



# **Generación y caracterización funcional y fisicoquímica de mutantes de cisteína de la triparredoxina peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi***

**Tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica**

**Carmela Pereyra Goday**

**Tutor**

**Dra. Dolores Piñeyro**

**Co-tutor**

**Dra. Adriana Parodi-Talice**

**Montevideo, Mayo 2024**

**Laboratorio de Interacción Hospedero-Patógeno,  
Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur**

## Agradecimientos

A mi familia, por el apoyo incondicional desde siempre, mi pilar fundamental, sin quienes no estaría donde estoy. A Martín, por su paciencia y confianza en que todo saldrá bien.

A mis amigas, que han sido pilares muy importantes en el día a día, siempre con palabras de aliento.

A Dolores y a Adriana, por el tiempo y la dedicación que me han brindado, por enseñarme a investigar, dándome la oportunidad de trabajar y aprender junto a ellas. A Carlos Robello y a todo UBM, por recibirme en su laboratorio y por siempre estar dispuestos a brindarme su ayuda.

# Contenido

<b>1. Resumen</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>5</b>
2.1 Trypanosoma cruzi y enfermedad de Chagas.....	5
2.2 Generalidades de las peroxirredoxinas.....	8
2.3 Clasificación y estructura de las peroxirredoxinas.....	11
2.4 Ciclo catalítico de peroxirredoxinas de 2-Cys típicas.....	17
2.5 Hiperoxidación de peroxirredoxinas de 2-Cys típicas.....	21
2.6 Peroxirredoxinas en parásitos.....	23
2.7 Actividad crucial de peroxirredoxinas en virulencia y cómo combatirla.....	24
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>28</b>
3.1 Objetivos generales.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
3.2.1 Creación de mutantes de cisteína.....	28
3.2.2 Análisis de la funcionalidad: actividad peroxidasa.....	28
3.2.3 Análisis de la oligomerización.....	28
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	<b>29</b>
4.1 Materiales.....	29
4.1.1 Soluciones.....	29
4.1.2 Soluciones amortiguadoras o buffers y soluciones.....	29
4.1.3 Cepas de Escherichia coli (E. Coli).....	31
4.1.4 Medios de cultivo.....	32
4.1.5 Vectores plasmídicos.....	32
4.1.6 Enzimas.....	32
4.1.6.1 ADN polimerasas.....	32
4.1.6.2 Enzimas de restricción.....	33
4.1.6.3 ADN ligasas.....	33
4.1.7 Reactivos químicos y otros materiales.....	33
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Métodos para preparación de cepas de E. Coli DH5- $\alpha$ .....	33
4.2.1.1 Preparación de células electrocompetentes.....	33
4.2.1.2 Transformación de células electrocompetentes.....	34
4.2.1.3 Preparación de células quimiocompetentes.....	34
4.2.1.4 Transformación de células quimiocompetentes.....	35
4.2.2 Métodos para el análisis de ADN.....	35
4.2.2.1 Purificación de ADN plasmídico a partir de bacterias.....	35
4.2.2.2 Cuantificación de ADN plasmídico.....	36
4.2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	36
4.2.2.4 Mutagénesis por PCR del gen codificante para las proteínas c-TXNPx-C71S y c-TXNPxC76S.....	37
4.2.3 Métodos relacionados con la expresión y análisis de proteínas.....	39
4.2.3.1 Transformación de los plásmidos pQE30-c-TXNPxC71S y pQE30-c-TXNPxC76S en la cepa E. Coli M15.....	39
4.2.3.2 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes	

c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	40
4.2.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% (SDS-PAGE).....	43
4.2.3.4 Transferencia del gel de poliacrilamida-SDS al 12% (SDS-PAGE) a la membrana de nitrocelulosa (Western blot).....	44
4.2.3.5 Inmunodetección.....	44
4.2.3.6 Tinción del gel de poliacrilamida-SDS al 12% (SDS-PAGE) con azul de coomassie.....	44
4.2.4 Purificación de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	45
4.2.4.1 Purificación por columnas His SpinTrap.....	45
4.2.4.2 Purificación por columnas HiTrap™ HP Affinity Column.....	45
4.2.5 Análisis funcional.....	46
4.2.5.1 Actividad peroxidasa por método de ensayo acoplado para c-TXNPx wt, c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	46
4.2.5.2 Análisis del estado de oxidación de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	47
<b>5. Resultados.....</b>	<b>49</b>
5.1 Generación de mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	49
5.1.1 Mutagénesis sitio dirigida por PCR.....	49
5.1.2 Purificación de ADN plasmídico para la confirmación de mutagénesis sitio dirigida y la posterior secuenciación.....	51
5.2 Confirmación de la presencia del ADN plasmídico pQE30-c-TXNPxC71S y pQE30-c-TXNPxC76S en las células de expresión.....	55
5.3 Expresión inicial de c-TXNPxC71S y C76S.....	56
5.4 Puesta a punto del ensayo de expresión y análisis de solubilidad de los mutantes c-TXNPxC71S y C76S.....	58
5.4.1 Ajuste del ensayo mediante el método B.....	58
5.4.2 Ajuste del ensayo mediante el método C.....	60
5.4.3 Ajuste del ensayo mediante el método D.....	62
5.5 Purificación de los mutantes c-TXNPxC71S y C76S.....	65
5.5.1 Prueba de purificación de las proteínas mutantes, según el método E.....	65
5.5.2 Purificación de las proteínas mutantes, según el método F.....	68
5.6 Análisis funcional.....	70
5.6.1 Actividad peroxidasa para c-TXNPx wt.....	70
5.6.2 Actividad peroxidasa para c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	73
5.6.3 Análisis del estado de oxidación de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	78
<b>6. Discusión.....</b>	<b>81</b>
6.1 Mutagénesis sitio dirigida para mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	81
6.2 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S: expresión inicial y puesta a punto del ensayo.....	83
6.3 Purificación de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	87
6.4 Análisis funcional: Ensayos de actividad peroxidasa y de estados de oxidación para c-TXNPx wt, c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.....	88
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>90</b>
<b>8. Perspectivas.....</b>	<b>91</b>
<b>9. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>92</b>

# 1. Resumen

Las peroxirredoxinas (Prx) son una familia de enzimas definidas dentro de las peroxidases. Se encuentran ampliamente distribuidas y expresadas en muchos organismos, además son muy conservadas. Las peroxirredoxinas en *Trypanosoma cruzi* son las triparredoxinas peroxidases, las cuales se han caracterizado como factores de virulencia, por lo que se cree que pueden llegar a ser blancos atractivos para la generación de drogas contra la enfermedad de Chagas producida por *T. cruzi*. La unidad funcional de las triparredoxina peroxidases es un homodímero donde cada monómero es necesario para la catálisis enzimática, ya que uno contiene a la cisteína peroxidática y otro a la resolutive, es por esto que se clasifican en la subfamilia de Prx 2-Cys típicas. El ciclo catalítico de estas enzimas tiene como finalidad reducir el peróxido de hidrógeno con la oxidación del tiol de la cisteína peroxidática (C<sub>P</sub>-S) a ácido sulfénico (C<sub>P</sub>-SOH) y posterior resolución mediante un puente disulfuro con la cisteína resolutive (C<sub>R</sub>). En la tesina se trabajó con la proteína triparredoxina peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi* (c-TXNPx) que presenta, además de los dos residuos de cisteína catalíticos, otras cinco cisteínas en su secuencia. Se construyeron dos nuevos mutantes de cisteína a serina, pQE30-c-TXNPx-C71S y pQE30-c-TXNPx-C76S con la finalidad de estudiar el rol de estas cisteínas en su estructura y función. Estas construcciones, junto a la construcción *wild type*, fueron expresadas de manera recombinante en *E. coli*. Una vez purificadas se realizaron ensayos preliminares de actividad peroxidasa y de oligomerización.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi* - peroxirredoxinas - actividad peroxidasa - oligomerización - factores de virulencia

## 2. Introducción

### 2.1 *Trypanosoma cruzi* y enfermedad de Chagas

El protozoo *Trypanosoma cruzi* es el agente parásito flagelado causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, relevante en toda América latina por ser potencialmente mortal, que fue descubierta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, en Minas Gerais, Brasil en 1909 (Buscaglia and Di Noia, 2003; Sousa et al., 2024). Es un protista que se clasifica en el orden kinetoplastida, familia trypanosomatidae, ya que en ellos se presentan los kinetoplastos, una subestructura granular característica asociada con el cuerpo basal del flagelo y que contiene el ADN mitocondrial extendido y solitario.

Se ha descrito a la enfermedad de Chagas como una enfermedad “silenciosa y silenciada” en la que las personas que la padecen no presentan síntomas (“News Archive,” n.d.; “World Health Organization (WHO),” n.d.; Sousa et al., 2024). Es una enfermedad que perpetúa la pobreza y afecta en mayor medida a personas con mayor vulnerabilidad social, provocando importantes desafíos físicos, psicológicos y socioeconómicos (de Oliveira et al., 2022; Ramos-Junior and Sousa, 2017; Sousa et al., 2024).

La presentación clínica es variable en humanos. La fase aguda inicial se caracteriza por parasitemia y puede durar de 40 a 60 días, aquí los síntomas pueden ser muy leves y atípicos por lo que no suele reconocerse. En esta fase *T. cruzi* provoca un estado inmunocomprometido en el hospedador infectado como resultado del agotamiento transitorio de las células del timo y una intensa activación policlonal de los linfocitos, lo cual constituye un obstáculo para la provocación temprana de respuestas protectoras (Reina-San-Martín et al., 2000). Tiene una evolución autolimitada, y cuando se diagnostica y trata adecuadamente, tiene altas posibilidades de curación, especialmente en niños y recién nacidos. La enfermedad aguda relacionada con la transmisión oral tiende a ser más intensa debido al alto inóculo del parásito, y algunos brotes se presentan con una alta letalidad (Dias et al., 2008; Lee et al., 2013; Rassi et al., 2010).

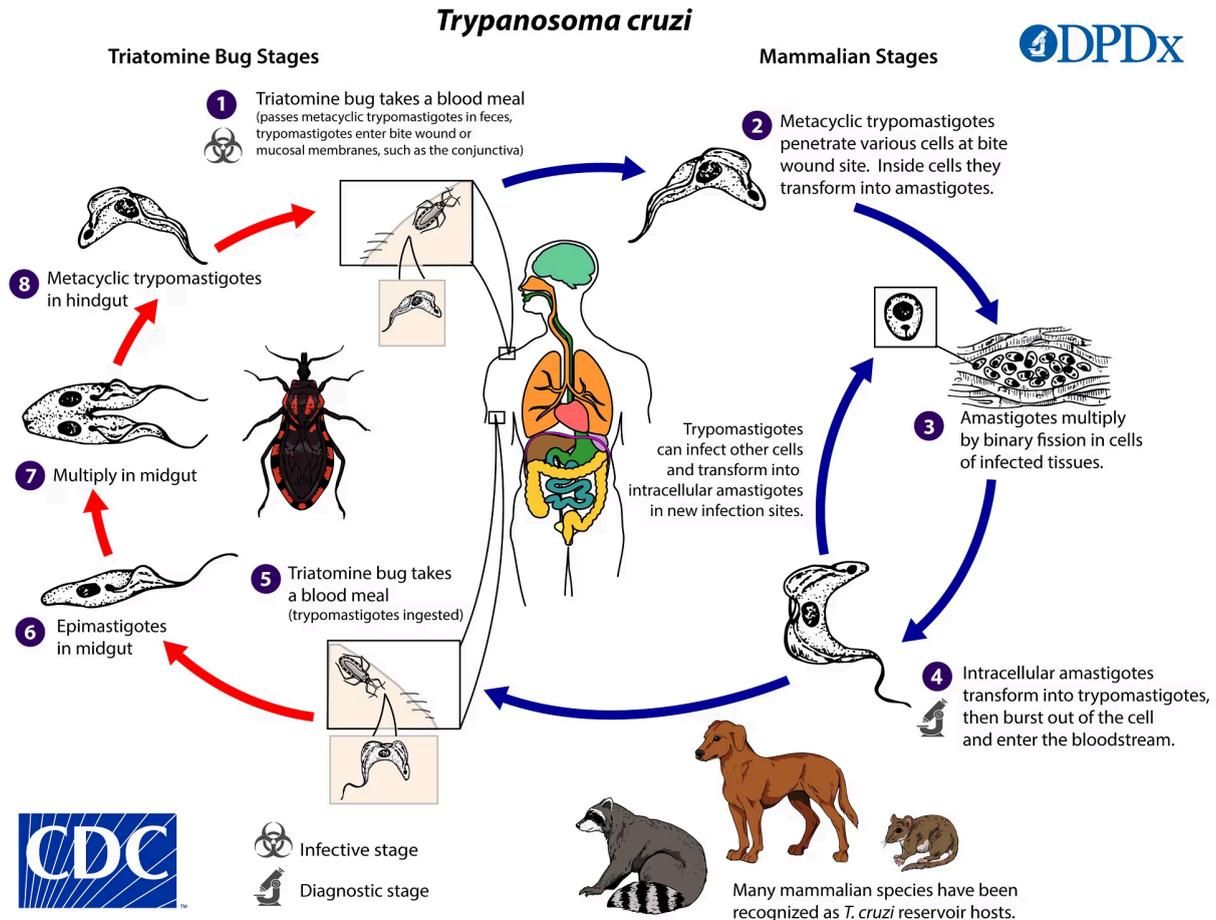
Luego de la fase aguda, los pacientes entran en la forma indeterminada de la fase crónica que puede durar varios años o persistir indefinidamente, caracterizada

