (C) 140 min de reacción.

Para el caso del pico +0 Da se observó una disminución en la intensidad del mismo, debido al consumo de HSA-SH. Sin embargo, el pico se siguió viendo a lo largo de todo el intervalo estudiado probablemente debido a la formación de HSA-SX que presenta una masa indistinguible con la de HSA-SH. Por otro lado, en el caso del pico +16 Da se observó un aumento seguido de un descenso, lo que coincidió con lo visto antes por la técnica del TNB. Esto se explica considerando un primer intervalo donde se forma HSA-SOH el cual luego decae a HSA-SX o reacciona con otra molécula de peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación de HSA-SO₂H. En cuanto al pico +32 Da, correspondiente a HSA-SO₂H, se observó un aumento exponencial. En principio, la k_{obs} que se obtiene del ajuste a una función exponencial debería corresponder a la constante de decaimiento espontáneo más la constante de reacción de HSA-SOH con peróxido de hidrógeno multiplicado por la concentración de peróxido de hidrógeno. Considerando las constantes obtenidas con la técnica del TNB se esperaría una k_{obs} de $3.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y en este caso se obtiene un valor de

$1.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, por lo que se encuentra dentro del orden de lo esperado.

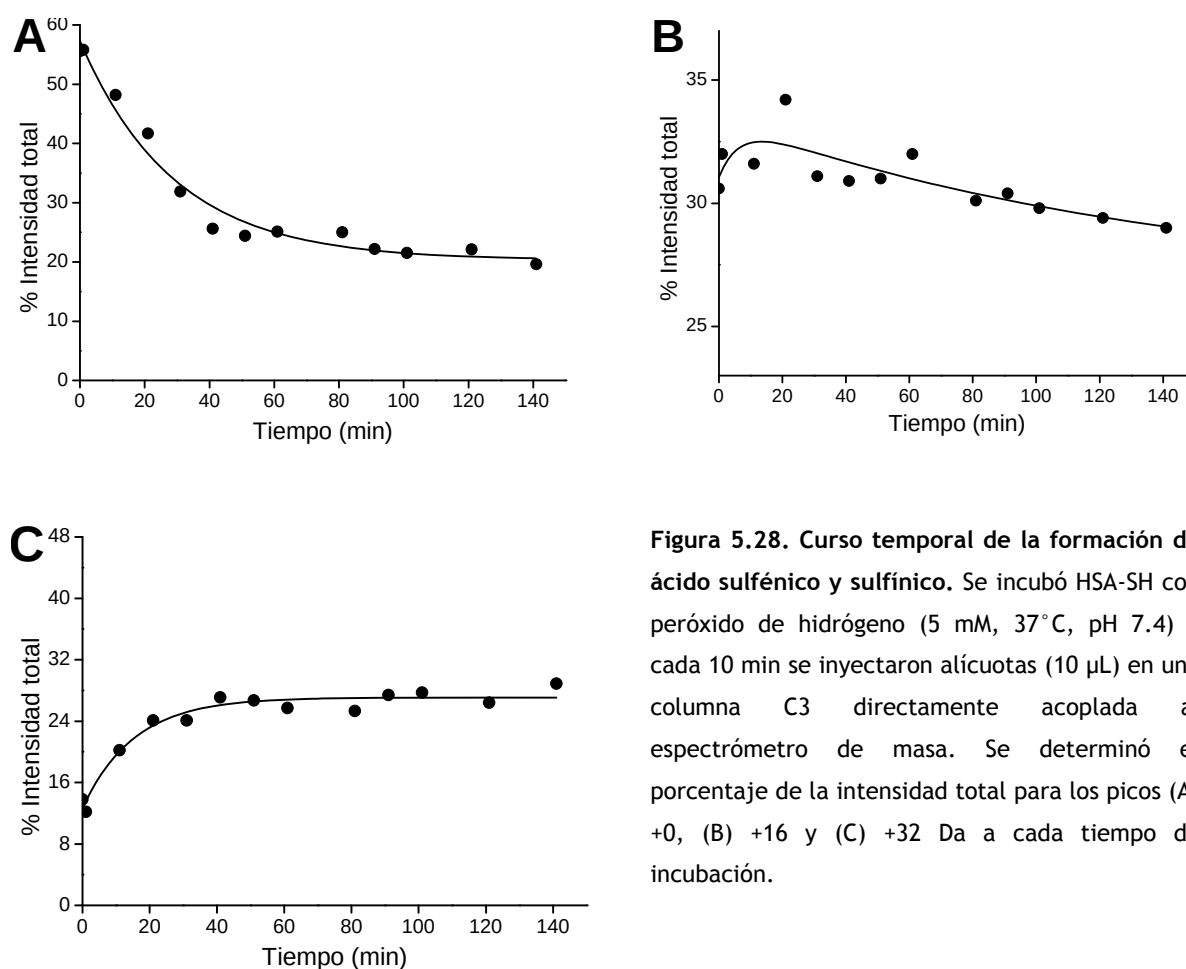


Figura 5.28. Curso temporal de la formación de ácido sulfénico y sulfínico. Se incubó HSA-SH con peróxido de hidrógeno (5 mM, 37°C, pH 7.4) y cada 10 min se inyectaron alícuotas (10 µL) en una columna C3 directamente acoplada al espectrómetro de masa. Se determinó el porcentaje de la intensidad total para los picos (A) +0, (B) +16 y (C) +32 Da a cada tiempo de incubación.

5.7 Clonado, expresión, purificación y obtención de mutantes de HSA recombinante en *Pichia pastoris*

Para continuar profundizando en la caracterización del tiol de la HSA y de su derivado oxidado, el ácido sulfénico, se planteó la necesidad de producir HSA en forma recombinante para así poder generar mutantes en residuos clave. El tiol de la HSA se encuentra próximo a tres aminoácidos con grupos ionizables: hidroxilo de Tyr84, anillo imidazol de His39 y carboxilatos de Asp38 (Figura 2.4). De hecho, la influencia de la Tyr84 e His39 en la reactividad del tiol ya ha sido reportada (92). Por estos motivos, nos propusimos generar mutantes en estos residuos. Por otro lado, con el objetivo de poder estudiar posibles cambios conformacionales que ocurran en la zona del tiol cuando éste se encuentra en distintos estados de oxidación, se planteó generar una HSA mutante

adicionando un Trp como sonda fluorescente de cambio conformacional en la posición 36 (Phe36Trp). Como en esta posición hay una Phe, es de esperar que el cambio por Trp no afecte mayormente las propiedades de la molécula. Para facilitar la interpretación de los resultados se planteó además eliminar el único Trp de la HSA presente en la posición 214, generando un doble mutante (Phe36Trp/Trp214Phe). Además de permitir obtener mutantes, la puesta a punto de este sistema de expresión implica contar con una fuente inagotable de la proteína. Por otro lado, el contar con el sistema de expresión de la proteína permitirá expresar únicamente el dominio I de la proteína, lo que facilitará experimentos de cristalografía de rayos X. Por último, este desarrollo abre las puertas a posibles aplicaciones biotecnológicas.

5.7.1 Clonado del gen de la HSA

En primer lugar se intentó obtener el ADN copia de la HSA a partir de la cepa GS115/albumin de la levadura *Pichia pastoris* (Mut^s, Invitrogen). Esta cepa expresa HSA como control positivo de expresión de proteínas de secreción, por lo que en su genoma cuenta con el ADN copia de la proteína. Para la amplificación se realizó la extracción del ADN y se utilizó la ADN polimerasa Dream Taq (Fermentas) (Figura 5.29). Esta enzima se eligió considerando que el ADN copia de la HSA es una secuencia de tamaño importante (1830 pb) por lo que la enzima a utilizar debía contar con una buena procesividad. Además, esta enzima introduce extremos 3'-dA lo que facilita el clonado posterior. También se ensayó con las ADN polimerasas AccuPrime Taq y Platinum Pfx (Invitrogen) pero no se logró amplificar el ADN copia completo. Los cebadores utilizados fueron HSAEcoRI F y HSAXhoI R (ver anexo).

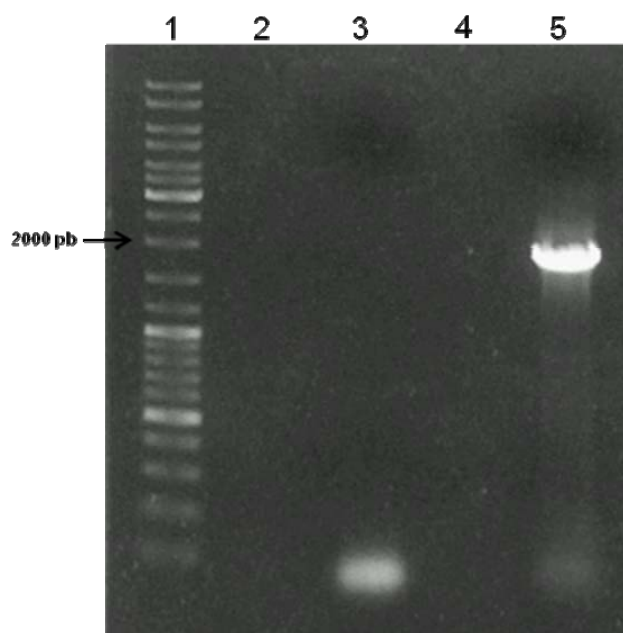


Figura 5.29. Amplificación del ADN copia de HSA. Se utilizó como molde el ADN genómico extraído de la cepa GS115/albumin de *Pichia Pastoris*. Los productos de PCR (10 μ L) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio 0.5 μ g/mL. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 3: blanco; Carril 5: 0.85 μ g ADN genómico.

El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy y posteriormente subclonado en el vector pPICZA. Con este último se transformaron bacterias XL-1 blue quimiocompetentes. Los transformantes se seleccionaron mediante resistencia a Zeocina y se realizó la extracción de ADN plasmídico. La presencia del inserto se verificó mediante electroforesis y se realizó la secuenciación de tres clones. En todos los casos se confirmó la secuencia salvaje del ADN copia de la HSA en marco de lectura. Sin embargo, al comparar con el ADN copia obtenido del ARN mensajero (GenBank NM_000477.3) se observó la presencia de mutaciones, algunas de ellas diferentes en los tres clones evaluados y probablemente introducidas por la propia enzima y otra, presente en los tres clones, que se encontraba en el ADN molde (C>T, posición 644 del ARN mensajero, genera un cambio de alanina por valina en la posición 215 de la preproHSA, o sea en la posición 191 de la HSA madura).

Por este motivo se decidió cambiar el abordaje experimental y se intentó obtener la secuencia salvaje a partir de la retrotranscripción del ARN mensajero que codifica para la HSA presente en un cultivo de células de hepatoma (HepG2). Luego de extraer el ARN total y realizar la retrotranscripción con un cebador específico para la secuencia de la HSA (HSA-R), se amplificó el ADN copia con las ADN polimerasas Dream Taq y U-taq. En ambos casos se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado (1830 pb) (Figura 5.30). Dado que también se observó amplificación de otros fragmentos que no se corresponden con el ADN copia de la HSA fue necesario purificar este último a partir del gel.