por ausencia de síntomas clínicos relevantes y una parasitemia baja o nula, pero son reactivos a pruebas serológicas de rutina. Hasta 20 años luego de la infección aproximadamente el 35% de los pacientes no tratados desarrollan signos patológicos característicos como miocardiopatías, daños en el sistema nervioso periférico o disfunción del tracto digestivo que lleva a megaesófago y/o megacolon (Buscaglia and Di Noia, 2003; Rassi et al., 2010).

*T. cruzi* en algunos pacientes no desarrollará signos o síntomas en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, ya que mantiene electrocardiogramas (ECG) y radiografías del tracto gastrointestinal normales. Este perfil se caracteriza como la forma crónica indeterminada de la enfermedad de Chagas, que se identifica únicamente por serología reactiva (IgG), y se caracteriza por un pronóstico similar al de poblaciones no infectadas (Hasslocher-Moreno et al., 2021; Prata, 2001; Sousa et al., 2024)

A pesar de la alta mortalidad y morbilidad de esta enfermedad, y la importante carga económica asociada, menos del 10% de las personas con enfermedad de Chagas han sido diagnosticados y aproximadamente el 1% han recibido tratamiento antiparasitario (Costa Chaves et al., 2017; Sousa et al., 2024).

En cuanto al ciclo de vida de *T. cruzi*, que se muestra en la figura 1, se observa que este parásito transita entre diferentes estadios replicantes e infecciosos, ya sea en el insecto triatomino (vector) como en los hospedadores mamíferos. Los tripomastigotes que circulan en la sangre de un hospedero son ingeridos por el insecto cuando pica; en el intestino del mismo se transforman en epimastigotes replicantes, que luego se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la porción posterior de su intestino y se liberan en las heces del insecto. Estos tripomastigotes pueden llegar a los hospedadores penetrando la piel dañada o la mucosa, donde al ingresar invaden células y se transforman en amastigotes replicantes, y son liberados a la circulación nuevamente en la forma de tripomastigotes derivados de células, que infectan otras células (Pérez-Molina and Molina, 2018; Sousa et al., 2024).



**Figura 1.** Ilustración del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, en la que se incluyen las etapas infectivas y replicativas, que tienen que ver con el vector y con el mamífero (CDC - DPDx - American Trypanosomiasis).

En cuanto a la epidemiología, la enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina, desde el sur de Estados Unidos al norte de Argentina y Chile. Tradicionalmente se ha limitado a zonas rurales pobres de América Central y del Sur, donde la transmisión vectorial es la principal vía de contagio (Feliciangeli et al., 2003; Pérez-Molina and Molina, 2018; Samuels et al., 2013). La migración reciente del campo a la ciudad ha permitido que la enfermedad se propague a regiones antes no afectadas, ya sea por transmisión congénita o por donaciones de sangre. La prevalencia de la infección por *T. cruzi* es más alta en Bolivia (6.1 casos cada 100 habitantes), Argentina (3.6 cada 100), Paraguay (2.1 cada 100), Ecuador (1.4 cada 100), El Salvador (1.3 cada 100) y Guatemala (1.2 cada 100), aunque por la migración, hoy en día se ven casos en el sur de Estados Unidos así como

también en Europa (Bowman et al., 2008; “Chagas disease in Latin America,” 2015; Pérez-Molina and Molina, 2018).

Desde principios del año 1990, las medidas de control más efectivas de la enfermedad de Chagas en América Latina han sido los programas de control de vectores y pruebas obligatorias en los bancos de sangre. Es por ello que la prevalencia ha disminuido sustancialmente, interrumpiendo la transmisión vectorial en 1997 en Uruguay, en 1999 en Chile y en la mayor parte de Brasil en el 2000 (“Control of Chagas disease second report of a WHO expert committee. - U.S. Department of Commerce,” n.d.; Pérez-Molina and Molina, 2018; Salvatella et al., 2014; Yamagata and Nakagawa, 2006). Pero la continuidad de la transmisión ha aumentado en algunas regiones (Gurevitz et al., 2013; Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012).

## 2.2 Generalidades de las peroxirredoxinas

El oxígeno se asocia a condiciones de vida aerobia porque es capaz de generar el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular. Además, tiene la propiedad de reducirse y ser altamente reactivo, generando especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las ERO son radicales libres, como el ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), alcoxilo ( $RO\cdot$ ) y óxido de nitrógeno, pero también pueden no ser radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que solo son reactivos en presencia de metales de transición como el hierro o cobre u otras ERO. Además de la reactividad, se diferencian en especificidad, selectividad y difusibilidad, siendo uno de los más difusibles el  $H_2O_2$ , por lo que es considerado el principal intermediario en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (San-Miguel and Martin-Gil, 2009).

Las ERO pueden generarse de manera endógena a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial o a través de las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), los cuales usan el sistema de la NADPH oxidasa ubicada en la membrana del fagolisosoma para generar directamente  $O_2^{\cdot-}$ . También generan óxido nítrico (NO) que con  $O_2^{\cdot-}$  dan lugar a la formación de  $ONOO^-$  capaz de generar la peroxidación lipídica de las lipoproteínas. Además, la

autooxidación de compuestos de carbono reducidos como los aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos generan radicales libres. Por otro lado, algunas enzimas del metabolismo intermediario celular pueden activarse catalíticamente y también generarlos, por ejemplo la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoaminooxidasa o la ciclooxigenasa (Phaniendra et al., 2015).

De manera exógena los radicales libres se pueden generar por agentes externos como el humo de tabaco, radiación electromagnética, luz solar, ozono, xenobióticos en su detoxificación por el citocromo p45 y agentes contaminantes (Lobo et al., 2010).

La producción endógena en bajas cantidades es necesaria para mantener el metabolismo celular, ya que participan en vías de señalización de una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas (Hall et al., 2009; San-Miguel and Martin-Gil, 2009).

Sin embargo, no siempre estas cantidades se mantienen en un estado basal, en algunas ocasiones, cuando el metabolismo celular enfrenta un desafío por la incorporación de algún agente externo o por la regulación de vías propias, las ERO aumentan para combatirlo y prevenir posibles daños. Esto tiene como consecuencia una cantidad desproporcionada de ERO que afecta negativamente a las células. (Ursini et al., 2016).

El control de las ERO es crucial, es por esto que existen enzimas con función antioxidante capaces de controlarlas. Un ejemplo son algunas de la familia peroxidasa, como la catalasa descubierta en 1900 (Loew, 1900), la glutatión peroxidasa descubierta en 1957 (Mills, 1957) y las peroxirredoxinas (Prx) que fueron descubiertas más tarde en 1994 (Chae et al., 1994). La catalasa necesita de un grupo hemo como cofactor y la glutatión peroxidasa de un residuo de seleno-cisteína, ambas son muy efectivas con  $k_{cat}/K_M$  constantes de segundo orden cerca de  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  respectivamente (Karplus, 2015). A diferencia de estas enzimas, las Prx no necesitan de un cofactor.

Las Prx fueron descubiertas por comparaciones de secuencias, reconociendo un tercer grupo dentro de las peroxidases (Chae et al., 1994). Se caracterizaron tres, conocidos en ese momento como antioxidantes específicos de tiol (TSA) de levadura y de rata y la alquil hidropéroxido reductasa C (AhpC) de *Salmonella typhimurium*. En su estudio, no se pudo caracterizar un cofactor en especial, pero sí se encontró que uno o dos residuos de cisteína podrían llegar a estar involucrados

en la catálisis de la enzima, que no estaban presentes en las peroxidases que usan cofactores. Según las funciones de cada cisteína se las nombra como C<sub>P</sub> “peroxidática” y C<sub>R</sub> “resolutiva”, ésta última no siempre se presenta (Karplus, 2015).

En la catálisis enzimática, el tiolato peroxidático de la cisteína peroxidática (C<sub>P</sub>) reacciona directamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se convierte en ácido sulfénico. Cuando en la peroxirredoxina existe una segunda cisteína, la resolutiva (C<sub>R</sub>), ésta reacciona con el ácido sulfénico para formar disulfuro, que luego se reduce por una disulfuro reductasa, como la tiorredoxina, completando así el ciclo catalítico (Hofmann et al., 2002). Cuando la Prx presenta una única cisteína (la C<sub>P</sub>), una vez que se oxida, debe ser reducida por una disulfuro reductasa.

Por mucho tiempo, las Prx fueron catalogadas como menos eficientes que la catalasa y la glutatión peroxidasa, ya que las constantes de velocidad de segundo orden rondaban los 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Pero se entendió que ese valor no demostraba la velocidad intrínseca de reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino la velocidad a la que la forma disulfuro de la Prx se reducía mediante un reductor externo. Al abordar ese problema para AhpC de *S. typhirium*, las mediciones del límite intrínseco de la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dieron un valor k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> superior a 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Dicha constante de velocidad se considera ahora típica para las Prx, comprobando la similar eficiencia que las catalasas o glutatión peroxidases (Hofmann et al., 2002; Karplus, 2015).

Estudios posteriores de las Prx demostraron que se expresa aún más que la catalasa o la glutatión peroxidasa. En levaduras por ejemplo, las estimaciones de abundancia de proteína por el marcado con GFP mostró que se expresa 50 veces más que la glutatión peroxidasa más abundante y 500 veces más que la catalasa más abundante (Ghaemmaghami et al., 2003; Karplus, 2015; Leyens et al., 2003). Posteriormente, se estimó que en células humanas, más del 99% del peróxido en el citosol y más del 90% del peróxido en las mitocondrias reaccionan con Prx en lugar de otras enzimas o tioles de moléculas pequeñas (Cox et al., 2009; Karplus, 2015; Winterbourn and Hampton, 2008). Muchos organismos, entre ellos patógenos humanos, no tienen catalasas y/o glutatión peroxidases, pero todos tienen Prx.

En *Trypanosoma cruzi* existen dos peroxirredoxinas, una ubicada en el citosol y otra en la mitocondria y se denominan como triparredoxina peroxidasa mitocondrial o citosólica (m-TXNPx o c-TXNPx). Catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno, de hidroperóxidos orgánicos de cadena pequeña y ONOO<sup>-</sup> (Wilkinson

et al., 2000). Piñeyro et al., (2008) comprobaron que ambas se expresan durante todo el ciclo de vida de *T. cruzi*, incluyendo las etapas infectivas.

Como se mencionó, las peroxirredoxinas tienen residuos de cisteína en su sitio activo, que en el caso de las clasificadas en 2-Cys típicas son: la C52 es la C<sub>P</sub> y la C173 la C<sub>R</sub>. La Prx citosólica de *T. cruzi* tiene otras cinco cisteínas distribuidas en su secuencia: C3, C57, C111, C71 y C76. Los residuos C57 y C111 se exponen al solvente, el residuo C3 se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, y la 71 y la 76 no están expuestas al solvente por lo que podrían ser importantes en cuanto al mantenimiento de la estructura de la enzima (Piñeyro et al., 2005; Piñeyro et al., 2019). Además, se sabe que la C57, no se encuentra en mamíferos, únicamente se presenta en Tripanosomátidos y en algunas Arqueas; por otro lado, la C76 está presente en Tripanosomátidos y en Prxs mamíferas solo se encuentra en la peroxirredoxina 4 que se expresa en el retículo endoplásmico, siendo aún más interesante su estudio. En el laboratorio han sido estudiadas el papel de las cisteínas 52, 173, 57 y 111 en la funcionalidad de la enzima mediante mutagénesis sitio dirigida. Se sabe que las cisteínas que no son reactivas pueden ayudar a mantener la estructura que impacta en su funcionalidad; o modificar su sensibilidad a la hiperoxidación.

Además de la función catalítica enzimática mediante los residuos de cisteína C<sub>P</sub> y C<sub>R</sub>, se le atribuyen otras funciones a las Prx, como por ejemplo de chaperona holdasa y modulador de la respuesta inmune (Angelucci et al., 2016). Se ha demostrado que la Prx citosólica de *T. cruzi* presenta actividad chaperona, que aumenta cuando la enzima se sobreoxida, formando agregados de alto peso molecular (detallado en apartado 2.4 de la introducción) (Piñeyro et al., 2023).

También se cree que están involucradas en la activación de factores de transcripción en las vías de señalización que son mediadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, destacándose las que llevan a la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Niveles elevados de la Prx han sido encontrados en ciertos tipos de cáncer, lo cual se asocia directamente con la resistencia de tumores malignos a tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Ishii et al., 2012; Perkins et al., 2015).

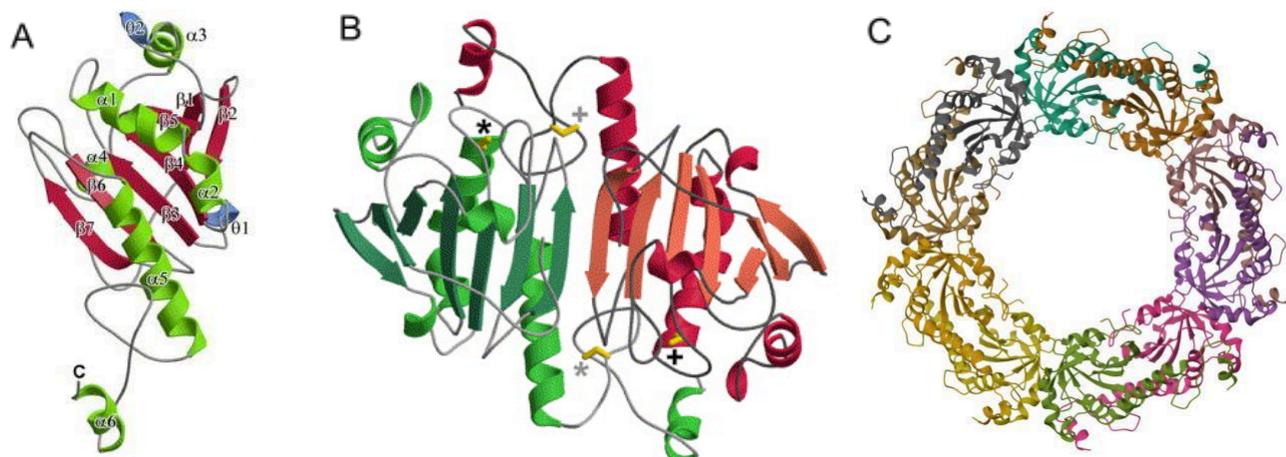
## 2.3 Clasificación y estructura de las peroxirredoxinas

Wood et al., (2003b) clasificó a las peroxirredoxinas eucariotas en tres clases: 2-Cys típicas, 2-Cys atípicas y 1-Cys, basándose tanto en los diferentes mecanismos de acción en la reducción de peróxido y el número de cisteínas que participa en la catálisis. Posteriormente, Soito et al., (2011) refinó la clasificación independientemente a la clasificación anterior, cuando encontraron seis subfamilias (Prx1, Prx6, Prx5, PrxQ, Tpx y AhpE), dos de las cuales se presentan sólo en procariotas (Tpx y AhpE) según Perkins et al., 2015. La subfamilia Prx1 es el de las Prxs de 2 Cys típicas, la subfamilia Prx6 incluye a las Prxs de 1 Cys y la subfamilia PrxQ incluye a las Prxs de 2 Cys atípicas. Para *Trypanosoma cruzi*, sus Prx se clasifican en Prx 2-Cys típicas.

De ahora en más la información corresponde a las Prx 2-Cys típicas, las cuales representan la subfamilia Prx1 que son más del 80% de las Prx en los parásitos (Soito et al., 2011) y la clase de Prx más grande en general (Gretes et al., 2012). Tienen capacidad de llevar a cabo múltiples funciones.

Las Prx son proteínas oligoméricas formadas por subunidades con una masa de aproximadamente 22 kDa. La estructura de cada subunidad es una variante del plegamiento de tiorredoxina (Trx) que también se presenta en proteínas similares como glutarredoxinas, proteínas de maduración del citocromo, glutatión S-transferasas, isomerasas de enlaces disulfuro de proteínas y glutatión peroxidasas (Copley et al., 2004; Hall et al., 2011; Knoops et al., 2007).

Se conoce la estructura cristalina de la triparredoxina peroxidasa de *T. cruzi* (TcTXNPx), en su estado activo reducido, donde es un decámero formado por un pentámero de dímeros la cual se presenta en la figura 2 (Piñeyro et al., 2005). La subunidad mínima de las Prx consta de una hoja beta de siete hebras envuelta por seis hélices alfa. La hélice alfa 2 y el extremo C-terminal contienen los residuos de Cys conservados necesarios para la catálisis y sufren importantes reordenamientos estructurales durante el ciclo catalítico (Nelson et al., 2011). Las subunidades se ensamblan para formar oligómeros, y luego estructuras organizadas jerárquicamente que se detallarán más adelante.

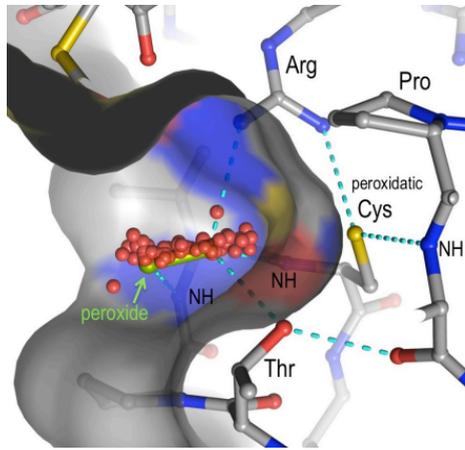


**Figura 2. Estructura de la c-TXNPx en estado reducido.** **A.** Estructura del monómero TcTXNPx. Diagrama estéreo del monómero TXNPx de *T. cruzi*. La estructura secundaria es codificada por colores: rojo para las hebras  $\beta$ , verde para las hélices  $\alpha$  y azul para las  $3_{10}$  hélices. **B.** Diagrama de cinta del dímero TcH6TXNPx. Los residuos de cisteína catalítica se indican en amarillo y están marcados con \* o + para distinguir los diferentes monómeros. Los signos negros \* y + indican residuos de cisteína peroxidática, y los de color gris indican residuos de cisteína en resolución.). **C.** Estructura del decámero TcTXNPx en estado reducido (PDB ID: 4LLR), con sus diferentes monómeros en distintos colores. Figura extraída de Piñeyro et al. (2005).

La cisteína peroxidática  $C_p$  preside el extremo N de la hélice alfa 2, dentro de un motivo conservado VCP, y tiene un pKa ácido (entre 5,0 y 6,0 (Winterbourn and Hampton, 2008)). Por otro lado, la cisteína resolutive  $C_r$  se encuentra más cerca del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. Como consecuencia de esta disposición, hay dos sitios activos simétricos en cada homodímero y no sería posible ninguna actividad catalítica para el monómero aislado (Angelucci et al., 2016, 2015, 2013; Gretes et al., 2012; Saccoccia et al., 2012; Wood et al., 2003b).

La tríada catalítica PXXXTXXC forma el bucle que precede la hélice alfa 2 y la primera vuelta de la hélice. Se forma de ocho residuos, tres de los cuales son conservados: prolina (Pro, P), treonina (Thr, T) que ocasionalmente es ocupada por

una serina (Ser, S), y también una arginina (Arg, R) en el comienzo de la cadena 6 de la hoja beta. Estos tres residuos se encuentran cerca uno del otro en el sitio activo peroxidático completamente plegado donde la cisteína peroxidática se ubica, como se ilustra en la figura 3 (Hall et al., 2011; Karplus, 2015).



**Figura 3.** Trípata catalítica en el sitio activo de una peroxirredoxina representativa. La estructura molecular se define con colores: carbonos grises, oxígenos rojos, nitrógenos azules y azufres amarillos. En el bolsillo de unión al sustrato se muestra una molécula de  $H_2O_2$  (verde) y enlaces de hidrógeno (líneas discontinuas color cian) de los átomos de la columna vertebral y las cadenas laterales conservadas que estabilizan a  $C_P$  y el sustrato. Los oxígenos representan las posiciones de las moléculas de agua que se unen a varios sitios activos de Prx completamente plegada sin ligando, sus posiciones definen un camino por donde los oxígenos del sustrato se estabilizarán a medida que se da la reacción. Imagen tomada de Karplus, 2015.

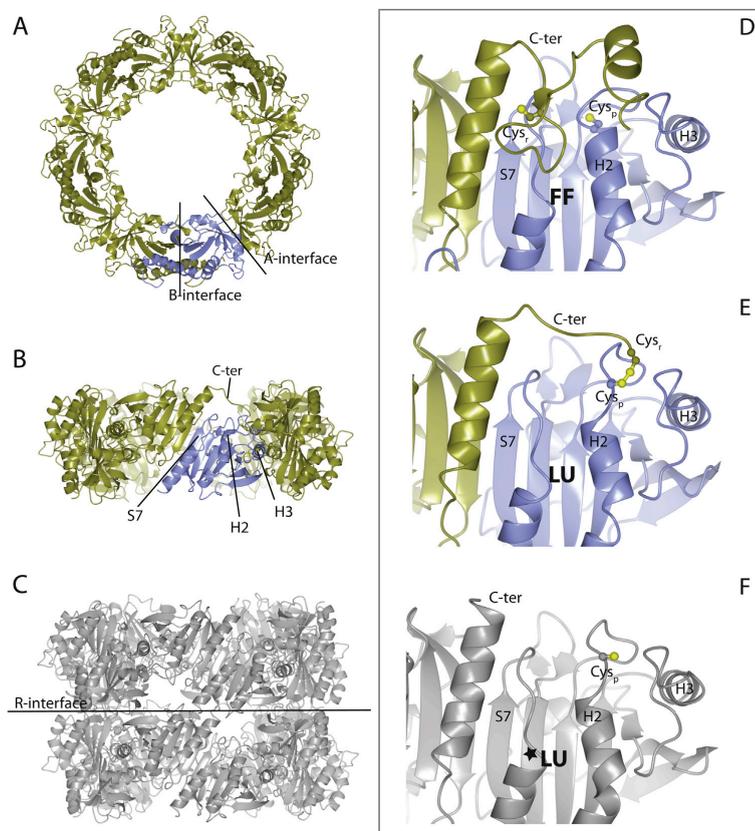
laterales conservadas que estabilizan a  $C_P$  y el sustrato. Los oxígenos representan las posiciones de las moléculas de agua que se unen a varios sitios activos de Prx completamente plegada sin ligando, sus posiciones definen un camino por donde los oxígenos del sustrato se estabilizarán a medida que se da la reacción. Imagen tomada de Karplus, 2015.

El primer nivel de organización es el homodímero simétrico, donde las subunidades que lo constituyen se disponen a través de una interfaz homóloga mostrada en la figura 4, llamada interfaz B que se forma por la hoja beta 7 y las hélices alfa 2 y 3, lo cual confiere una simetría interna doble a los dímeros, con dos sitios activos cada uno (Angelucci et al., 2016, 2015).