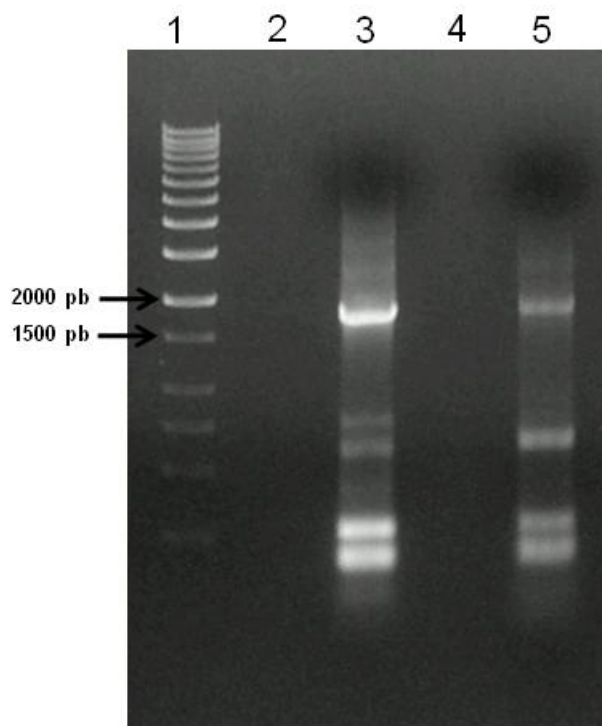


Figura 5.30. Amplificación del ADN copia de HSA. Se realizó una retrotranscripción a partir del ARN total de un cultivo de HepG2 y el ADN copia de la HSA se amplificó utilizando un cebador específico (HSA-R). Los productos de PCR (20 μ L) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio 0.5 μ g/mL. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (12 kb, Stratagene); **Carril 3:** producto de PCR con Dream Taq; **Carril 5:** producto de PCR con U-Taq.

Los ADN copia obtenidos con ambas enzimas fueron secuenciados. En el caso del amplicón obtenido con la Dream Taq polimerasa se observaron tres mutaciones no sinónimas y tres sinónimas. Sin embargo, en el amplicón obtenido con la U-Taq se observaron únicamente tres mutaciones sinónimas. Este último se insertó en el vector pGEM-T Easy y se transformaron bacterias XL-1 blue quimiocompetentes. Los transformantes se seleccionaron mediante resistencia a ampicilina y se realizó la extracción de ADN plasmídico. Uno de los clones evaluados tenía el inserto. Este último fue secuenciado confirmándose que se trataba del ADN copia de la HSA con las tres mutaciones sinónimas vistas antes (pGEM-HSAwt). Por lo tanto, se subclonó este inserto en el vector de expresión pPICZA y nuevamente se transformaron bacterias XL-1 blue quimiocompetentes. De los clones evaluados uno presentó el inserto (Figura 5.31) y se secuenció confirmándose que se trataba del ADN copia de la HSA inserto en marco de lectura. A este vector se le denominó pPICZA-HSAwt.

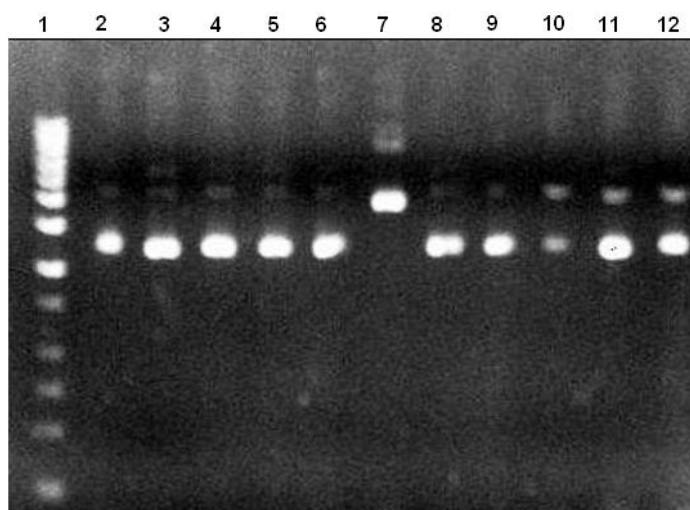


Figura 5.31. Minipreparación de ADN plasmídico. Se ligó el inserto escindido y purificado del vector pGEM-HSAwt con el vector pPICZA, se transformaron células XL-1 blue y se realizó la minipreparación. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (12 kb, Stratagene); **Carril 2:** 1 μ L pPICZA control; **Carriles 3-12:** 1 μ L de las distintas minipreparaciones. La minipreparación 5 (carril 7) tiene inserto.

5.7.2 Mutagénesis

Sobre el vector pPICZA-HSAwt se realizaron las mutaciones sitio dirigidas utilizando los cebadores MutD38f y MutD38r para la mutación D38A, MutH39f y MutH39r para la mutación H39L, MutY84f y MutY84r para la mutación Y84F. En el caso de la doble mutante, primero se llevó a cabo la mutagénesis utilizando los cebadores MutW214f y MutW214r para la mutación W214F y luego, sobre el vector mutado se llevó a cabo la segunda mutagénesis utilizando los cebadores MutF36f y MutF36r para la mutación F36W. En todos los casos la presencia de las mutaciones se confirmó mediante secuenciación.

5.7.3 Transformación con pPICZA-HSAwt y expresión

Se transformó la cepa GS115, His⁻, Mut⁺ de *Pichia pastoris* (Invitrogen) con el vector pPICZA-HSAwt mediante electroporación. En cuatro de las cinco placas (medio YPDS, Zeocina 100 μ g/mL) sembradas se obtuvieron colonias, totalizando 31 colonias transformadas. Cada una de ellas se volvió a plaquear en YPDS con mayor concentración de Zeocina con el objetivo de seleccionar aquellas transformantes con mayor número de copias (Figura 5.32). Prácticamente la totalidad de las colonias crecieron en estas condiciones.

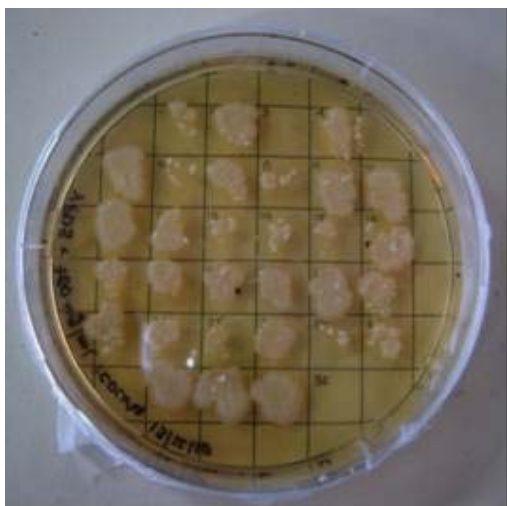


Figura 5.32. Aislamiento de recombinantes multicopia. Las colonias obtenidas luego de la transformación por electroporación (medio YPDS, 100 µg/mL Zeocina) se volvieron a plaquear en YPDS con 700 µg/mL Zeocina con el objetivo de seleccionar los transformantes multicopia.

Para el ensayo de expresión se seleccionaron los mejores cinco clones (mayor crecimiento). La inducción se llevó a cabo durante 96 h adicionando metanol (0.5 %) y tomando una alícuota del medio de cultivo cada 24 h. Una vez culminado el tiempo de inducción se evaluó por SDS-PAGE la presencia de la proteína en los sobrenadantes. Como se ve en la Figura 5.33, todos los clones expresaron una proteína cuyo peso coincide con el de la HSA (66 kDa). La expresión de la proteína comenzó a visualizarse a las 48 h y fue máxima a las 96 h de inducción. Para continuar con los ensayos se seleccionaron los clones 9 y 16 dado que ambos presentan menor cantidad de proteínas contaminantes y una buena expresión de la proteína que se sospechaba era HSA. Para confirmar que se trataba de HSA se enviaron las muestras al Institut Pasteur de Montevideo para ser analizadas por mapeo triptico en el servicio de espectrometría de masa de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas. Dado que la proteína no se encontraba pura se recortó la banda del gel y se realizó un tratamiento con tripsina “en gel”. La mezcla de péptidos se extrajo del gel y se analizó en un espectrómetro de masa 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Las proteínas se identificaron mediante búsqueda en bases de datos locales utilizando el programa MASCOT y los siguientes parámetros de búsqueda: 0.08-0.09 Da de tolerancia en la masa monoisotópica, 0.25 Da de tolerancia en la masa del fragmento, oxidación de metionina como posible modificación y la posibilidad de omitir un sitio de corte. En los dos clones evaluados se identificó de manera estadísticamente significativa a la HSA, obteniéndose scores de 127 y 136 para los clones 9 y 16, respectivamente.

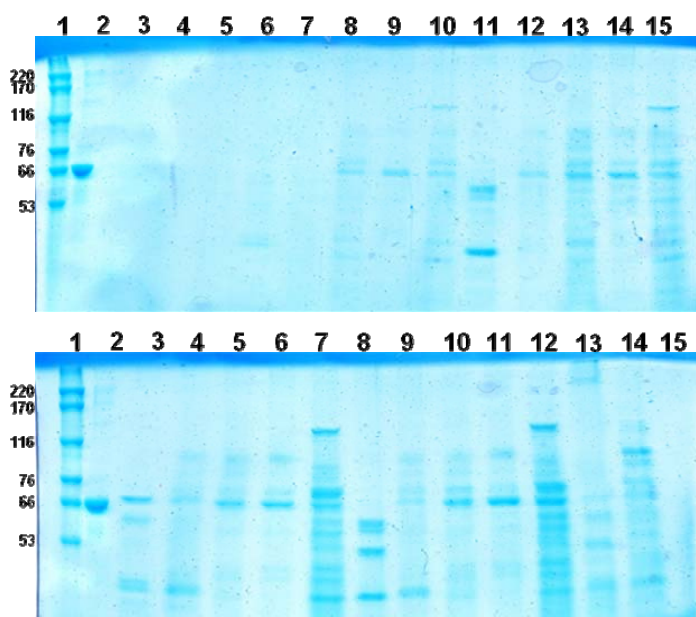


Figura 5.33. Análisis por electroforesis SDS-PAGE de los sobrenadantes de cinco clones de *Pichia pastoris* transformados. Gel A (arriba): Carril 1: Marcador (HMW: 220, 170, 116, 76, 53 kDa); 2: HSA control, 3-7: t = 0, clones 9, 16, 19, 21, 30; 8-12: t = 24, clones 9, 16, 19, 21, 30; 13-15: t = 48, clones 9, 16, 19. Gel B (abajo): Carril 1: Marcador, 2: HSA control; 3-4: t = 48, clones 21, 30; 5-9: t = 72, clones 9, 16, 19, 21, 30; 10-14: t = 96, clones 9, 16, 19, 21, 30.

Luego de varios ensayos de expresión se observó que el número y peso molecular de las proteínas contaminantes presentes en el medio de cultivo era diferente de un ensayo a otro. De hecho, se observó una correlación entre la Abs_{600} que alcanzaba el inóculo en BMGY antes del cambio al medio con metanol y la cantidad de proteínas contaminantes. Esto llevó a pensar que las proteínas contaminantes se debían a la lisis de las levaduras. Por lo tanto, para estandarizar las condiciones se optimizó el inóculo. Se partió siempre de colonias aisladas en placas de YPD. Se inocularon 5 mL de YPD y se incubaron por 7-8 hs en agitación a 30 °C. Como parte de la puesta a punto del sistema determinamos que en el medio BMGY, a 28-30 °C y con agitación a 185 rpm el tiempo de duplicación de la levadura es de 2.5 h. Por lo tanto, se calculó que la Abs_{600} de partida del medio BMGY debe ser de 0.031 (inoculado a partir del medio YPD), de manera que luego de ~17-18 h de incubación, el medio presente una Abs_{600} de 2-6.