Cinco o seis homodímeros pueden oligomerizar y formar el anillo (Hall et al., 2009) que se constituye principalmente por la hélice alfa 3. De esta manera el anillo vuelve a ser simétrico, por la simetría de los homodímeros, como se observa en la figura 4. Éste es el estado de ensamblaje más estable de las Prx 2-Cys típicas y está dotado de actividad catalítica peroxidasa (Angelucci et al., 2015).

El anillo de Prx formado por oligomerización puede existir en dos estados como se ilustra en la figura 4. El estado FF (*fully folded*) se refiere a una conformación del sitio activo bien definida y bien conservada que tiene su tiolato de  $C_P$  en estado reducido, en el fondo de una bolsa lista para unirse y reaccionar con un sustrato de peróxido de hidrógeno (Hall et al., 2011, 2009; Nakamura et al.,

2010). En esta posición la accesibilidad estérica limitada de la cadena lateral, hace que se vea la  $C_p$  fuertemente impedida tanto para ser modificada por reactivos de tiol como para reaccionar con otro tiol y formar un disulfuro. Esta forma FF debe existir para todos las Prx que tienen actividad peroxidasa, porque es la conformación que promueve la reacción con el peróxido. El otro estado es el LU (*locally unfolded*), que es un conjunto de conformaciones que podrían incluir una cantidad sustancial de variaciones dentro de una Prx determinada o entre Prx. La característica esencial es que el sitio activo ya no se forma y la cadena lateral  $C_p$  queda expuesta y disponible para reaccionar con otro tiol para formar un disulfuro, ya sea que ese tiol sea la  $C_R$  de la Prx o de otra proteína (como para Prx 1-Cys). Como mínimo, los estados LU tienen una reordenación del segmento conservado PXXTXXC que incluye movimientos del bucle  $C_p$  y un desenrollado parcial de la primera vuelta de la hélice alfa 2 y el movimiento del C-terminal de la otra subunidad (Angelucci et al., 2016).



**Figura 4.** Estructura de Prx 2-Cys típico de tres parásitos eucariotas. **A.**

Representación en cinta del anillo decamérico LMW (bajo peso molecular) de *Schistosoma mansoni* Prx1 reducido (SmPrx1a; PDB: 3ztl). Un monómero es de color azul claro, todos los demás son de color dorado. El anillo se ve desde arriba, resaltando la disposición simétrica y la interfaz entre dímeros (interfaz A) y la interfaz intradímero (interfaz

B). **B.** Igual que en A pero girado 90°, mostrando una vista sagital del anillo. **C.** Representación en cinta de la estructura de retención de HMW (alto peso molecular) SmPrx1a (PDB: 3zvj) a pH ácido. Se muestra la interfaz entre anillos (interfaz R). **D.** Zoom del sitio activo completamente plegado (FF) de la triparredoxina peroxidasa reducida de *Leishmania major* (TXNPx, Prx1a; PDB: 4kif). C<sub>P</sub> y C<sub>R</sub> representado en bola y barra. **E.** Zoom del sitio activo oxidado de *L. braziliensis* Prx1a (PDB: 4kb3); El despliegue local (LU) tanto de la cola C-terminal de un monómero como de la hélice alfa 2 (H2) del homodímero obligado conduce a la formación del puente disulfuro entre C<sub>R</sub> y C<sub>P</sub> (en bola y barra). El sitio activo simétrico en la misma estructura (no mostrado para mayor claridad) está en la conformación FF. **F.** Zoom de la estructura desplegada local estabilizada (\*LU) de la forma de retención de SmPrx1a (PDB: 3zvj). Imagen tomada de Angelucci et al., 2016.

Tanto el dímero como el conjunto (do)decamerico de Prx, se denominan formas de bajo peso molecular (LMW) (Kimura et al., 2013), mientras que formas donde se ensamblan varios anillos formados por algunas LMW se denominan

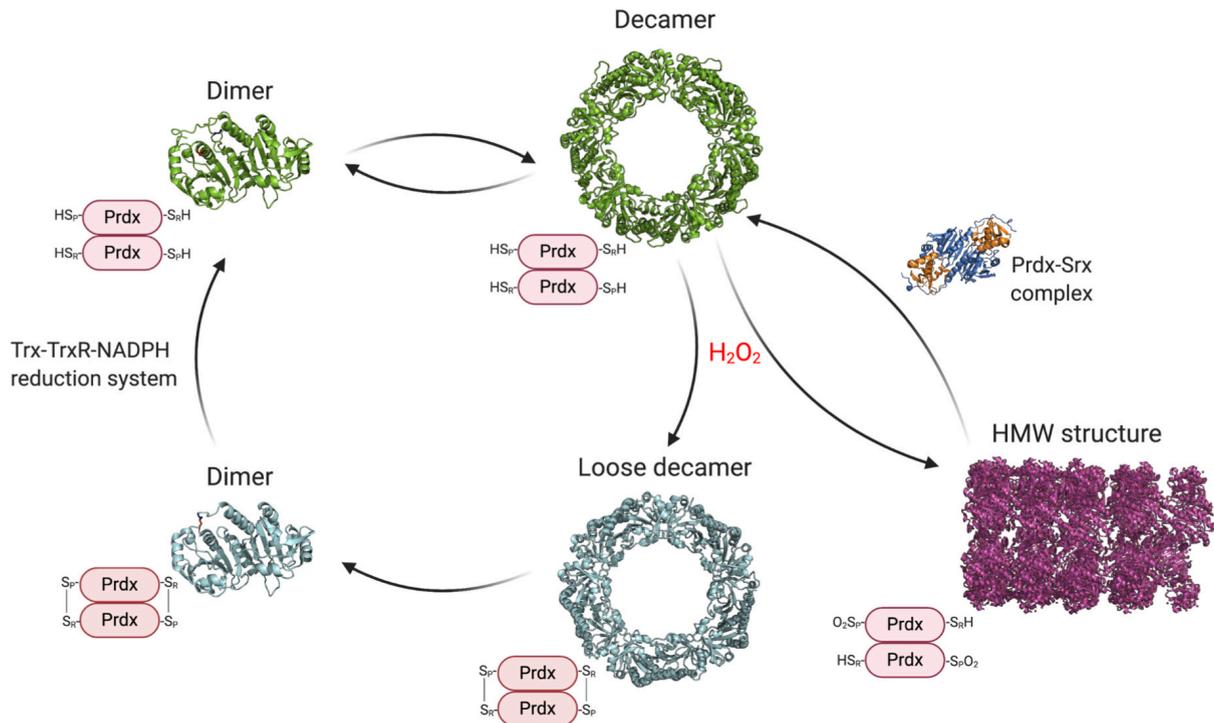
formas de alto peso molecular (HMW) (Angelucci et al., 2013; Jang et al., 2004; Kumsta and Jakob, 2009; Saccoccia et al., 2012).

La forma HMW de las Prx es más grande, ya que se deriva del ensamblaje de varios anillos (Jang et al., 2004; Kumsta and Jakob, 2009; Saccoccia et al., 2012). Esta forma, en algunas peroxirredoxinas, no tiene actividad peroxidasa, pero sí la actividad de chaperona holdasas que previenen la precipitación intracelular de proteínas. Estas proteínas blanco de la actividad chaperona aún no han sido caracterizadas para *T. cruzi* (Barranco-Medina et al., 2009; Kumsta and Jakob, 2009; Noichri et al., 2015).

No se ha informado que las Prx de 2-Cys atípicas (en las que el tiol de resolución puede provenir de la misma subunidad que contiene el C<sub>P</sub>) y las Prx 1-Cys (en las que el tiol de resolución proviene de GSH o posiblemente Trx) exhiban las variadas funciones de las Prx 2-Cys típicas. Por ejemplo, aún no ha sido informado que puedan actuar como chaperonas holdasas (Angelucci et al., 2016).

## 2.4 Ciclo catalítico de peroxirredoxinas de 2-Cys típicas

Como se mencionó, el ciclo catalítico en la Prx 2-Cys típica se forma de cinco pasos mostrados en la figura 5. Inicialmente la peroxidación, donde la cisteína peroxidática (C<sub>P</sub>) reacciona directamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual se convierte en ácido sulfénico (CysP-SOH) y la estructura es decamérica pero más suelta. Luego la resolución, donde la cisteína resolutive (C<sub>R</sub>) forma un disulfuro (CysP-SS-CysR). Posteriormente es necesario el reciclaje, donde el sistema tiorredoxina-tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH reduce el CysP-SS-CysR regenerando la forma activa con el plegamiento FF. El reciclaje puede darse en la forma dimérica (para muchas Prx existe una transición decámero-dímero) o en la forma decamérica debil. Eventualmente puede hiperoxidarse, es alternativa a la resolución y provoca la inactivación de la enzima. En caso que se de la hiperoxidación, es necesaria la reactivación, conversión dependiente de ATP y de la sulfirredoxina que hace volver a las Prx hiperoxidada en agregados de alto peso molecular (HMW) al estado reducido decamerico, estado oligomérico que se denominan agregados de bajo peso molecular (LMW).



**Figura 5.** Estados oligoméricos de Prxs. Existe un equilibrio dinámico entre el decámero y el dímero durante el ciclo catalítico, siendo el decámero reducido (SH) la forma activa. La oxidación deja en un estado más suelto a los decámeros provocando que se disocian en dímeros. Las estructuras representadas son *wild type S.typhimurium* Prdx1/AhpC (forma reducida (verde): PDB ID 4MA9; forma oxidada (azul claro): PDB ID 1EYP). Los decámeros también pueden apilarse para formar oligómeros HMW, y esto suele estar relacionado con la hiperoxidación, como lo que se muestra en violeta (Prdx3 humano: PDB ID 5JCG). Las Prx hiperoxidadas son vueltos a su forma activa por la sulfirredoxina (Srx) en un mecanismo dependiente de ATP, que se muestra con la estructura del complejo Prx-Srx (azul oscuro, Prdx1 humano: PDB ID 2RII). Imagen tomada de Bolduc et al., 2021.

La peroxidación se inicia con un ataque nucleofílico  $SN_2$  del tiolato de  $C_P$  sobre el sustrato de peróxido de hidrógeno para formar  $C_P-SOH$ . Esto requiere la forma de enzima FF para un ambiente estérico y electrostático que mejore la catálisis ya que orienta y activa el sustrato para su estabilización en la reacción como se mostró en la figura 3, esto reduce el pKa de  $C_P$  entonces se desprotona en gran medida, produciendo un tiolato que reacciona a  $20 M^{-1}s^{-1}$  aproximadamente con el peróxido (Karplus, 2015; Winterbourn and Hampton, 2008; Winterbourn and Metodiewa, 1999).

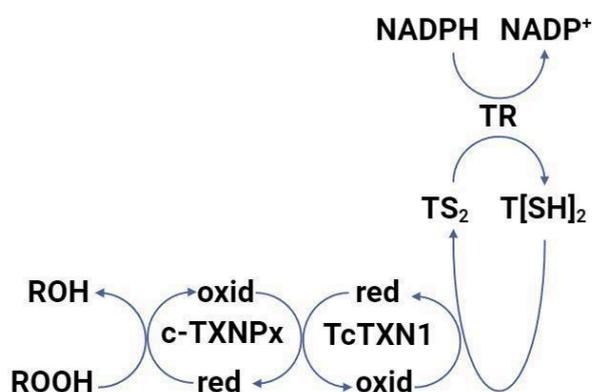
La resolución implica que un segundo tiol ataque el C<sub>P</sub>-SOH para crear un disulfuro y expulsar agua como grupo saliente. Requiere bastante reordenamiento estructural, donde hay un desenrollamiento de la hélice donde está la C<sub>P</sub> y un movimiento del C-terminal del monómero adyacente en el dímero, para que el grupo de C<sub>P</sub>-SOH sea accesible para el ataque del segundo tiol de C<sub>R</sub>. Según la dinámica típica de las proteínas, la forma C<sub>P</sub>-SOH de la enzima estaría en un rápido equilibrio entre las conformaciones FF y LU, generando un decámero “suelto” como se ilustra en la figura 5 y luego la formación de disulfuro C<sub>P</sub>-SS-C<sub>R</sub> atraparía covalentemente la proteína en la conformación LU, lo que desarmaría el decámero a subunidades diméricas (Bolduc et al., 2021; Hall et al., 2011; Karplus, 2015; Wood et al., 2002). En la Prx citosólica de *T. cruzi*, no se ha visto la transición dímero-decámero en las condiciones de estudio; por lo cual el reciclaje se daría en en la forma decamérica.

El reciclaje involucra la reducción del disulfuro por una disulfuro reductasa para formar la forma tiolato de C<sub>P</sub> de la enzima para que esté lista para el siguiente ciclo catalítico. Esta reducción también puede lograrse mediante varios compuestos de tiol, incluidas moléculas pequeñas como el ditioneitol (DTT). Para muchas Prx el reductor fisiológico parece ser la tiorredoxina, pero para algunas existe una Prx reductasa que es específica con un dominio similar (AhpF en bacterias que reducen a las Prx AhpC) o la triparredoxina (TXN en kinetoplastidos que reduce a las triparredoxinas peroxidasa) (Guerrero et al., 2000; Karplus, 2015; Lopez et al., 2000; Piñeyro et al., 2005; Poole et al., 2000; Tetaud et al., 2001; Wilkinson et al., 2000). El ataque inicial al disulfuro ocurre preferentemente en el azufre del residuo C<sub>R</sub> creando un disulfuro mixto entre el reductor y el residuo C<sub>R</sub>, liberando el tiol C<sub>P</sub> (Budde et al., 2003; Hall et al., 2009; Jönsson et al., 2007; Lian et al., 2012; Poole, 2005). El sustrato para la reacción de reciclaje es la forma localmente desplegada de la enzima y después de la reducción, la Prx se vuelve a plegar hasta la conformación completamente plegada y lista para el sustrato.

La hiperoxidación es una reacción alternativa a la resolución, ocurre si un segundo sustrato de peróxido se une al sitio activo y reacciona con C<sub>P</sub>-SOH para convertirlo en C<sub>P</sub>-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> (ácido sulfénico a sulfínico). Esta modificación inactiva a la enzima, no permitiendo el ciclo catalítico y por tanto la actividad peroxidasa. Los decámeros hiperoxidados se pueden apilar, formando estructuras HMW como se ilustra en la figura 5 (Bolduc et al., 2021; Karplus, 2015).

La reactivación de la forma hiperoxidada, convierte el ácido sulfínico en sulfénico, lo que la vuelve activa y puede seguir su ciclo catalítico, a través de la enzima sulfurredoxina (Srx) dependiente de ATP (Biteau et al., 2003; Karplus, 2015; Poole et al., 2000). La reacción requiere de la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosforilo de ATP al oxígeno sulfinato, seguida del ataque al azufre sulfinato por parte del tior Srx para desplazar un fosfato y formar un oxodisulfuro mixto Srx-Prx (tiosulfinato) (Lowther and Haynes, 2011).

Para el caso de *T. cruzi*, como se mencionó, existen dos peroxirredoxinas 2-Cys típicas, la triparredoxina peroxidasa mitocondrial (m-TXNPx) y la citosólica (c-TXNPx). Ambas reducen al  $H_2O_2$  en base al ciclo catalítico anteriormente mencionado, pero el paso de reciclaje de c-TXNPx es diferente al de mamíferos. La disulfuro reductasa del paso de reducción no es la tiorredoxina, sino una proteína relacionada y exclusiva de kinetoplastidos que es la triparredoxina (TcTXN1). La TcTXN1 luego de oxidarse debe volver al estado reducido, esto es dependiente de un tior de bajo peso molecular exclusivo de kinetoplastidos, el tripanotión, como se aprecia en la figura 6 (Arias et al., 2013; Krauth-Siegel et al., 2003; Krauth-Siegel and Comini, 2008; Nogoceke et al., 1997; Wilkinson et al., 2000).



**Figura 6.** La flavoproteína dependiente de NADPH, Tripanotión reductasa (TR), convierte el Tripanotión (TS<sub>2</sub>) en dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>). El dihidrotripanotión, a su vez, transfiere los equivalentes de reducción a la Triparredoxina (TcTXN1) que, a su vez, dona sus electrones a la Triparredoxina

Peroxidasa (c-TXNPx) permitiéndole reducir el hidroperóxido (ROOH) a su alcohol correspondiente (ROH). Imagen tomada de Wilkinson and Kelly (2003) y modificada por BioRender.com.

## 2.5 Hiperoxidación de peroxirredoxinas de 2-Cys típicas

Como se mencionó anteriormente, el estado  $C_P\text{-SOH}$  de una Prx puede reaccionar con un segundo peróxido e hiperoxidarse (o sobreoxidarse) a un  $Cys\text{-SO}_2^-$  (ácido sulfinico) y con otra molécula de peróxido  $Cys\text{-SO}_3^-$  (ácido sulfónico), que inactiva la función peroxidasa de la enzima. Las Prx procariotas suelen ser muy resistentes a la hiperoxidación, requieren concentraciones milimolares de sustrato y se les ha denominado isoformas robustas (Wood et al., 2003a). Por el contrario, muchas Prx eucariotas son sensibles a la hiperoxidación, sufriendo esta modificación a bajas concentraciones de peróxido. Por ejemplo, la PrxII humana se convierte casi por completo al estado hiperoxidado en presencia de sólo 40  $\mu\text{M}$  de peróxido (sin agente reductor presente), con una tasa de  $k_{\text{SOH}} \rightarrow k_{\text{SO}_2}$  del orden de  $1.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o superior (Haynes et al., 2013; Peskin et al., 2013). Estas isoformas se denominan como sensibles por los motivos de secuencia que se explican más abajo, ya que incluso a niveles bajos de peróxido son propensas a inactivarse por hiperoxidación (Perkins et al., 2014; Wood et al., 2003a).

La hiperoxidación sería una ventaja evolutiva, que permitiría la señalización de peróxido no relacionada con el estrés en eucariotas (Wood et al., 2003a). Las concentraciones bajas de peróxido se reducen eficientemente, pero cuando los niveles aumentan localmente debido a la producción intencionada por enzimas como NOX durante eventos de señalización, las Prx se inactivan y con esto podrían cumplir tres roles distintos. Uno es lo que se conoce como el modelo de compuertas, la inactivación de las Prxs permitiría que el peróxido de hidrógeno se acumule lo suficiente en una área local para oxidar las proteínas que son objetivo y que de otra manera no se oxidarían. Otro sería que las Prxs al inactivarse como peroxidases, aumentan su actividad chaperona y por último que su inactivación limite la oxidación de tioredoxinas, dejando tioredoxina reducida para reducir otros blancos proteicos oxidados (Giorgio et al., 2007). La desregulación de esta vía de señalización proporciona una explicación de cómo la eliminación de isoformas sensibles de mamíferos (PrxI-IV) podría resultar en el desarrollo de cánceres (Neumann et al., 2003), aumento de la senescencia celular (Han et al., 2005) y tejidos y órganos malformados (Luchi et al., 2009; Li et al., 2008).

Perkins et al. (2013) demostraron que mutaciones conservadoras como C<sub>R</sub>→Ser o Ala, comúnmente usadas para estudiar propiedades de Prxs, pueden perturbar el empaquetamiento C-terminal lo suficiente como para cambiar el equilibrio entre FF y LU, hacia LU y hacer que la enzima sea menos sensible. Parmigiani et al. (2008) demostró que tales modulaciones de la sensibilidad ocurren fisiológicamente, ya que la acetilación de la lisina C-terminal de PrxI humano vuelve a la enzima robusta. Al igual que la acetilación N-terminal de la lisina de PrxII (Seo et al., 2009). Por lo que una pequeña alteración, incluso de un residuo, puede reducir la fracción de la población activa de FF en órdenes de magnitud y, por tanto, inhibir la hiperoxidación.

En el caso de *T. cruzi*, ambas peroxirredoxinas son sensibles a la hiperoxidación, tanto las Prx citosólica como mitocondrial contienen los elementos estructurales presentes en las Prx más sensibles que son los motivos que se presentan contra el sitio activo en la forma FF: "GGLG" e "YF" (Piñeyro et al., 2019; Hall et al., 2011; Koo et al., 2002; Poynton et al., 2016; Sayed and Williams, 2004).

Piñeyro et al. (2023) demostraron que c-TXNPx está fisiológicamente hiperoxidada durante la infección. En los fagolisosomas, organelos donde el parásito reside ni bien es internalizado, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede alcanzar valores elevados de 100 μM (Melo et al., 2003) por lo que al menos parte de la proteína se hiperoxida. Teniendo en cuenta que los parásitos sobreviven al fagolisosoma, la hiperoxidación de Prx resulta en un papel importante en el proceso de infección, y podrían estar actuando como chaperonas moleculares y protegiendo a los parásitos del estrés por calor, posiblemente ayudando a proteínas importantes en el metabolismo y en la integridad celular, aunque para *T. cruzi* no se conocen las posibles proteínas sustrato de esta actividad .

La hiperoxidación de Prx tiene como consecuencia la pérdida de función o la ganancia de función. Pierde actividad peroxidasa, que ha sido mencionada anteriormente, aceptando inicialmente el "modelo de Floodgate" (Wood et al., 2003a). Por otro lado, la hiperoxidación puede llevar a la aparición de una nueva función, la actividad chaperona que protege a las proteínas de su agregación, dejando en evidencia que las Prx son multifuncionales (Cho et al., 2014; Heppner et al., 2017).

La descripción de la actividad chaperona en Prx 2-Cys proviene de estudios en la termotolerancia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que conducen a

descubrir que la enzima Prx 2-Cys Tsa1 puede proteger contra la agregación térmica de proteínas *in vitro* e *in vivo*, independientemente de su actividad peroxidasa al actuar como chaperona molecular (Jang et al., 2004). Esta actividad es inducida por cantidades aumentadas de peróxido de hidrógeno o por elevada temperatura, porque se forman los complejos de alto peso molecular (HMW) claves en la actividad chaperona, como se menciona en el apartado de estructura y clasificación de peroxirredoxinas. La actividad chaperona no requiere ninguna cisteína de las que son esenciales para la actividad tiorredoxina peroxidasa en ausencia de hiperoxidación, pero sí son necesarias en la formación reversible de los complejos HMW, especialmente la que reacciona con el peróxido. De esta manera, la hiperoxidación inactiva la actividad peroxidasa de Prx, promueve la actividad chaperona que reduce la agregación proteica de algunas proteínas blanco en casos de estrés celular, y así promueve la supervivencia de células expuestas al estrés térmico o químico por peróxido de hidrógeno (Jang et al., 2004; Teixeira et al., 2015). Ensayos *in vitro* han sugerido que la actividad chaperona es una característica general de las Prx 2-Cys, compartida por ejemplo con Prx1 y Prx2 humanos (Jang et al., 2006; Moon et al., 2005), y Prx de plantas (König et al., 2013), protozoos (Piñeyro et al., 2019; Teixeira et al., 2015) y bacterias (Chuang et al., 2006).

## 2.6 Peroxirredoxinas en parásitos

La supervivencia y virulencia de los parásitos dependen de defensas efectivas contra las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que el hospedador produce en su sistema inmunológico. Como se ha mencionado, la defensa que aquí estudiamos son las peroxirredoxinas, enzimas ubicuas fundamentales que defienden al parásito.

En el trabajo de Gretes et al. (2012) se estudiaron todos los Prx relevantes en algunas especies elegidas, como protozoos (apicomplejos unicelulares, kinetoplastidos y otros protistas), helmintos (gusanos multicelulares nemátodos, céstodos y tremátodos) y hongos parásitos. Encontraron que, en la base de datos PREX (Soito et al., 2011), de las 97 Prx en parásitos identificados, la mayoría corresponde a la subfamilia Prx1 (80 miembros y al menos 1 en cada especie de

parásito). Las subfamilias Prx5, Prx6, PrxQ, Tpx y AphE se encuentran en menor frecuencia. Los parásitos del género *Plasmodium* se caracterizan por dotarse de una variedad de Prx, dos enzimas de Prx1, una Prx6, una Prx5 y otra PrxQ. Aparte de *Plasmodium*, PrxQ se produce sólo en el hongo *Cryptococcus neoformans*, Prx5 se encuentra solo en *Toxoplasma gondii* y los Prx6 fueron identificados solo en *C. neoformans*, *T. gondii* y gusanos nemátodos.