5.7.4 Purificación

Esta etapa del trabajo se llevó a cabo junto a Rodrigo Lombide, en el marco de su trabajo de fin de carrera de la Licenciatura en Bioquímica.

Precipitación con sulfato de amonio. Como primer abordaje, basados en los trabajos reportados de purificación de HSA recombinante (152), se intentó purificar la proteína

mediante precipitación con sulfato de amonio en dos etapas, una primera etapa alcanzando un 40 % de saturación y una segunda etapa alcanzando un 60 % de saturación de sulfato de amonio (Figura 5.34). Era de esperar que la HSA precipitara en la segunda etapa mientras que las proteínas contaminantes lo hicieran en la primera precipitación. Si bien se logró eliminar algunas proteínas contaminantes en la primera etapa, el precipitado de la segunda mostró otras proteínas además de la HSA. Si bien la purificación alcanzada no justifica mantener la primera precipitación, sí se mantuvo la precipitación a 60 % de saturación de sulfato de amonio, para poder separar las proteínas del resto de los componentes del medio de cultivo.

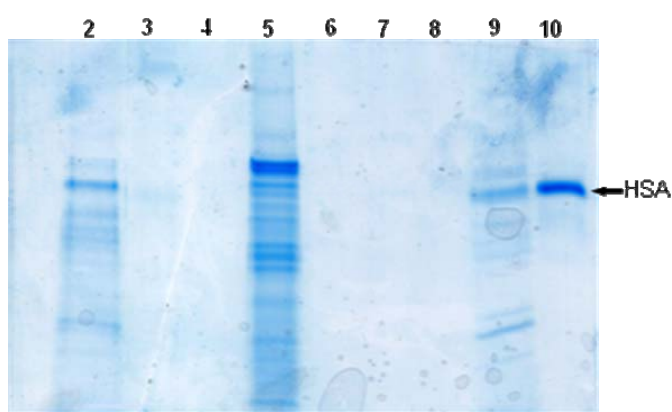


Figura 5.34. Purificación de HSA mediante precipitación con sulfato de amonio. Luego de las 96 h de inducción con metanol, se aisló el sobrenadante del medio de cultivo y se ensayó una precipitación en dos etapas con sulfato de amonio a 40 y 60 % de saturación respectivamente. **Carril 2:** sobrenadante del medio de cultivo $t = 96$ h de inducción; **3:** sobrenadante de la precipitación a 40 % de saturación de sulfato de amonio; **5:** precipitado (40 % saturación); **7:** sobrenadante de la precipitación a 60 % de saturación de sulfato de amonio; **9:** precipitado (60 % saturación); **10:** HSA control.

Cromatografía de intercambio iónico. Como segundo abordaje experimental, intentamos purificar la HSA por cromatografía de intercambio aniónico (Figura 5.35, panel A). El punto isoeléctrico de la HSA es relativamente bajo (pI 4.7 - 5.8), presentando 19 cargas negativas a pH neutro. La adsorción se realizó a pH neutro y baja fuerza iónica y la elución se realizó con un gradiente de NaCl 1 M. Como se observa en la Figura 5.35, panel B, la HSA coeluyó con otras proteínas por lo que tampoco fue posible purificarla por este método. Si bien es posible ajustar las condiciones de la cromatografía, decidimos probar con un tercer método, cromatografía de afinidad, reportado en la literatura (144, 152).

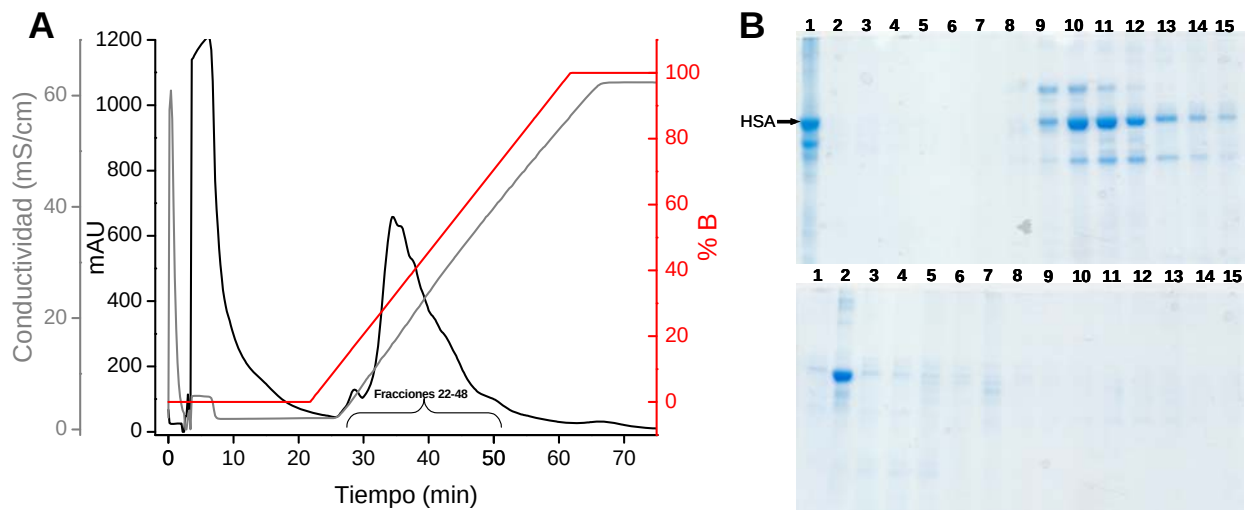


Figura 5.35. Purificación de HSA por cromatografía de intercambio iónico. (A) El sobrenadante de la expresión a $t = 96$ h de inducción se precipitó con sulfato de amonio (60 %) y se resuspendió en amortiguador Tris 20 mM, pH 7. La muestra se sembró en la columna previamente equilibrada con el mismo amortiguador. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de 0 a 100 % de amortiguador Tris 20 mM, pH 7, 1 M NaCl en 40 min a un flujo de 5 mL/min. (B) El resultado de la cromatografía se evaluó por electroforesis SDS-PAGE. **Arriba:** Carril 1: HSA control; 2: fracción no unida; 3-15: fracciones 22 a 34; **Abajo:** Carril 1: fracción 35; 2: HSA control; 3-15: fracciones 36 a 48.

Cromatografía de afinidad. Para la cromatografía de afinidad utilizamos la resina Blue Sepharose, la cual se encuentra derivatizada con grupos Cibacron blue F3GA que interaccionan, al igual que la bilirrubina, con el sitio I de Sudlow de la HSA (61). Como se observa en la Figura 5.36, la mayor parte de la HSA eluyó, sin llegar a unirse a la columna, junto a la fracción no unida y solo una pequeña fracción se unió a la columna. Sin embargo, cuando realizamos la misma cromatografía con HSA comercial (Sigma, Fracción V), ésta sí se unió a la columna y eluyó al aumentar la fuerza iónica (Figura 5.37).

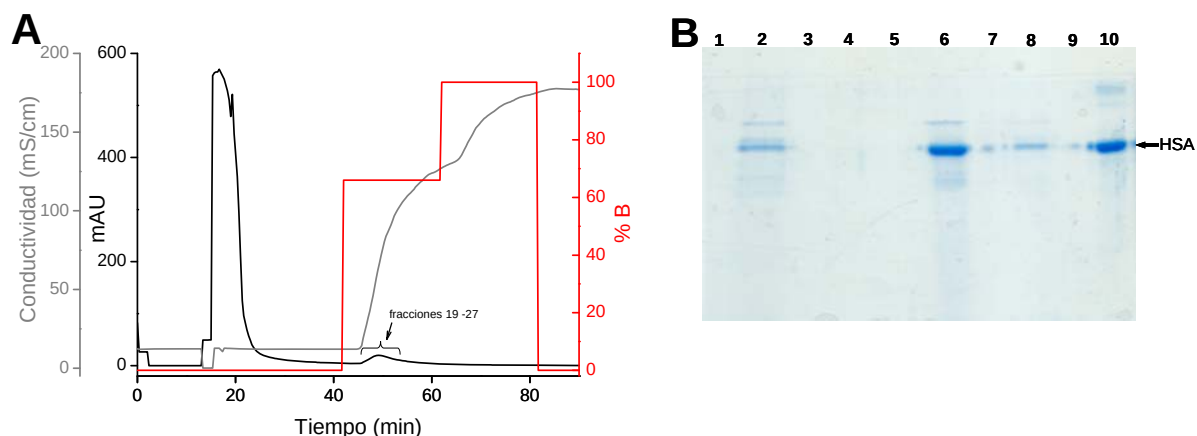


Figura 3.36. Purificación de HSA por cromatografía de afinidad. (A) El sobrenadante de la expresión a $t = 96$ h de inducción se precipitó con sulfato de amonio (60 % de saturación), se resuspendió en agua destilada y se dializó 48 hs contra agua y 24 h contra amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.2. La muestra se sembró en la columna previamente equilibrada con el mismo amortiguador. La elución se llevó a cabo mediante un salto a 60 % de amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.2, 3 M NaCl, 3 mL/min (B) El resultado de la cromatografía se evaluó por electroforesis SDS-PAGE: Carril 2: sobrenadante del medio de cultivo a $t = 96$ h; 4: sobrenadante precipitación 60 % de saturación de sulfato de amonio; 6: Fracciones 19-27 concentradas; 8: fracción no unida; 10: HSA control.

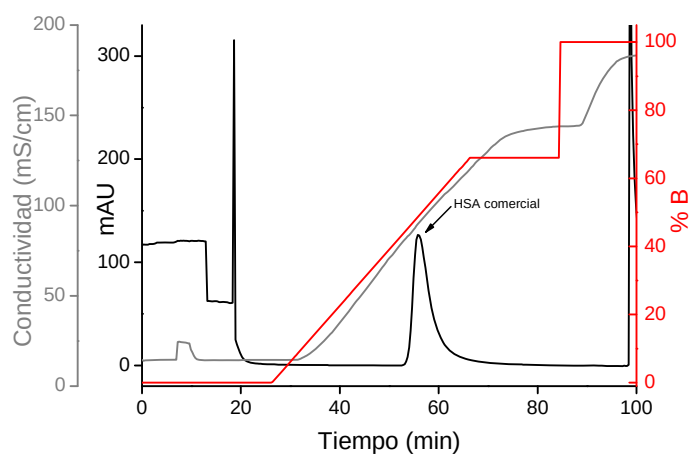


Figura 5.37. Cromatografía de afinidad de HSA comercial. Se inyectaron 20 mg de HSA comercial (Sigma, Fracción V) y se realizó la cromatografía como en la figura anterior.