En los parásitos kinetoplástidos se incluye *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, el primero agente de la tripanosomiasis americana y el segundo de la africana. También *Leishmania*, causantes de las leishmaniasis desfigurantes, ya sea cutáneas o mucocutáneas, y fatales que son las viscerales. Son parásitos intracelulares, los cuales deben defenderse de ROS y ONOO<sup>-</sup>, por lo que las Prx son importantes en la supervivencia del parásito en el hospedador como ya se mencionó.

En kinetoplástidos solo se han descrito Prx de la subfamilia Prx1. En *Leishmania* se expresa Prx1a en la etapa de amastigostes y promastigostes, y eventualmente en algunas especies Prx1m. Para el caso de *T. cruzi* o *T. brucei* las Prx presentes son Prx1a y Prx1m, en el citosol y mitocondria respectivamente (Gretes et al., 2012).

Entonces, como se mencionó, Prx constituye una defensa efectiva para el estrés oxidativo en muchos parásitos y es por ello que son un blanco importante para el desarrollo de vacunas o medicamentos, con el fin de inhibir su actividad.

## 2.7 Actividad crucial de peroxirredoxinas en virulencia y cómo combatirla

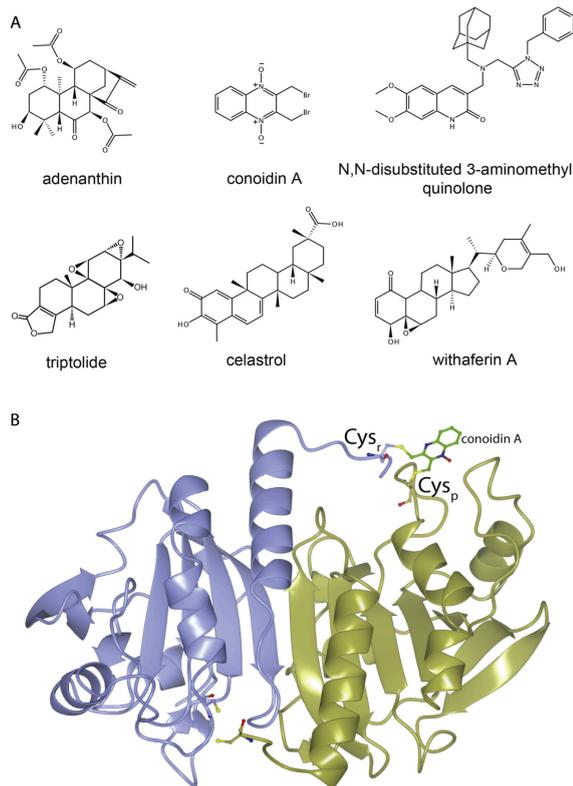
Las Prx suelen estar muy presentes desempeñando muchas funciones fisiológicas que aún se siguen investigando, por lo que pueden constituir objetivos farmacológicos potenciales para varias condiciones patológicas de enfermedades parasitarias: Enfermedad de Chagas, malaria, leishmaniasis y esquistosomiasis.

Para el caso de *T. cruzi* se ha demostrado que las dos Prxs, la TXNPrx mitocondrial y citosólica, pueden constituir factores de virulencia de la enfermedad de Chagas (Piñeyro et al., 2008). La sobreexpresión de m-TXNPrx y c-TXNPrx hizo que los parásitos fueran más resistentes a las defensas oxidativas como el peroxinitrito de los macrófagos y también del producido endógenamente, lo cual

aumenta la evidencia de que son importantes para la virulencia (Piacenza et al., 2008). El mismo efecto de supervivencia se observó en células no fagocíticas, donde los parásitos que sobreexpresan TXNPx fueron más eficientes en los ensayos de infección (Piñeyro et al. 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que la reducción de la expresión de Prx mediante métodos genéticos como la eliminación de genes (Knock Out (KO)) o la interferencia de ARN (ARNi), es letal para los parásitos tanto *in vivo* como *in vitro*. En la cepa *Plasmodium falciparum*, se eliminó el gen de la Prx de 2-Cys típica mostrando hipersensibilidad al estrés por calor y al estrés oxidativo *in vitro* (Kimura et al., 2013). El mismo tratamiento se realizó en *P. berghei*, donde el KO de tiorredoxina peroxidasa-1, provocó la muerte de los parásitos en la etapa hepática en ratones infectados por *P. berghei* (Usui et al., 2015). Los gusanos *S. mansoni* cultivados en los que la Prx de 2-Cys típica de citosol o núcleo fue silenciada por ARNi mostraron una tasa de supervivencia menor que los controles ante el estrés oxidativo inducido por 100 a 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sayed et al., 2006).

Evidencias crecientes exponen a las Prx como uno de los principales factores de virulencia parásitos, por lo que se han estudiado inhibidores para su actividad peroxidasa en la virulencia, usando la droga conoidina A detallada en la figura 7, inhibidor irreversible de la actividad peroxidasa de Prx que resultó tóxico para *Trypanosoma cruzi* (Specker et al., 2022), *Plasmodium* (Brizuela et al., 2014) y *Toxoplasma* (Haraldsen et al., 2009). Sin embargo, este inhibidor puede unirse a otras enzimas que tienen un residuo Cys en el sitio activo (Gretes et al., 2012; Haraldsen et al., 2009).



**Figura 7.** Un resumen de inhibidores del 2-Cys Prx eucariota. **A.** Estructuras químicas de los inhibidores de la peroxirredoxina, entre ellas conoidina A. **B.** Representación en cinta del homodímero obligado de Prx de *Ancylostoma ceylanicum*, un parásito humano de anquilostoma (PDB ID: 4kw6), que muestra conoidina A unida covalentemente a C<sub>R</sub> y C<sub>P</sub> (todo en representación de bola y palo, coloreado por código atómico). Imagen tomada de Angelucci et al. (2016).

Perkins et al. (2013) propusieron que el equilibrio entre FF y LU podría ser desplazado por una molécula pequeña para estabilizar una conformación única (FF o LU), evitando los cambios estructurales necesarios para la catálisis de Prx. Por ejemplo, la región C-terminal de la subfamilia Prx1 en la forma LU produciría directamente la pérdida de actividad peroxidasa. Alternativamente, si se estabiliza la forma FF y se bloquea la resolución de C<sub>P</sub> con C<sub>R</sub>, mejoraría directamente la actividad pero conduciría indirectamente a la inhibición al promover la hiperoxidación. Debido a que la mayoría de los patógenos, incluido *T. cruzi*, no poseen un Srx para rescatar la forma hiperoxidada de la enzima, estos Prx estarían permanentemente inactivados y luego degradados. Además, la afinidad de dicho inhibidor podría ajustarse para que se disocie e inactive otras Prx, llevando a una mayor potencia más allá de la 1:1 (Perkins et al., 2014).

En la terapia antiparasitaria sería deseable que se desarrollen inhibidores selectivos para la enzima del parásito pero no la humana, además también se busca un segundo tipo de selectividad que inhiba una o ambas funciones, la holdasa o peroxidasa de Prx (Angelucci et al., 2016). Se sabe que sus sitios activos se encuentran ampliamente conservados por lo que es difícil generar inhibidores con selectividad para Prx.

La función peroxidasa puede ser específicamente relevante en algunos parásitos, pero en muchos otros no suele ser de esta manera. Son múltiples las funciones conocidas que las Prx pueden desempeñar, por lo cual resulta difícil y desafiante comprender a cuál se debe atacar para disminuir la virulencia del parásito, y si la función definida y atacada en un parásito es la misma que en otro (Angelucci et al., 2016).

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivos generales

Analizar el papel de residuos de cisteína que no están en el sitio activo de la c-TXNPx, las cisteínas 71 y 76, en la funcionalidad de enzima.

### 3.2 Objetivos específicos

#### 3.2.1 Creación de mutantes de cisteína.

Obtener proteínas mutantes de la c-TXNPx en dos cisteínas, C71 y C76 por mutagénesis sitio dirigida, con posterior expresión en *E. coli* M15 y purificación en columnas de afinidad.

#### 3.2.2 Análisis de la funcionalidad: actividad peroxidasa.

Analizar la actividad peroxidasa a través del método de ensayo acoplado de las proteínas mutantes.

#### 3.2.3 Análisis de la oligomerización.

Analizar el estado de oligomerización de las proteínas mutantes.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Soluciones

##### Soluciones para la purificación de ADN plasmídico

###### *Por lisis alcalina*

- Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8).
- Solución II: 0,1 N NaOH, 1% SDS.
- Solución III: 3 M CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K y 11,5% ácido acético glacial.

La solución I y II se autoclavan y almacenan a 4°C. La solución II se prepara en el momento de realizar el protocolo de lisis de las células para obtener el ADN plasmídico.

###### *Por protocolo de QIAprep® Spin Miniprep Kit (50)*

- Buffer P1 con RNAsa A 100 µg/mL.
- Buffer P2
- Buffer N3
- Buffer PE
- Agua libre de DNAsas

#### 4.1.2 Soluciones amortiguadoras o buffers y soluciones

##### Buffers en geles de agarosa:

- Buffer de corrida Tris-Acetato (TAE) solución stock 50X: 242 g/L Tris Base, 5,7% ácido acético glacial, 0.05 M EDTA. Solución de trabajo 1X.
- Buffer de muestra 10X: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM EDTA, 0,03% azul de bromofenol, 60% glicerol. Solución de trabajo 1X.
- Buffer de muestra 6X: 0,25% azul bromofenol, 0,25% xylene cyanol FF, 30% glicerol en agua. Solución de trabajo 1X.

##### Solución para preparación de células quimiocompetentes:

- *Transformation and storage solution* o TSS: 20% PEG 8000 o 3350, 10% DMSO, 100 mM MgCl<sub>2</sub> \* H<sub>2</sub>O en 100 mL de medio LB (Schmelling, 2016).

### Solución utilizada en la expresión de los mutantes

- IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) 0.78 M

### Buffers para la purificación de proteínas:

- Buffer de inicio nativo: 50 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,6.
- Buffer de inicio desnaturizante: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 8 M urea, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 8.
- Buffer de lavado nativo: 50 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 100 mM imidazol, pH 7,6.
- Buffer de elución nativo: 50 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 400 mM imidazol, pH 7,6.
- Buffer de elución desnaturizante: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 8 M urea, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 8.

### Buffers y soluciones en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):

- Buffer stock para gel concentrador: 1 M Tris-HCl, pH 6,8
- Buffer stock para gel separador: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%
- Acrilamida 30%
- Persulfato de amonio (PSA) 10%
- TEMED
- Buffer de corrida Tris-glicina-SDS 10% solución stock 10X: 250 mM Tris, 2,5 M Glicina, 10% SDS.
- Buffer de muestra 6X con ditioneitol (DTT): 200 mM Tris pH 6,8, 400 mM DTT, 8% SDS, 0,4% azul de bromofenol, 40% glicerol. Solución de trabajo 1X.

### Buffer en transferencia de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a membrana de nitrocelulosa:

- Buffer de transferencia: 48 mM Tris, 39 mM glicina y 0,0375% SDS.

### Soluciones o buffers en Western Blot revelado con HRP-Peroxidasa:

- Solución Ponceau 0,2% y ácido acético 10%.
- Buffer fosfato salino (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- Solución de bloqueo: 0,1% Tween-20 y 5% BSA en PBS.
- Solución de incubación de anticuerpos: 0,1% Tween-20 y 0,1% BSA en PBS.

- Solución de lavado: 0,1% Tween-20 en PBS.
- Solución de revelado: *Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* de *Thermo Scientific*.

#### Soluciones utilizadas para la tinción con azul de coomassie:

- Azul de coomassie 0,25%
- Destain: 30% etanol, 10% ácido acético

#### Buffer para diálisis proteica:

- Buffer: 50 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), 100 mM NaCl, pH 7,6.

#### Buffer del ensayo de actividad peroxidasa por ensayo acoplado

- Buffer: 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,4.

### 4.1.3 Cepas de *Escherichia coli* (*E. Coli*)

#### DH5- $\alpha$

Su genotipo es *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 delA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

Cepa ampliamente utilizada para la propagación de plásmidos. Las distintas mutaciones tienen efecto en sus enzimas: *endA1* inactiva una endonucleasa intracelular que degrada el ADN plasmídico; *hsdR17* elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación-restricción *EcoKI*, y por lo tanto los fragmentos de ADN que poseen metilaciones en los sitios *EcoKI* no son degradados; y *recA* elimina la posibilidad de recombinación homóloga.

#### M15

Su genotipo es *F-,  $\Phi$ 80 $\Delta$ lacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR*, y contienen al plásmido *pREP4*, el que le confiere resistencia al antibiótico kanamicina y una expresión constitutiva del represor *lac*, lo que la hace propicia para su utilización como cepa de expresión. En estas cepas la expresión es regulada por el promotor T5 del fago de *E. coli*.

#### 4.1.4 Medios de cultivo

Para el crecimiento de bacterias se usó el medio nutritivo LB (Luria-Bertani) en medio sólido y líquido. El sólido tiene agar al 15%. Contiene 10 g/L de triptona y 5 g/L de extracto de levadura, ambos son nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo de bacterias. Para mantener un equilibrio osmótico apropiado cuenta con 10 g/L de cloruro de sodio. En algunos casos se complementa el medio con glucosa al 1%.

#### 4.1.5 Vectores plasmídicos

##### pQE-30 (QIAGEN)

Es un vector de expresión que está diseñado para la clonación directa de productos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y permite su selección por ampicilina. A partir de que el promotor T5 sea reconocido por la ARN polimerasa de *E. Coli* puede activarse la transcripción, o puede generarse la represión génica por el operón lac O. Además, posee un sitio de unión al ribosoma para generar una alta tasa de traducción. De esta manera, permite la obtención de proteínas recombinantes, las cuales fueron fusionadas a una cola de seis residuos de histidinas en el extremo N-terminal, lo cual permitirá su purificación mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC) conteniendo una resina de ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA).

##### pGEM-T easy

Es un vector de clonado, que en su conformación lineal posee timidinas 3' terminales en ambos extremos, característica que lo hace apropiado para la inserción y ligación de productos de PCR en cuyos extremos poseen adeninas terminales.

#### 4.1.6 Enzimas

##### 4.1.6.1 ADN polimerasas

Se utilizan para la amplificación del material genético la enzima ADN polimerasa termoestable *Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit* de

*ThermoScientific*, el cual amplifica el plásmido entero. Por otro lado, para corroborar la presencia del inserto y por ende la mutagénesis, se utiliza la solución *MangoMix*<sup>™</sup> que es una mezcla de reacción 2x cómoda y lista para usar que contiene ADN polimerasa *MangoTaq*<sup>™</sup>, MgCl<sub>2</sub> y dNTP, y solo requiere la adición de agua, ADN y cebadores.

#### 4.1.6.2 Enzimas de restricción

Se utiliza la endonucleasa *DpnI* de *Biolabs* para eliminar el ADN parental después de la PCR. Se utilizan las enzimas *Bam*HI 10 U/μL de *Fermentas* y *Hind*III 15 U/μL de *Invitrogen*.

#### 4.1.6.3 ADN ligasas

Se utiliza *T4 DNA ligasa* (3 U/μL) que procede del bacteriófago T4 de *Promega* (cat. numb. M180A).

#### 4.1.7 Reactivos químicos y otros materiales

Se partió de construcciones plasmídicas realizadas previamente en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Como pQE-30 - c-TXNP de *Trypanosoma cruzi* y además pGEM-T easy - PTREX y pGEM-T easy - inserto control.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Métodos para preparación de cepas de *E. Coli* DH5-α

#### 4.2.1.1 Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes son necesarias para incorporar en ellas plásmidos por electrochoques. Para generarlas se parte de stocks de cepas bacterianas *E. Coli* DH5-α, se inoculan en 3 mL de LB y se cultivan durante toda la noche en agitación constante a 37°C. Luego se transfieren los 3 mL a 200 mL de LB sin antibiótico, para luego incubar a 37°C por el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Luego los 200 mL de cultivo se centrifugan a 4000

x.g a 4°C durante 15 minutos para obtener el pellet celular, descartando el medio de cultivo. Posteriormente, el procedimiento se realiza en hielo y a 4°C para mantener la cadena de frío. Las células obtenidas se resolubilizan en 45 mL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril y fría y se centrifugan a 4000 x.g a 4°C durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante. Se resolubilizan en dos tubos con 20 mL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril y fría, luego se centrifugan a 4000 x.g a 4°C durante 15 minutos, descartando el sobrenadante. Estas células se resolubilizan en un tubo con 4 mL de glicerol al 10% estéril y se centrifugaron a 4000 x.g durante 15 minutos. Por último, las bacterias se resolubilizan en 600 µL de glicerol al 10% estéril. Se alicuotan en 40 µL y se conservan a -70°C hasta su uso.

#### 4.2.1.2 Transformación de células electrocompetentes

Para introducir ADN plasmídico dentro de bacterias competentes en cultivo se realiza la técnica de electroporación que consiste en la aplicación de pulsos de corriente eléctrica, para así generar la apertura de poros transitorios por donde se da la entrada de ADN exógeno.

Las bacterias *E. Coli* electrocompetentes mantenidas a -70°C se descongelan en hielo. Se toma 1 µL del plásmido de concentración entre 10 y 40 ng/µL y se mezcla con 40 µL de células competentes. Se introduce la mezcla en una cubeta de electroporación de 1 mm fría y estéril y se le aplica un pulso eléctrico unipolar de 500 V y 8 milisegundos. Posteriormente se agrega LB y se incuban en un eppendorf a 37°C durante 1 hora, con agitación. Luego se transfieren entre 100 y 300 µL del cultivo a placas de Petri que contienen medio LB agar semisólido con el antibiótico apropiado.

Con la cepa DH5-α se usa el antibiótico ampicilina a 0.1 mg/mL para así seleccionar el vector pQE-30.

#### 4.2.1.3 Preparación de células quimiocompetentes

Las células quimiocompetentes son necesarias para incorporar en ellas plásmidos por tratamientos térmicos. Para generarlas se parte de stocks de cepas bacterianas *E. Coli* DH5-α, donde se inoculan en 3 mL de LB y se cultivan durante toda la noche en agitación constante a 37°C. Posteriormente se transfieren 100 µL de precultivo a 10 mL de LB, esto se realiza en 3 tubos (uno dedicado a la medida de absorbancia), y se incuba una hora y media a dos a 37°C con agitación vigorosa,

monitoreando la absorbancia a 600 nm. Cuando la absorbancia alcanza 0.4 se transfiere el contenido de los dos tubos a otros estériles de centrifuga. Se enfría a 0 °C en hielo por 10 minutos. Se recupera a las células por centrifugación a 1000 x.g por 10 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante resultante, se colocan los tubos boca abajo en toallas de papel por 1 minuto para escurrir los últimos mililitros de LB. Se resolubilizan cada pellet en 5 mL de solución fría de TSS por agitación o vortexeo suave. Luego las células son recuperadas por centrifugación a 1000 x.g por 10 min a 4°C inmediatamente. Se descarta el sobrenadante y nuevamente se deja escurrir los últimos mililitros de LB con los tubos boca abajo sobre papel. Se resolubilizan el pellet en 1 mL de solución fría de TSS por agitación o vortexeo suave. Finalmente, se alicuota y congela a -70°C, o inmediatamente son usadas para transformar con previa incubación en hielo de una a una hora y media.

#### 4.2.1.4 Transformación de células quimiocompetentes

Para introducir ADN plasmídico dentro de bacterias competentes en cultivo se realiza la técnica de quimioporación que consiste en el tratamiento del cultivo con distintas temperaturas en tiempos diferentes para así generar la apertura de poros en la membrana, necesarios para la entrada de ADN plasmídico. Se agrega de 1 a 5 µL de plásmido (10% del volumen de bacterias) a 12 µL de bacterias *E. Coli* quimiocompetentes mantenidas en eppendorf en frío y se incuba en hielo por 15 minutos. Se realiza heat shock a 42°C por 30 segundos. Luego se incuba en hielo por 1 minuto. Posteriormente se agrega 250 µL de medio LB y se agita a 37°C por 1 hora. Luego se plaquea entre 100 y 300 µL en LB agar con ampicilina 0,1 mg/mL.

### 4.2.2 Métodos para el análisis de ADN

#### 4.2.2.1 Purificación de ADN plasmídico a partir de bacterias

##### *Por protocolo de lisis alcalina*

Se parte de 3 mL de un cultivo de bacterias (picado de la placa) incubado durante toda la noche con el antibiótico apropiado para la selección del plásmido. Luego se lo centrifuga a 12000 rpm (revoluciones por minuto) por 3 minutos, se remueve el sobrenadante por aspiración con pipeta y se resolubiliza el precipitado en 100 µL de solución + 1 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se vortexea. Se agrega 200

µL de solución II fresca y luego se mezcla por inversión de tubos (15 veces), se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Se agrega 150 µL de solución III y nuevamente se mezcla por inversión (15 veces) y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos. Se transfieren 400 µL del sobrenadante a un eppendorf nuevo y se agrega 800 µL de etanol 100% para luego mezclar por inversión. Se centrifuga a 12000 rpm 5 minutos, y se remueve el sobrenadante con pipeta. Se lava el precipitado con 500 µL de etanol 75%. Se centrifuga brevemente y se retira el sobrenadante con pipeta. Se deja secar el precipitado y se resolubiliza en 50 µL de agua. Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y queda apto para mandar a secuenciar 10 µL de la minipreparación por lisis alcalina.

*Por protocolo de QIAprep® Spin Miniprep Kit (50)*

Se sigue el protocolo administrado por el kit comercial. Este permite aislar, a partir de un cultivo bacteriano, ADN plasmídico con baja cantidad de contaminantes. Luego de precipitado, el ADN queda retenido en una resina donde se lava y se eluye con agua libre de DNAsas.

#### 4.2.2.2 Cuantificación de ADN plasmídico

La concentración de ADN en solución se determina por espectrofotometría de luz a 260 nm debido a que a esta longitud de onda las bases púricas y pirimidínicas del ADN presentan un máximo de absorción. De este modo, se considera que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADN de doble cadena. La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm donde la relación de densidad óptica 260/280 debe ser entre 1,8 y 2.

#### 4.2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa es capaz de resolver fragmentos de ADN donde se localizan con el agregado de un agente intercalante de ADN y su posterior visualización bajo luz ultravioleta. Bajo la acción de un campo eléctrico, las moléculas migran a una velocidad que es inversamente proporcional al  $\log_{10}$  de su tamaño en pares de bases. La velocidad de migración se encuentra afectada por la concentración de la agarosa en gel, por el tamaño y la conformación de ADN, el voltaje aplicado, la temperatura y la composición del buffer de corrida.