El hecho que la HSA recombinante no se uniera de la forma esperada a la resina de afinidad nos llevó a plantearnos varias hipótesis:

a. La HSA recombinante tiene moléculas de bajo peso molecular fuertemente unidas que evitan la interacción del sitio I con la resina. Esta hipótesis resulta poco probable dado que la muestra de dializó por 72 h. Sin embargo, para descartarla completamente llevamos a cabo la técnica de deslipidación que habitualmente realizamos con la HSA comercial utilizando carbón activado y que permite la eliminación de moléculas hidrofóbicas que estén unidas no covalentemente. Aún luego de este procedimiento, la HSA siguió sin unirse a la resina (datos no mostrados). Por otro lado, realizamos un cultivo en las mismas condiciones que para la expresión de la HSA recombinante pero con la cepa GS115 sin transformar y agregamos HSA comercial (Sigma) cada 24 h. En este caso, la HSA se unió a la resina, por lo tanto descartamos que se trate de algún componente del medio de cultivo que se una a la proteína fuertemente y evite la interacción con la columna (datos no mostrados).

b. Plegamiento incorrecto de la HSA recombinante. Esta hipótesis parece poco probable dado que la proteína ha demostrado ser estable en solución y aún en condiciones de bajo pH (durante la deslipidación con carbón activado).

c. Procesamiento incorrecto del prepro péptido. Cuando es sintetizada *in vivo* en el hígado, la HSA presenta en su secuencia primaria un prepro péptido. El prepro péptido se corresponde con el péptido señal y debería ser escindido sin problemas por la levadura. Sin embargo, el pro péptido, secuencia de seis aminoácidos de función desconocida, podría no estar siendo correctamente procesado y por lo tanto podría estar presente en la HSA secretada. Datos publicados sugieren que el pro péptido no estaría presente en construcciones para la producción de HSA recombinante. Detectar este péptido por espectrometría de masa (previa digestión de la proteína) resulta difícil debido a que es muy pequeño. De hecho, no se observó en los análisis realizados en el Instituto Pasteur de Montevideo. Como una primera aproximación para probar esta hipótesis intentamos realizar una tripsinización controlada de la HSA recombinante, pero la misma no resultó exitosa. En este momento estamos intentando eliminar el pro péptido de la secuencia codificante y a la brevedad realizaremos una nueva transformación de la levadura y posterior ensayo de expresión de la proteína.

En suma, se logro clonar y expresar la HSA y elaborar las construcciones para la producción de mutantes. En este momento estamos trabajando en la purificación de la proteína.

5.8 Análisis comparativo de la reactividad del tiol de la HSA con la de tioles de bajo peso molecular

Si consideramos la reactividad del tiol de la HSA con peróxido de hidrógeno ($2.3 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 37 °C, pH 7.4) vemos que la constante obtenida es similar a las observadas con tioles de bajo peso molecular tales como cisteína y glutatión, las cuales son 2.9 y $0.87 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37 °C, respectivamente. Sin embargo, si se consideran las constantes de reacción independientes de pH, cuando todo el tiol se encuentra en la forma de tiolato (RS^-), se obtiene que tiolatos de bajo peso molecular con pK_a entre 7.9 y 9.5 reaccionan con peróxido de hidrógeno con constantes de $18\text{-}26 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (187), mientras que el tiolato de la HSA (HSA-S^-) lo hace con una constante cuatro veces menor ($5.3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (93). Algo parecido ocurre con el peroxinitrito, dado que el tiol de la HSA reacciona con éste con una constante de $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4 y 37 °C) (101) y la cisteína y el glutatión lo hacen con constantes de 5.9×10^3 y $1.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (102, 188). Si se consideran las constantes independientes del pH vemos que el tiolato de la HSA reacciona con una constante $7.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que los tioles de bajo peso molecular con pK_a s comparables lo hacen con constantes que varían entre 1.3×10^5 y $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (189). Las diferencias son más importantes cuando se considera la reacción con una molécula más grande y cargada. El tiol de la HSA reacciona con DTNB con una constante independiente del pH de $40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (93) mientras que tioles de bajo peso molecular con pK_a entre 7.3 y 8.6 lo hacen con constantes independientes del pH de $3\text{-}15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (190, 191), lo que implica un incremento de tres órdenes de magnitud. Este análisis refleja el hecho de que la reactividad del tiol de la HSA está restringida por el entorno proteico y sometida a un cierto impedimento estérico. Las restricciones a la reactividad de HSA-SH también se pusieron de manifiesto cuando se evaluó la reactividad en ausencia y presencia de ácidos grasos. En presencia de estos últimos el tiol aumenta su reactividad, además de por los cambios en el pK_a , por una disminución en el impedimento estérico que permite una mejor alineación de los reactivos (93).

5.9 Análisis crítico del rol de la HSA como atrapadora de especies reactivas en el espacio intravascular

Para evaluar el rol de la HSA como atrapadora de especies reactivas en un contexto biológico y evaluar que ocurriría en el espacio intravascular es necesario tener en cuenta la naturaleza del oxidante, la concentración y reactividad de otras moléculas competidoras, fenómenos de difusión y de compartimentalización. En primer lugar se ejemplificarán estas consideraciones para el peróxido de hidrógeno como oxidante.

Como se mencionó antes el plasma es un compartimento pobre en defensas antioxidantes. En el caso del peróxido de hidrógeno los tioles de bajo peso molecular no representan un blanco relevante dadas las bajas constantes de reacción ($\sim 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y las bajas concentraciones de las formas reducidas (15-20 μM en total) (Tabla 2.2). Un blanco posible es la glutatión peroxidasa 3 (Gpx3) la cual se encuentra a una concentración de 0.5-0.8 μM (126). Sin embargo, se ignora si se encuentra activa en plasma dado que la concentración de sus sustratos reductores es baja, siendo la concentración de tioredoxina ~ 0.07 -1 nM (130) y la de glutatión 6.2-7.3 μM (80, 81). Si se considera que toda la enzima está activa y que reacciona con el peróxido de hidrógeno con una constante de $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (124) se puede calcular un producto de constante por concentración de 144 s^{-1} . En el caso de la HSA, el correspondiente producto es de $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En base a estos cálculos se puede concluir que la Gpx3 sería una buena competidora, pero solo si se encontrara reducida. De ser así, se puede determinar que la vida media de una molécula de peróxido de hidrógeno en el plasma sería de $4.8 \times 10^{-3} \text{ s}$ ($\ln 2/k$).

En un cálculo sencillo, utilizando la ecuación de Einstein para el desplazamiento medio cuadrático de una partícula (Ec. 5.16):

$$x^2 = 2Dt \tag{5.16}$$

donde x es la distancia recorrida, D el coeficiente de difusión y t el tiempo de vida medio, se puede estimar qué distancia recorrerá la molécula. Considerando una constante de difusión típica de $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, se obtiene que sería capaz de recorrer una distancia de 3 μm . Si no se considera la Gpx3, entonces la vida media del peróxido de hidrógeno será de 693 s y la distancia que podrá recorrer antes de reaccionar será de $\sim 1200 \mu\text{m}$.

Cuando en este esquema se incluyen los eritrocitos el análisis gana complejidad

dado que se deben tener en cuenta además fenómenos de difusión y transporte a través de membranas. La distancia que separa un eritrocito de otro es de $\sim 3 \mu\text{m}$ (192), por lo que en el caso del peróxido de hidrógeno, antes de que pueda reaccionar se encontrará con un eritrocito. Una vez que esto ocurra, podrá difundir a través de la membrana en forma comparable al agua y una vez dentro será rápidamente consumido por la peroxirredoxina 2 (Prx2) que se encuentra a una concentración de $240 \mu\text{M}$ y reacciona con el peróxido de hidrógeno con una constante de 1.0×10^8 (136). Este análisis muestra que la HSA no sería un blanco importante para el peróxido de hidrógeno en el compartimento intravascular. No obstante, la utilización de este oxidante en el laboratorio resultó muy útil para formar HSA-SOH.

En el caso del peroxinitrito, su blanco principal en plasma será el dióxido de carbono (CO_2). Esta reacción ocurre con una constante de $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37°C , pH 7.4) (193) y la concentración de dióxido de carbono es de 1.3 mM , por lo que el producto de constante por concentración será de 60 s^{-1} . Otros blancos cuantitativamente menos importantes serán la HSA ($3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (101)) y la Gpx3 ($8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (125)), que en conjunto, presentan un producto de constante por concentración de 7.5 s^{-1} . En este caso, el tiempo de vida media de una molécula de peroxinitrito será de $1.03 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, pudiendo difundir $4.54 \mu\text{m}$ antes de reaccionar, por lo que también se encontrará con un eritrocito. Para aquellas moléculas que encuentren un eritrocito, la membrana representará una barrera importante dado que, a pH 7.4, el 80 % del peroxinitrito se encontrará en forma aniónica. En el trabajo de Romero *et al.* (194), se mostró que aproximadamente el 40 % del peroxinitrito formado tiene al eritrocito como blanco. Una vez dentro, los blancos principales serán la peroxirredoxina 2 y la oxihemoglobina (195).

Como se mencionó antes, el blanco principal del peroxinitrito será el dióxido de carbono. Esta reacción da lugar a la formación de los radicales dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y carbonato radical ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) en un 35 %. Estos dos radicales son especies reactivas que podrán reaccionar con diferentes blancos. El dióxido de nitrógeno puede reaccionar con ascorbato ($30\text{-}150 \mu\text{M}$) y urato ($160\text{-}450 \mu\text{M}$) (121) con constantes del orden de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por otro lado, reacciona con tirosina y triptofano con constantes del orden de $10^5\text{-}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y con cisteínas con constantes del orden de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (196). Por lo tanto dada la alta concentración de HSA en plasma, y su multiplicidad de residuos blanco, es posible concluir que ésta será el blanco preferencial para este radical. A su vez, dado que reacciona con cisteína dos órdenes de magnitud más rápido que con otros aminoácidos, se puede concluir

que dentro de la HSA, la Cys34 será el blanco preferente. Con el carbonato radical ocurre algo similar. Esta especie reacciona con Trp, Tyr y Cys con constantes del orden de 10^7 - 10^8 $M^{-1} s^{-1}$ (196). De hecho se ha determinado la constantes entre este radical y la albúmina sérica bovina (BSA) obteniéndose un valor de $(5.8 \pm 0.2) \times 10^8$ $M^{-1} s^{-1}$ (197) lo que la reafirma como el blanco preferente. Además, el carbonato radical presenta carga negativa por lo que no atravesará las membranas fácilmente.

Lo expresado hasta ahora quedó en evidencia en un experimento realizado por Horacio Botti, donde se evaluó cromatográficamente el estado de oxidación de la HSA en plasma y en sangre cuando ésta es expuesta a peróxido de hidrógeno o peroxinitrito. En el caso del peróxido de hidrógeno, los eritrocitos inhibieron en forma casi total la oxidación de la HSA, pero en el caso del peroxinitrito inhibieron solo en un ~27 %, probablemente debido a la reacción de la proteína con carbonato radical y dióxido de nitrógeno (91).

Otras especies oxidantes secundarias de difusión limitada formadas a nivel de lípidos y proteínas, tales como hidroperóxidos (ROOH) y radicales peroxilo (ROO $\cdot$), podrían ser también relevantes en lo que respecta a la oxidación del tiol de la HSA. Sin embargo, existe muy poca literatura en relación a estas especies. La reactividad de estas moléculas con la Cys34, en caso de que sean voluminosas, se verá afectada por la unión de ácidos grasos a la HSA (93). Por último, no se debe olvidar que el 60 % de la HSA se encuentra en el espacio extravascular, fundamentalmente en piel y músculo. Es probable que en estos compartimentos la HSA cumpla un rol importante como atrapadora de especies reactivas.

Más allá de estas consideraciones, el rol atrapador de la HSA se pone de manifiesto por la identificación de formas oxidadas *in vivo* y su aumento en diferentes condiciones patológicas (Tabla 2.1).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo se centró en la caracterización del ácido sulfénico formado en la albúmina sérica humana cuando ésta es expuesta a peróxido de hidrógeno.

En primer lugar se desarrolló una técnica basada en la reacción con TNB que permitió, por primera vez, obtener datos cuantitativos sobre la formación de HSA-SOH. Utilizando esta técnica se calculó un rendimiento de ácido sulfénico de 0.18 ± 0.2 , siendo 0.20 ± 0.04 HSA-SOH/HSA el mayor rendimiento obtenido experimentalmente. Considerando todas las constantes determinadas hasta ahora fue posible realizar una simulación del proceso para determinar cuál es el rendimiento máximo de HSA-SOH esperado. A partir de la misma se determinó que deberían formarse 0.38 moles de HSA-SOH por mol de HSA. Esta discrepancia, deja en evidencia que las propiedades del tiol y sus derivados, en una proteína como la HSA, son complejas. Una posible explicación para esta diferencia puede ser la existencia de diferentes poblaciones de HSA-SH con diferente reactividad frente a oxidantes. En este sentido, se ha reportado que el tiol de la HSA se encuentra en equilibrio entre una forma expuesta y una forma enterrada (96, 97). Para confirmar esto resultará muy útil la variante de HSA recombinante con un Trp próximo al tiol (W214F/F36W). Este nuevo triptofano podrá ser utilizado como sonda conformacional siguiendo los cambios en su fluorescencia cuando el tiol es oxidado.

Por otro lado, la técnica del TNB permitió determinar constantes de reacción entre moléculas de interés biológico y analítico y HSA-SOH. En cuanto a las moléculas de interés analítico se determinó que tanto la dimedona como el arsenito pueden ser utilizadas como sondas para atrapar HSA-SOH lo que nos permitirá diseñar estrategias para atrapar HSA-SOH formado *in vivo*. En este sentido, en el contexto de esta tesis se realizó un ensayo preliminar donde se adicionó dimedona a muestras de sangre frescas considerando las constantes determinadas en este trabajo. Luego se separó el plasma, el cual se tripsinizó y se analizó por espectrometría de masa. Si bien en este primer intento no se detectó el péptido de la Cys34 derivatizado con dimedona, los resultados obtenidos abren la puerta a la utilización de dimedonas fluorescentes o biotiniladas e incluso anticuerpos anti dimedona.

La determinación de las constantes de reacción con moléculas de interés biológico permitió comprender que el HSA-SOH puede tener tres destinos. En primer lugar puede reaccionar con una segunda molécula de oxidante formándose HSA-SO₂H y/o HSA-SO₃H. En segundo lugar puede decaer dando lugar a la formación de una nueva especie denominada en este trabajo HSA-SX. Por último, puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular presentes en plasma tales como cisteína, cisteinilglicina, homocisteína y glutatión. Teniendo en cuenta las constantes determinadas y las concentraciones plasmáticas, se puede concluir que la vía de reacción más probable para el HSA-SOH es la reacción con tioles de bajo peso molecular, fundamentalmente cisteína. Por otro lado, si se consideran las constantes de reacción determinadas con los tioles de bajo peso molecular y la concentración de la forma reducida de estos últimos en plasma, es posible sugerir un rol de HSA-SOH en la formación de disulfuros mixtos en plasma. Por otro lado, se aportó información mecanística a la reacción entre tioles de bajo peso molecular y HSA-SOH determinándose que ocurre por un mecanismo SN₂ lo que implica un ataque nucleofílico del tiolato sobre el HSA-SOH.

El HSA-SOH resultó ser relativamente estable en solución. Los factores que contribuyen a la estabilidad de un ácido sulfénico son variados, pero en el caso de la HSA resulta crítica la ausencia de otros tioles cercanos. Por otro lado, el hecho de que el azufre de la Cys34 se encuentre en una hendidura, determina que esté impedido estéricamente de reaccionar con la Cys34 de otra HSA. Por ejemplo, en el caso de las peroxirredoxinas de dos cisteínas, el ácido sulfénico formado en la cisteína peroxidática como parte del mecanismo catalítico rápidamente reacciona con la cisteína resolutiva que puede encontrarse en la misma subunidad o en otra dando lugar la formación de dímeros intra o intermoleculares, respectivamente. Esta inestabilidad hace difícil el estudio del ácido sulfénico intermediario, siendo únicamente posible si se generan mutantes donde se elimina la cisteína resolutiva. En este sentido, debido a su estabilidad, el HSA-SOH resulta un buen modelo para caracterizar las propiedades de los ácidos sulfénicos en proteínas.

De acuerdo a las constantes determinadas en este trabajo se puede concluir que las dos vías principales de reacción de un HSA-SOH formado *in vivo* serán el decaimiento espontáneo y la reacción con tioles de bajo peso molecular. A partir del producto de las constante por la concentración para las distintas reacciones es posible calcular una constante neta de $2.05 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, lo que implica una vida media para un HSA-SOH formado

in vivo de 5.6 min.

La aplicación de la técnica del TNB tanto en HSA como en AhpE mostró la importancia de tener en cuenta aspectos cinéticos a fines de extraer conclusiones respecto a la formación y reactividad del ácido sulfénico.

La técnica de cromatoenfoque diseñada por Horacio Botti y Lucía Bonilla y utilizada en este trabajo permitió purificar las distintas isoformas de la HSA en relación al estado de oxidación del tiol. Los análisis de espectrometría de masa de la proteína entera realizados para cada fracción permitieron validar el método. Dado que es posible separar y cuantificar todas las isoformas de la HSA, próximamente se completarán experimentos cinéticos con el objetivo de confirmar algunas de las constantes determinadas en este trabajo. Por otro lado, utilizando este método fue posible analizar el nivel de oxidación de HSA comerciales para uso en humanos concluyéndose que existen diferencias sustanciales en el nivel de oxidación de la Cys34 entre distintos fabricantes. Esto abre la puerta al desarrollo de nuevos métodos para el control de calidad de estas preparaciones farmacéuticas. Por último, esta técnica permitió analizar muestras de plasma en forma directa sin necesidad de purificar la proteína. Esto permitirá analizar el nivel de oxidación de la HSA en muestras clínicas de diversas patologías y condiciones donde exista estrés oxidativo.

El contar con las isoformas de la HSA en forma pura permitió la realización de experimentos de masa con la proteína entera. En primer lugar permitió caracterizar parcialmente a la forma HSA-SX. Esta especie tiene una masa similar a la de HSA-SH, pero no se alquila salvo que sea previamente reducida. Esto, que también se confirmó con la proteína tripsinizada, sugiere que se trata de HSA-SNHR. Si bien se intentó identificar el grupo con el que reaccionaría el HSA-SOH para dar lugar a esta especie, no fue posible obtener resultados concluyentes.

Por otro lado, mediante espectrometría de masa fue posible evaluar la cinética de reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno, observándose por primera vez el HSA-SOH en forma directa (+16 Da). Los análisis cinéticos de los picos +0, +16 y +32 Da arrojaron perfiles que coincidieron con lo visto antes y son consistentes desde el punto de vista cinético.

En cuanto a la producción de HSA recombinante en *Pichia pastoris*, en primer lugar, se clonó el ADN copia salvaje de la HSA (pPICZA-HSAwt). Por mutagénesis sitio dirigida se obtuvieron los siguientes vectores pPICZA-HSA W214F/F36W, pPICZA-HSA Y84F, pPICZA-HSA H39L y pPICZA-HSA D38A. En segundo lugar, fue posible obtener levaduras transformadas con el vector pPICZA-HSAwt capaces de expresar la proteína y secretarla al medio de cultivo. Actualmente estamos trabajando en la purificación de la proteína y próximamente se transformará la levadura con los vectores obtenidos por mutagénesis sitio dirigida. Sin duda este desarrollo aportará a la línea de investigación dado que no solo representa una fuente ilimitada de proteína, sino que también abre la puerta al desarrollo de diferentes mutantes y HSA trunca. Por ejemplo, a la brevedad se intentará obtener únicamente el dominio I de la proteína (donde se encuentra la Cys34) con el objetivo de facilitar la obtención de cristales que permitan el análisis de las formas oxidadas de la HSA por cristalografía de rayos X.

Del análisis cinético realizado en este trabajo se desprende la importancia de tener en cuenta factores de constante y concentración, así como aspectos difusionales y de compartimentalización a fines de comprender el rol de la HSA como atrapadora de especies reactivas en el contexto intravascular. Estas observaciones nos permiten concluir que la HSA no constituye un blanco importante para peróxido de hidrógeno o peroxinitrito. Sin embargo, sí es el blanco preferente de las especies derivadas de la reacción del peroxinitrito con dióxido de carbono, el dióxido de nitrógeno y el carbonato radical. Esto pone de manifiesto la importancia de profundizar en el estudio de estas vías radicalares de oxidación del tiol. Por otro lado surge la necesidad de realizar experimentos en presencia de eritrocitos y de explorar el efecto de especies oxidantes secundarias. Por último, resulta importante estudiar el rol antioxidante de la HSA en el contexto extravascular donde se encuentra el 60 % de la proteína. Más allá de estos aspectos, la prueba más irrefutable de que la HSA puede actuar como atrapador de especies reactivas *in vivo* la constituye la presencia de formas oxidadas en la circulación, las cuales se incrementan en diferentes patologías y condiciones de estrés oxidativo elevadas.

Esta tesis dio origen a las siguientes publicaciones en revistas arbitradas:

1. María José Torres, Lucía Turell, Horacio Botti, Laura Antmann, Sebastián Carballal, Gerardo Ferrer-Sueta, Rafael Radi, Beatriz Alvarez. 2012. Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. Archives of Biochemistry and Biophysics. En prensa.
2. Martín Hugo, Lucía Turell, Bruno Manta, Horacio Botti, Gisele Monteiro, Luis E. S. Netto, Beatriz Alvarez, Rafael Radi, Madia Trujillo. 2009. Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants and conformational dynamics. Biochemistry 13;48(40):9416-26.
3. Lucía Turell, Horacio Botti, Sebastián Carballal, Gerardo Ferrer-Sueta, José M. Souza, Rosario Durán, Bruce Freeman, Rafael Radi, Beatriz Alvarez. 2008. Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. Biochemistry 8;47(1): 359-367.

Durante el desarrollo de la tesis se publicaron los siguientes trabajos de revisión y capítulos de libros:

1. Beatriz Alvarez, Sebastián Carballal, Lucía Turell, Rafael Radi. 2010. Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin. Methods in Enzimology, 473:117-36.
2. Lucía Turell, Horacio Botti, Rafael Radi, Beatriz Alvarez. 2009. Sulfenic acid - A key intermediate in albumin thiol oxidation. Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 5;877(28):3384-92.
3. Lucía Turell, Sebastián Carballal, Horacio Botti, Rafael Radi, Beatriz Alvarez. 2009. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 42(4): 305-311. }
4. Sebastián Carballal, Beatriz Alvarez, Lucía Turell, Horacio Botti, Bruce Freeman, Rafael Radi. 2007. Sulfenic acid in human serum albumin. Amino Acids 32(4): 543-551.

Los siguientes trabajos se encuentran en preparación:

1. Chromatographic analysis of thiol redox isoforms of human serum albumin based on

isoelectric point differences.

2. Further characterization of sulfenic acid in human serum albumin: spontaneous decay, oxidation to sulfinic acid and reaction with thiols to form disulfides

Durante esta tesis se ejecutó el siguiente proyecto:

PR_FCE_2009_1988, Modalidad 3, “El tior de la albúmina humana y su oxidación: producción y caracterización de mutantes en residuos clave” (Noviembre 2010 a la fecha). Responsable Lic. Lucía Turell. Financiado por ANII.

En el contexto de esta tesis se orientaron las siguientes tesinas:

1. Trabajo final de carrera de la Licenciatura en Bioquímica del Bach. Rodrigo Lombide, coorientadora Dra. Beatriz Alvarez (Junio 2011 a la fecha).

2. Trabajo final de carrera de la Licenciatura en Bioquímica de la Bach. María José Torres “Efecto de los ácidos grasos en las propiedades del tior de la albúmina y su derivado sulfénico”, orientadora Dra. Beatriz Alvarez, coorientadora Lic. Lucía Turell (finalizado diciembre 2010).

7. REFERENCIAS

1. Halliwell, B. (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Science Publications
2. Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4, 278-286
3. Sies, H. (1985) *Oxidative Stress*, London: Academic Press
4. Hansen, J. M., Go, Y. M., and Jones, D. P. (2006) Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 215-234
5. Paulsen, C. E., and Carroll, K. S. (2010) Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol* 5, 47-62
6. Keire, D., Strauss, E., Guo, W., Noszal, B., and Rabenstein, D. (1992) Kinetics and equilibria of thiol/disulfide interchange reactions of selected biological thiols and related molecules with oxidized glutathione. *J Org Chem* 95, 123-127
7. Banerjee, R. (2008) *Redox biochemistry*, Wiley-Interscience
8. Winterbourn, C. C. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic Biol Med* 14, 85-90
9. Koppenol, W. H. (1993) A thermodynamic appraisal of the radical sink hypothesis. *Free Radic Biol Med* 14, 91-94
10. Wardman, P. (1998) Evaluation of the "radical sink" hypothesis from a chemical-kinetic viewpoint. *J. Radianal. Nucl. Chem.* 232, 23-27
11. Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J* 322 (Pt 1), 167-173
12. Giles, G. I., and Jacob, C. (2002) Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 383, 375-388
13. Bonini, M. G., and Augusto, O. (2001) Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J Biol Chem* 276, 9749-9754
14. Carballal, S., Alvarez, B., Turell, L., Botti, H., Freeman, B. A., and Radi, R. (2007) Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* 32, 543-551
15. Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., and Loscalzo, J. (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci*

16. van der Vliet, A., Hoen, P. A., Wong, P. S., Bast, A., and Cross, C. E. (1998) Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 273, 30255-30262
17. Wink, D. A., Nims, R. W., Darbyshire, J. F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G. W., Laval, F., Laval, J., Cook, J. A., Krishna, M. C., and et al. (1994) Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 7, 519-525
18. Lopez-Sanchez, L. M., Muntane, J., de la Mata, M., and Rodriguez-Ariza, A. (2009) Unraveling the S-nitrosoproteome: tools and strategies. *Proteomics* 9, 808-818
19. Poole, L. B., Karplus, P. A., and Claiborne, A. (2004) Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 325-347
20. Torchinsky, Y. M. (1981) *Sulfur in proteins*, Pergamon Press, Oxford
21. Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V., and Chumakov, P. M. (2004) Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304, 596-600
22. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984
23. Allison, W. S., Benitez, L. V., and Johnson, C. L. (1973) The formation of a protein sulfenamide during the inactivation of the acyl phosphatase activity of oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by benzylamine. *Biochem Biophys Res Commun* 52, 1403-1409
24. van Montfort, R. L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., and Jhoti, H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423, 773-777
25. Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K., and Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423, 769-773
26. Nakamura, T., Yamamoto, T., Abe, M., Matsumura, H., Hagihara, Y., Goto, T., Yamaguchi, T., and Inoue, T. (2008) Oxidation of archaeal peroxiredoxin involves a hypervalent sulfur intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6238-6242
27. Claiborne, A., Mallett, T. C., Yeh, J. I., Luba, J., and Parsonage, D. (2001) Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv Protein Chem* 58, 215-276
28. Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., and Ross, R. P. (1993) Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *Faseb J* 7, 1483-

29. Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell Biochem* 44, 61-81
30. Wood, Z. A. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32-40
31. Toppo, S., Flohe, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1486-1500
32. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 35908-35913
33. Ahmed, S. A., and Claiborne, A. (1989) The streptococcal flavoprotein NADH oxidase. I. Evidence linking NADH oxidase and NADH peroxidase cysteinyl redox centers. *J Biol Chem* 264, 19856-19863
34. Poole, L. (1989) The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine sulfenic acid. *Journal of Biological Chemistry* 264, 12330-12338
35. Fuangthong, M., and Helmann, J. D. (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6690-6695
36. Lee, J. W., Soonsanga, S., and Helmann, J. D. (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8743-8748
37. Denu, J. M., and Tanner, K. G. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37, 5633-5642
38. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem Res Toxicol* 24, 434-450
39. Klomsiri, C., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2011) Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal* 14, 1065-1077
40. Rehder, D. S., and Borges, C. R. (2010) Cysteine sulfenic acid as an intermediate in disulfide bond formation and nonenzymatic protein folding. *Biochemistry* 49, 7748-7755
41. Percival, M. D., Ouellet, M., Campagnolo, C., Claveau, D., and Li, C. (1999) Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of

- mixed disulfides and a sulfenic acid. *Biochemistry* 38, 13574-13583
42. Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., and Alvarez, B. (2003) Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* 42, 9906-9914
 43. DeMaster, E. G., Quast, B. J., Redfern, B., and Nagasawa, H. T. (1995) Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* 34, 11494-11499
 44. Kettenhofen, N. J., and Wood, M. J. (2010) Formation, reactivity, and detection of protein sulfenic acids. *Chem Res Toxicol* 23, 1633-1646
 45. Poole, L. B., and Ellis, H. R. (2002) Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase. *Methods Enzymol* 348, 122-136
 46. Poole, L. B., Klomsiri, C., Knaggs, S. A., Furdui, C. M., Nelson, K. J., Thomas, M. J., Fetrow, J. S., Daniel, L. W., and King, S. B. (2007) Fluorescent and affinity-based tools to detect cysteine sulfenic acid formation in proteins. *Bioconjug Chem* 18, 2004-2017
 47. Charles, R. L., Schroder, E., May, G., Free, P., Gaffney, P. R., Wait, R., Begum, S., Heads, R. J., and Eaton, P. (2007) Protein sulfenation as a redox sensor: proteomics studies using a novel biotinylated dimedone analogue. *Mol Cell Proteomics* 6, 1473-1484
 48. Klomsiri, C., Nelson, K. J., Bechtold, E., Soito, L., Johnson, L. C., Lowther, W. T., Ryu, S. E., King, S. B., Furdui, C. M., and Poole, L. B. (2010) Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. *Methods Enzymol* 473, 77-94
 49. Nelson, K. J., Klomsiri, C., Codreanu, S. G., Soito, L., Liebler, D. C., Rogers, L. C., Daniel, L. W., and Poole, L. B. (2010) Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection methods to visualize and identify labeled proteins. *Methods Enzymol* 473, 95-115
 50. Seo, Y. H., and Carroll, K. S. (2009) Profiling protein thiol oxidation in tumor cells using sulfenic acid-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16163-16168
 51. Aboderin, A. (1976) Reaction of chicken egg white lysozyme with 7-chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole. *Biochimica et Biophysica Acta* 420, 177-186
 52. Birkett, D. J. (1970) The reactivity of SH groups with a fluorogenic reagent. *FEBS Letters* 6, 346-348
 53. Ghosh, P. B., and Whitehouse, M. W. (1968) 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines. *Biochem J* 108, 155-156
 54. Ellis, H. R., and Poole, L. B. (1997) Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-

- oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 36, 15013-15018
55. Radi, R., Bush, K. M., Cosgrove, T. P., and Freeman, B. A. (1991) Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 286, 117-125
 56. Saurin, A. T., Neubert, H., Brennan, J. P., and Eaton, P. (2004) Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17982-17987
 57. Ellis, H. R., and Poole, L. B. (1997) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36, 13349-13356
 58. Peshenko, I. V., and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 31, 292-303
 59. Rehder, D. S., and Borges, C. R. (2010) Possibilities and pitfalls in quantifying the extent of cysteine sulfenic acid modification of specific proteins within complex biofluids. *BMC Biochem* 11, 25
 60. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., and Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng* 12, 439-446
 61. Peters, T. (1996) *All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications*, Academic Press, San Diego
 62. Curry, S., Brick, P., and Franks, N. P. (1999) Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* 1441, 131-140
 63. Ballmer, P. E., McNurlan, M. A., Milne, E., Heys, S. D., Buchan, V., Calder, A. G., and Garlick, P. J. (1990) Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes. *Am J Physiol* 259, E797-803
 64. Predescu, D., Predescu, S., and Malik, A. B. (2002) Transport of nitrated albumin across continuous vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13932-13937
 65. Iwao, Y., Anraku, M., Yamasaki, K., Kragh-Hansen, U., Kawai, K., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2006) Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1764, 743-749
 66. Bito, R., Hino, S., Baba, A., Tanaka, M., Watabe, H., and Kawabata, H. (2005) Degradation of oxidative stress-induced denatured albumin in rat liver endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C531-542
 67. Schnitzer, J. E. (1992) gp60 is an albumin-binding glycoprotein expressed by continuous endothelium involved in albumin transcytosis. *Am J Physiol* 262, H246-

68. Spector, A. A. (1986) Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods Enzymol* 128, 320-339
69. Simard, J. R., Zunszain, P. A., Hamilton, J. A., and Curry, S. (2006) Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J Mol Biol* 361, 336-351
70. Bhattacharya, A. A., Curry, S., and Franks, N. P. (2000) Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *J Biol Chem* 275, 38731-38738
71. Fanali, G., di Massi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., and Ascenzi, P. (2012) Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* doi:10.1016/j.mam.2011.12.002
72. Zunszain, P. A., Ghuman, J., McDonagh, A. F., and Curry, S. (2008) Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *J Mol Biol* 381, 394-406
73. Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., and Ascenzi, P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* 57, 787-796
74. Gundry, R. L., Fu, Q., Jelinek, C. A., Van Eyk, J. E., and Cotter, R. J. (2007) Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin Appl* 1, 73-88
75. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., and Ames, B. N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046
76. Dennery, P. A., Seidman, D. S., and Stevenson, D. K. (2001) Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 344, 581-590
77. Cha, M. K., and Kim, I. H. (2006) Disulfide between Cys392 and Cys438 of human serum albumin is redox-active, which is responsible for the thioredoxin-supported lipid peroxidase activity. *Arch Biochem Biophys* 445, 19-25
78. Mendez, C. M., McClain, C. J., and Marsano, L. S. (2005) Albumin therapy in clinical practice. *Nutr Clin Pract* 20, 314-320
79. Haynes, G. R., Navickis, R. J., and Wilkes, M. M. (2003) Albumin administration--what is the evidence of clinical benefit? A systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Anaesthesiol* 20, 771-793
80. Mansoor, M. A., Svardal, A. M., and Ueland, P. M. (1992) Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in

human plasma. *Anal Biochem* 200, 218-229

81. Andersson, A., Isaksson, A., Brattstrom, L., and Hultberg, B. (1993) Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin Chem* 39, 1590-1597
82. Noel, J. K., and Hunter, M. J. (1972) Bovine mercaptalbumin and non-mercaptalbumin monomers. Interconversions and structural differences. *J Biol Chem* 247, 7391-7406
83. Beck, J. L., Ambahera, S., Yong, S. R., Sheil, M. M., de Jersey, J., and Ralph, S. F. (2004) Direct observation of covalent adducts with Cys34 of human serum albumin using mass spectrometry. *Anal Biochem* 325, 326-336
84. Tsikas, D., and Frolich, J. C. (2002) S-nitrosoalbumin plasma levels in health and disease: facts or artifacts? Value of analytical chemistry in nitric oxide clinical research. *Circ Res* 90, e39
85. Rassaf, T., Feelisch, M., and Kelm, M. (2004) Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med* 36, 413-422
86. Aldini, G., Vistoli, G., Regazzoni, L., Gamberoni, L., Facino, R. M., Yamaguchi, S., Uchida, K., and Carini, M. (2008) Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol* 21, 824-835
87. Rudolph, V., Schopfer, F. J., Khoo, N. K., Rudolph, T. K., Cole, M. P., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Groeger, A. L., Golin-Bisello, F., Chen, C. S., Baker, P. R., and Freeman, B. A. (2009) Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem* 284, 1461-1473
88. Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L. T., Gardner, D. K., Slone, D. S., and Craun, M. L. (2005) Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit Care Med* 33, 1638-1641
89. Musante, L., Bruschi, M., Candiano, G., Petretto, A., Dimasi, N., Del Boccio, P., Urbani, A., Rialdi, G., and Ghiggeri, G. M. (2006) Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 668-673
90. Era, S., Hamaguchi, T., Sogami, M., Kuwata, K., Suzuki, E., Miura, K., Kawai, K., Kitazawa, Y., Okabe, H., Noma, A., and et al. (1988) Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography. *Int J Pept Protein Res* 31, 435-442
91. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R., and Alvarez, B. (2009) Sulfenic acid-a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 3384-3392

92. Stewart, A. J., Blindauer, C. A., Berezenko, S., Sleep, D., Tooth, D., and Sadler, P. J. (2005) Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *Febs J* 272, 353-362
93. Torres, M. J., Turell, L., Botti, H., Antmann, L., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Radi, R., and Alvarez, B. (2012) Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* En prensa
94. Lewis, S. D., Misra, D. C., and Shafer, J. A. (1980) Determination of interactive thiol ionizations in bovine serum albumin, glutathione, and other thiols by potentiometric difference titration. *Biochemistry* 19, 6129-6137
95. Antmann, L. (2008) *Aproximación a la constante de acidez del tiol libre de la seroalbúmina humana y de su producto de oxidación, el ácido sulfénico*, Trabajo final de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
96. Christodoulou, J., Sadler, P. J., and Tucker, A. (1994) A new structural transition of serum albumin dependent on the state of Cys34. Detection by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 225, 363-368
97. Christodoulou, J., Sadler, P. J., and Tucker, A. (1995) ¹H NMR of albumin in human blood plasma: drug binding and redox reactions at Cys34. *FEBS Lett* 376, 1-5
98. Pedersen, A. O., and Jacobsen, J. (1980) Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3-9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine. *Eur J Biochem* 106, 291-295
99. Oettl, K., and Stauber, R. E. (2007) Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 151, 580-590
100. Kawakami, A., Kubota, K., Yamada, N., Tagami, U., Takehana, K., Sonaka, I., Suzuki, E., and Hirayama, K. (2006) Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *Febs J* 273, 3346-3357
101. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J Biol Chem* 274, 842-848
102. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266, 4244-4250
103. Kratochwil, N. I., Al; Patriarca, M; Parkinson, JA; Gouldsworthy, AM; Murdoch, P; Sadler, PJ (1999) Surprising reactions of iodo Pt(IV) and Pt(II) complexes with human serum albumin: detection of Cys34 sulfenic acid. *J Am Chem Soc* 121, 8193-

104. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Duran, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* 47, 358-367
105. Minchiotti, L., Galliano, M., Kragh-Hansen, U., and Peters, T., Jr. (2008) Mutations and polymorphisms of the gene of the major human blood protein, serum albumin. *Hum Mutat* 29, 1007-1016
106. Aldini, G., Yeum, K., and Vistoli, G. (2010) *Biomarkers for antioxidants defense and oxidative damage: principles and practical applications*, Blackwell Publishing Ltd.
107. Era, S., Kuwata, K., Imai, H., Nakamura, K., Hayashi, T., and Sogami, M. (1995) Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1247, 12-16
108. Leto, S., Yiengst, M. J., and Barrows, C. H., Jr. (1970) The effect of age and protein deprivation on the sulfhydryl content of serum albumin. *J Gerontol* 25, 4-8
109. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Lorenzini, S., Milzani, A., and Rossi, R. (2006) Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 1030-1038
110. Musante, L., Candiano, G., Petretto, A., Bruschi, M., Dimasi, N., Caridi, G., Pavone, B., Del Boccio, P., Galliano, M., Urbani, A., Scolari, F., Vincenti, F., and Ghiggeri, G. M. (2007) Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. *J Am Soc Nephrol* 18, 799-810
111. Terawaki, H., Yoshimura, K., Hasegawa, T., Matsuyama, Y., Negawa, T., Yamada, K., Matsushima, M., Nakayama, M., Hosoya, T., and Era, S. (2004) Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int* 66, 1988-1993
112. Suzuki, E., Yasuda, K., Takeda, N., Sakata, S., Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., and Miura, K. (1992) Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 18, 153-158
113. Tomida, M., Ishimaru, J. I., Murayama, K., Kajimoto, T., Kurachi, M., Era, S., and Shibata, T. (2004) Intra-articular oxidative state correlated with the pathogenesis of disorders of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg* 42, 405-409
114. Hayashi, T., Era, S., Kawai, K., Imai, H., Nakamura, K., and Onda, E. (2000) Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract. *Pathophysiology* 6, 237-243
115. Oettl, K., Stadlbauer, V., Petter, F., Greilberger, J., Putz-Bankuti, C., Hallstrom, S., Lackner, C., and Stauber, R. E. (2008) Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta* 1782, 469-473

116. Imai, H., Hayashi, T., Negawa, T., Nakamura, K., Tomida, M., Koda, K., Tajima, T., Koda, Y., Suda, K., and Era, S. (2002) Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol* 52, 135-140
117. Bar-Or, D., Heyborne, K. D., Bar-Or, R., Rael, L. T., Winkler, J. V., and Navot, D. (2005) Cysteinylation of maternal plasma albumin and its association with intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 25, 245-249
118. Mera, K., Anraku, M., Kitamura, K., Nakajou, K., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2005) The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1322-1328
119. Hayakawa, A., Kuwata, K., Era, S., Sogami, M., Shimonaka, H., Yamamoto, M., Dohi, S., and Hirose, H. (1997) Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 698, 27-33
120. Hortin, G. L., Sviridov, D., and Anderson, N. L. (2008) High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem* 54, 1608-1616
121. Motchnik, P. A., Frei, B., and Ames, B. N. (1994) Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol* 234, 269-279
122. Peluffo, G., Calcerrada, P., Piacenza, L., Pizzano, N., and Radi, R. (2009) Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1781-1792
123. Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B., and Holmgren, A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 269, 29382-29384
124. Flohe, L., Loschen, G., Gunzler, W. A., and Eichele, E. (1972) Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 353, 987-999
125. Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998) Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 11, 1398-1401
126. Jacobson, G. A., Narkowicz, C., Tong, Y. C., and Peterson, G. M. (2006) Plasma glutathione peroxidase by ELISA and relationship to selenium level. *Clin Chim Acta* 369, 100-103
127. Jacobson, G. A., Yee, K. C., and Ng, C. H. (2007) Elevated plasma glutathione peroxidase concentration in acute severe asthma: comparison with plasma glutathione peroxidase activity, selenium and malondialdehyde. *Scand J Clin Lab*

128. Steinbrenner, H., and Sies, H. (2009) Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1478-1485
129. Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., and Takahashi, K. (1999) Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* 274, 2866-2871
130. Leaver, S. K., MacCallum, N. S., Pingle, V., Hacking, M. B., Quinlan, G. J., Evans, T. W., and Burke-Gaffney, A. (2010) Increased plasma thioredoxin levels in patients with sepsis: positive association with macrophage migration inhibitory factor. *Intensive Care Med* 36, 336-341
131. Lundberg, M., Fernandes, A. P., Kumar, S., and Holmgren, A. (2004) Cellular and plasma levels of human glutaredoxin 1 and 2 detected by sensitive ELISA systems. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 801-809
132. Soderberg, A., Sahaf, B., and Rosen, A. (2000) Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res* 60, 2281-2289
133. Chen, J. H., Chang, Y. W., Yao, C. W., Chiueh, T. S., Huang, S. C., Chien, K. Y., Chen, A., Chang, F. Y., Wong, C. H., and Chen, Y. J. (2004) Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17039-17044
134. Chang, X., Cui, Y., Zong, M., Zhao, Y., Yan, X., Chen, Y., and Han, J. (2009) Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *J Rheumatol* 36, 872-880
135. Minetti, M., Agati, L., and Malorni, W. (2007) The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases. *Cardiovasc Res* 75, 21-28
136. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch Biochem Biophys* 484, 146-154
137. Johnson, R. M., Ho, Y. S., Yu, D. Y., Kuypers, F. A., Ravindranath, Y., and Goyette, G. W. (2010) The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic Biol Med* 48, 519-525
138. Adimora, N. J., Jones, D. P., and Kemp, M. L. (2010) A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxid Redox Signal* 13, 731-743

139. Kleinman, W. A., and Richie, J. P., Jr. (2000) Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol* 60, 19-29
140. Barash, I., Faerman, A., Baruch, A., Nathan, M., Hurwitz, D. R., and Shani, M. (1993) Synthesis and secretion of human serum albumin by mammary gland explants of virgin and lactating transgenic mice. *Transgenic Res* 2, 266-276
141. Daniell, H. (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J* 1, 1071-1079
142. He, Y., Ning, T., Xie, T., Qiu, Q., Zhang, L., Sun, Y., Jiang, D., Fu, K., Yin, F., Zhang, W., Shen, L., Wang, H., Li, J., Lin, Q., Sun, Y., Li, H., Zhu, Y., and Yang, D. (2011) Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19078-19083
143. Bobik, T. V., Vorob'ev, I., Ponomarenko, N. A., Gabibov, A. G., and Miroshnikov, A. I. (2008) [Expression of human serum albumin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its structural and functional analysis]. *Bioorg Khim* 34, 56-62
144. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., and Ohmura, T. (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng* 89, 55-61
145. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., and Tomomitsu, K. (2000) High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *J Biosci Bioeng* 90, 280-288
146. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., and Tomomitsu, K. (2000) Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 89, 479-484
147. Ohtani, W., Nawa, Y., Takeshima, K., Kamuro, H., Kobayashi, K., and Ohmura, T. (1998) Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*. *Anal Biochem* 256, 56-62
148. Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 45-66
149. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., and Harvey, L. M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249-270
150. Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., and Chappell, T. (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* 463, 169-189
151. Ikegaya, K., Hirose, M., Ohmura, T., and Nokihara, K. (1997) Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin,

- secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal Chem* 69, 1986-1991
152. Watanabe, H., Yamasaki, K., Kragh-Hansen, U., Tanase, S., Harada, K., Suenaga, A., and Otagiri, M. (2001) In vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time. *Pharm Res* 18, 1775-1781
 153. Kobayashi, K. (2006) Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals* 34, 55-59
 154. Kasahara, A., Kita, K., Tomita, E., Toyota, J., Imai, Y., and Kumada, H. (2008) Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis: a multicenter clinical study. *J Gastroenterol* 43, 464-472
 155. Ohnishi, K., Kawaguchi, A., Nakajima, S., Mori, H., and Ueshima, T. (2008) A comparative pharmacokinetic study of recombinant human serum albumin with plasma-derived human serum albumin in patients with liver cirrhosis. *J Clin Pharmacol* 48, 203-208
 156. Kratz, F. (2008) Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 132, 171-183
 157. Claiborne, A. (1985) *In Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
 158. Chen, R. F. (1967) Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J Biol Chem* 242, 173-181
 159. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126
 160. Riener, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 373, 266-276
 161. Boyer, P. D. (1954) Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4331-4337
 162. Turell, L. (2006) *Detección de ácido sulfénico en albúmina humana*, Trabajo final de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
 163. Li, S., Peterson, N. A., Kim, M. Y., Kim, C. Y., Hung, L. W., Yu, M., Legin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S., and Baker, E. N. (2005) Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. *J Mol Biol* 346, 1035-1046
 164. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423
 165. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html
 166. Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady

- states and control of biochemical and other systems. *Comput Appl Biosci* 9, 563-571
167. Espenson, J. H. (1995) *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, McGraw Hill, Inc.
 168. Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L. E., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* 48, 9416-9426
 169. Filho, J. C., Bergstrom, J., Stehle, P., and Furst, P. (1997) Simultaneous measurements of free amino acid patterns of plasma, muscle and erythrocytes in healthy human subjects. *Clin Nutr* 16, 299-305
 170. Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4886-4891
 171. Smith, R. M., Martell, A. E., and Motekaitis, R. J. (1993) *NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database; NIST Standard Reference Database 46*, U. S. Department of Commerce, Gaithersburgh, MD
 172. Sengupta, S., Chen, H., Togawa, T., DiBello, P. M., Majors, A. K., Budy, B., Ketterer, M. E., and Jacobsen, D. W. (2001) Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem* 276, 30111-30117
 173. Sengupta, S., Wehbe, C., Majors, A. K., Ketterer, M. E., DiBello, P. M., and Jacobsen, D. W. (2001) Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J Biol Chem* 276, 46896-46904
 174. Bulaj, G., Kortemme, T., and Goldenberg, D. P. (1998) Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965-8972
 175. Torres, M. J. (2010) *Efecto de los ácidos grasos en las propiedades del tiol de la albúmina y su derivado sulfénico*, Trabajo final de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
 176. Takabayashi, K., Imada, T., Saito, Y., and Inada, Y. (1983) Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin. *Eur J Biochem* 136, 291-295
 177. Gryzunov, Y. A., Arroyo, A., Vigne, J. L., Zhao, Q., Tyurin, V. A., Hubel, C. A., Gandley, R. E., Vladimirov, Y. A., Taylor, R. N., and Kagan, V. E. (2003) Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch Biochem Biophys* 413, 53-66

178. Bhattacharya, A. A., Grune, T., and Curry, S. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303, 721-732
179. West, I. C. (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17, 171-180
180. Powers, S. K., and Jackson, M. J. (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276
181. Yamato, M., Shiba, T., Yoshida, M., Ide, T., Seri, N., Kudou, W., Kinugawa, S., and Tsutsui, H. (2007) Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *Febs J* 274, 3855-3863
182. Reyes, A. M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic Biol Med* 51, 464-473
183. Sluyterman, L. A. A., and Elgersma, O. (1978) Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. I. General principles. *Journal of Chromatography* 150, 17-30
184. Walker, J. M. (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press
185. Olsson, M. H. M., Sondergard, C. R., Rostkowski, M., and Jensen, J. H. (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7, 525-537
186. Kice, J. L. (1981) Mechanisms and Reactivity in Reactions of Organic Oxyacids of Sulfur and their Anhydrides. *Advances in Physical Organic Chemistry* 17, 65-181
187. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 27, 322-328
188. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5, 834-842
189. Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch Biochem Biophys* 397, 91-98
190. Wilson, J. M., Bayer, R. J., and Hupe, D. J. (1977) Structure-reactivity correlations for the thiol-disulfide interchange reaction. *J Am Chem Soc* 99, 7922-7926
191. Whitesides, G. M., Lilburn, J. E., and Szajewski, R. P. (1977) Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J Org*

192. Higgins, J. M., Eddington, D. T., Bhatia, S. N., and Mahadevan, L. (2009) Statistical dynamics of flowing red blood cells by morphological image processing. *PLoS Comput Biol* 5, e1000288
193. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 333, 49-58
194. Romero, N., Denicola, A., Souza, J. M., and Radi, R. (1999) Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* 368, 23-30
195. Romero, N., Denicola, A., and Radi, R. (2006) Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. *IUBMB Life* 58, 572-580
196. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 32, 841-859
197. Goldstein, S., and Samuni, A. (2005) Intra- and intermolecular oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin induced by hydroxyl and carbonate radicals. *Free Radic Biol Med* 39, 511-519

8. ANEXO

Tabla A1. Cebadores utilizados en los distintos ensayos. Para el caso de los cebadores utilizados en ensayos de mutagénesis, la base mutada se muestra en color rojo. Todos los cebadores fueron adquiridos en SBS Genetech, Beijing, China.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Ensayo
HSAEcoRI F	CGCGAATTCATGAAGTGGGTAACC	Amplificación, secuenciación
HSAXhoI R	CGCCTCGAGTTATAAGCCTAAGGCAGC	Amplificación, secuenciación
HSA-F	ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCC	Amplificación
HSA-R	ATAAGCCTAAGGCAGCTTGACTGG	Amplificación
HSASqF1	GGTTGATGTGATGTGCACTGC	Secuenciación
HSASqF2	GTAAACTGAAGGAATGCTGTG	Secuenciación
HSASqF3	CAACTCTTGTAGAGGTCTCAAG	Secuenciación
HSASqR1	AGTAAGGATGTCTTCTGGC	Secuenciación
HSASqR2	TCCACTTCGGCAATGCAGTG	Secuenciación
HSASqR3	GATAGTCTTCTGCACAGGGCATTC	Secuenciación
MutD38f	CAGCAGTGCCATTTGAAGCTCATGTAAAATTAGTGAATG	Mutagénesis, D38A
MutD38r	CATTCATAATTTTACATGAGCTTCAAATGGACACTGCTG	Mutagénesis, D38A
MutH39f	GCAGTGCCATTTGAAGATCTTGTAATAATTAGTGAATGAAG	Mutagénesis, H39L
MutH39r	CTTCATTCATAATTTTACAAGATCTTCAAATGGACACTGC	Mutagénesis, H39L
MutY84f	GCAACTCTTCGTGAAACCTTTGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC	Mutagénesis, Y84F
MutY84r	GCACAGCAGTCAGCCATTTACCAAGGTTTCACGAAGAGTTGC	Mutagénesis, Y84F
MutW214f	GGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATTCGAGTAGCTCGCCTGAGCC	Mutagénesis, W214F
MutW214r	GGCTCAGGCGAGCTACTGCAGATGCTTTGAAAGCTTTTCTCC	Mutagénesis, W214F
MutF36f	GTATCTTCAGCAGTGCCATGGGAAGATCATGTAAAATTAGTG	Mutagénesis, F36W
MutF36r	CACTAATTTTACATGATCTTCCCATGGACACTGCTGAAGATAC	Mutagénesis, F36W

9. AGRADECIMIENTOS

En lo que refiere al trabajo de tesis

A Beatriz Alvarez, Horacio Botti, Sebastián Carballal, Rafael Radi, Gerardo Ferrer-Sueta, María José Torres, Laura Antmann, Rodrigo Lombide, Madia Trujillo y Martín Hugo por su ayuda en varios experimentos, intercambios de ideas y discusiones enriquecedoras.

A Rosario Durán, José Souza por su ayuda con algunos de los experimentos de espectroscopía de masa.

A Bruce Freeman y Francisco Schopfer por recibirme tan generosamente en su laboratorio donde se realizaron gran parte de los experimentos de espectrometría de masa de esta tesis.

A Mónica Marín e Ignacio López por su colaboración en la producción de la HSA recombinante.

A PEDECIBA-Química y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por las becas de Maestría y Doctorado.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el apoyo económico para realizar pasantías y asistir a congresos.

En lo personal

A Beatriz, por transmitirme esa pasión que siente por lo que hace y muchas veces ayudarme a subir mi “autoestima experimental”. Por su dedicación constante y estar siempre dispuesta a discutir resultados y planificar nuevos experimentos, pero sobre todo por el apoyo constante en todos los aspectos de mi vida, más allá de lo académico. Realmente aprendí muchísimo trabajando con ella y me considero afortunada por haberla tenido como tutora.

A todos los integrantes de los Laboratorios de Enzimología y Fisicoquímica Biológica, los que siguen y los que se fueron: Ana, Leo, Gefe, Luciana, Darío, Bruno, Matías, Seba, Flo T., Flo S., Flo A., Gaby, Daniel, Laura A., Majo, Ernest, Wilson, Claudio, Rodrigo, Victoria, Tincho, Ceci, Gonzalo (espero no olvidarme de nadie!), con quienes compartí y comparto gran parte de mi vida y hacen del laboratorio mucho más que un lugar de trabajo. Especialmente, quiero agradecer a “las rubias” Lau, Maggie, Vero y Lía por hacerme divertir tanto dentro y fuera del laboratorio y por tanto evento organizado juntas.

A mi familia: mi Madre, Tincho, Nacho, Ana, Carlos, Rodri, Diego, Raquel, Manel, Xavi, Tere y otros tantos por el apoyo continuo en todas las etapas de mi vida y especialmente en esta última, a pesar de no haber podido responder hasta ahora a su pregunta más recurrente: “¿y para que sirve lo que hacés?”

A mis amigas de hace ya muchos años (no importa cuantos...): Lu, Marce, Maia, Maite, Mauge, Marie por acompañarme en todo momento y permitirme formar parte de este grupo humano tan lindo. Especialmente a Lu y Marie por la ayuda con la carátula.

A Nat, con quien empecé este camino de la Ciencia y compartí y, por suerte, comparto tantas horas de estudio, charlas y salidas.