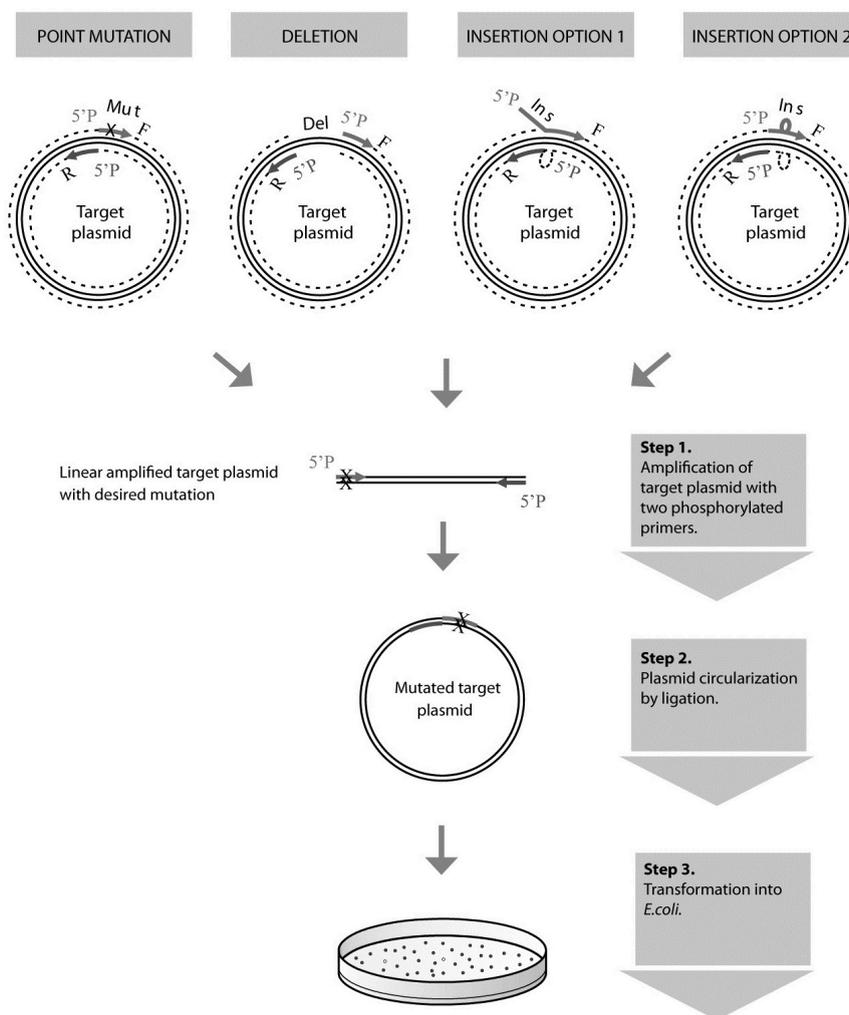
Se usan geles de agarosa al 1%, 1,5% y 2%, a menor concentración de agarosa mayor tamaño de ADN a correr y viceversa. La agarosa es fundida con buffer de corrida TAE 1X en un microondas hasta disolverla completamente. Luego se deja enfriar para posteriormente adicionar el intercalante de ADN GoodView®. Luego de gelificada la agarosa, se realiza la inmersión del gel en el buffer de corrida en la cuba de electroforesis, y así se siembran las muestras con buffer de muestra a una concentración final 1X y se aplica un voltaje de 100 V por media hora.

#### 4.2.2.4 Mutagénesis por PCR del gen codificante para las proteínas c-TXNPx-C71S y c-TXNPxC76S

Para generar la mutagénesis sitio dirigida por PCR, se usa el vector pQE-30 con el inserto de c-TXNPx clonado existente en el laboratorio a partir de una preparación plasmídica nueva, con un par de cebadores específicos para generar el cambio de C71 y C76 a serina. La enzima ADN polimerasa utilizada fue la *Phusion™ ADN polimerasa (ThermoScientific)* y cebadores específicos que se construyeron a partir de las especificaciones del kit que se muestra en la figura 8, siendo las secuencias nucleotídicas para los distintos mutantes los mostrados en la tabla 1.

**Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la mutagénesis sitio dirigida por PCR**

Nombre	Secuencia 5´-/5Phos/ a -3´
C71S forward	TGACATTGGCagcGAGGTGCTTG
C71S reverse	GAGAACTCCTTCACACGGTC
C76S forward	GGTGCTTGCCagcTCCATGGACA
C76S reverse	TCGCAGCCAATGTCAGAGAAC



**Figura 8.**

Esquema de los distintos pasos para la mutagénesis sitio dirigida, para la enzima ADN polimerasa de *ThermoScientific Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit*.

El volumen de reacción es de 20  $\mu\text{L}$ , el cual contiene buffer *Phusion HF 1X* con o sin enriquecimiento de guaninas y citosinas (Buffer GC), 0,02 U/ $\mu\text{L}$  de *Phusion* ADN Polimerasa, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada cebador específico *forward* o *reverse* necesario para inducir la mutagénesis, DMSO al 3% y el ADN correspondiente al vector con el inserto con una concentración dentro de 0,002 a 0,2 ng/ $\mu\text{L}$ .

Las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción fueron: 98°C 30 seg 1 ciclo; 35 ciclos de: 98°C 10 seg, 63°C para c-TXNPxC71S 30 seg o 65,8°C para c-TXNPxC76S 30 seg, 72°C 2 min; 72°C 5 min 1 ciclo; -4°C 10 seg 1 ciclo.

Posteriormente se realiza gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del plásmido amplificado.

Luego el producto de PCR es tratado con *DpnI* de Biolabs a una concentración final de 0,4 U/mL, por dos horas a 37°C, este paso degrada el ADN metilado. Posteriormente se realiza la ligación del plásmido con la enzima T4 ADN ligasa (*Promega*) a concentración final de 0,5 U/ $\mu\text{L}$ , junto con el buffer de ligación 1X, el producto de PCR y agua hasta completar 10  $\mu\text{L}$ , por 1 hora a temperatura ambiente y 5 minutos en hielo. La ligación generada es transformada de acuerdo al protocolo de transformación en células quimiocompetentes detallado más arriba, para posteriormente realizar la purificación de ADN plasmídico a partir de las bacterias que crecieron en LB agar por el protocolo QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) que también ya fue descrito. Se realiza una PCR, para comprobar que existe el inserto de ADN que corresponde a la c-TXNPx en el plásmido, con *MangoMix™* que solo amplifica dicho inserto a partir de colonias aisladas, con las siguientes condiciones y ciclos: 94°C 5 min 1 c; 94°C 15 seg 30 c; 57°C 30 seg 30 c; 72°C 1 min 30 c; 72°C 5 min 1 c. El resultado se analiza mediante gel de agarosa al 2%. El ADN plasmídico obtenido es mandado a secuenciar para comprobar la existencia de las mutaciones.

### 4.2.3 Métodos relacionados con la expresión y análisis de proteínas

#### 4.2.3.1 Transformación de los plásmidos pQE30-c-TXNPxC71S y pQE30-c-TXNPxC76S en la cepa *E. Coli* M15

*Cultivo de las cepas M15 y expresión de la proteína*

Se introdujo el ADN plasmídico pQE30-c-TXNPxC71S y pQE30-c-TXNPxC76S dentro de bacterias competentes M15, cepa de expresión de proteínas, mediante la técnica de electroporación.

Luego se chequea la presencia del plásmido en varios clones de bacterias mediante *colony PCR* con *MangoMix™* para asegurarnos de la presencia del ADNp, con las siguientes condiciones y ciclos: 94°C 5 min 1 c; 94°C 15 seg 30 c; 57°C 30 seg 30 c; 72°C 1 min 30 c; 72°C 5 min 1 c. El resultado se analizó mediante gel de agarosa al 2%.

#### 4.2.3.2 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

El análisis de la expresión de las proteínas recombinantes codificadas en los ADN plasmídicos transformados en las bacterias M15 se realiza mediante los métodos que se exponen a continuación en los distintos apartados, donde se probaron diferentes variables, y cada uno es un ajuste del anterior, para lograr la correcta expresión de los mutantes.

Método A:

En el método A, se inicia con un cultivo de 3 mL crecido *over night* (ON) en medio LB con ampicilina 0,1 mg/mL y kanamicina 0,025 mg/mL de 4 clones para cada mutante, c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S. De este medio se extrae 500 µL de cada clon y se inocula en 10 mL de LB, se lleva a 37°C hasta una densidad óptica de 0,5 a 0,7. Aquí se extrae 1 mL para el control de la fracción sin inducir de cada clon, la cual se centrifuga y el pellet se resolubiliza en 50 µL (41,67 µL de agua y 8,3 µL de buffer de muestra 6X con DTT). Se induce la expresión de los clones con IPTG a una concentración final de 0,5 mM, y luego se deja crecer a 30°C por 4 a 5 horas. Aquí se extrae 1 mL para el control de la fracción inducida de cada clon, la cual se centrifuga y el pellet se resolubiliza en 100 µL (83,34 µL de agua y 16,67 µL de buffer de muestra 6X con DTT). Se cosechan las bacterias por centrifugación a 4000 x.g por 25 minutos, para luego resolubilizar el pellet en 400 µL de buffer inicio nativo. Se obtiene la fracción soluble y la fracción precipitada mediante una lisis bacteriana, que se realiza con una combinación de tratamiento con lisozima (1 mg/mL por 30 min) para debilitar la pared bacteriana, seguido de sonicación por 6 pulsos por 10 segundos con intervalos de 10 segundos, con una posterior centrifugación a 15000 x.g por 30 minutos. El sobrenadante obtenido es la fracción

soluble y el pellet obtenido se resolubilizan en 400  $\mu$ L de buffer de inicio constituyendo la fracción precipitada. Estas fracciones se resolubilizan en 30  $\mu$ L aproximadamente (25  $\mu$ L de la fracción y 4,17  $\mu$ L de buffer de muestra 6X con DTT). Todas las fracciones (sin inducir, inducida, precipitada y soluble) se incuban a 90°C por 3 minutos, una vez han sido resuspendidas para sembrar en geles de SDS-PAGE. Se utilizó un control positivo con un clon que expresa la proteína wt.

#### Método B:

El método B, sigue el mismo protocolo que A con las siguientes modificaciones: al medio LB se agrega glucosa al 1% y se prueban distintas concentraciones de IPTG y además dos temperaturas de inducción. De este medio se extrae 150  $\mu$ L de cada clon y se inocula en 4 mL de LB con el agregado de glucosa al 1%. Las bacterias crecen a igual temperatura hasta la misma DO para luego inducir las con distintas concentraciones de IPTG (1 mM, 1,5 mM, 3 mM) y en distintas condiciones (30°C por 4 a 5 horas o 20°C ON). En este método solo se obtuvieron las fracciones sin inducir e inducidas.

#### Método C:

El método C, sigue el mismo protocolo que B solo que se usan las condiciones de inductor establecidas: para c-TXNPxC71S es 1,5 mM y para c-TXNPxC76S es 1 mM, ambas por 4 o 5 horas a 30°C. Además, se agrega 1 mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) una vez que el buffer inicio usado resolubiliza el pellet de bacterias cosechadas.

#### Método D:

El método D, sigue el mismo protocolo que C pero se agrega ampicilina 0,1 mg/mL en el cultivo a expresar ("Bacteria Expression Support—Troubleshooting - UY," n.d.) y el uso de dos alternativas en la inducción: una es iniciarla una vez que llega a DO de 0,6 a 0,8 y otra es iniciarla una vez llega a DO de 0,8 a 1 (Khanh et al., 2020). En este método el IPTG usado proviene de una nueva preparación.

#### Método E:

En el método E, se consideran los resultados obtenidos en los distintos métodos para realizar una prueba de purificación. Se inicia un cultivo ON de 5 mL y se inocula 2 mL del cultivo sin inducir en 50 mL de LB al 1% de glucosa. La inducción se realiza con distintos momentos de inducción según la DO que tuvieron resultado: 0,6 a 0,8 o 0,8 a 1 según cada clon. En este método se obtuvieron ambas fracciones, la soluble y la precipitada. La fracción soluble obtenida por

centrifugación, se diluye en buffer de inicio nativo y la fracción precipitada en buffer desnaturalizante.

Método F:

En el método F, el protocolo es igual que para E pero el cultivo ON es de 20 mL y el cultivo posterior es de 500 mL. Además, se eligen concretamente los clones c-TXNPxC71S 10.1 que crecen hasta DO de 0,8 a 1 y c-TXNPxC76S 2.1 hasta 0,6 a 0,8.

Estos métodos son abreviados en la tabla 2 que se muestra a continuación, detallando los principales cambios de cada uno en el crecimiento de las bacterias, en la inducción y en la lisis bacteriana.

Las muestras obtenidas de los distintos protocolos se analizan mediante SDS-PAGE teñido con azul de coomassie y/o western blot.

**Tabla 2. Condiciones de los métodos (A, B, C, D y E) de análisis de expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E y F</b>
<b>Crecimiento de bacterias</b>	LB 37°C hasta DO 0,5 - 0,7	LB + glucosa 37°C hasta DO 0,5 - 0,7	LB + glucosa 37°C hasta DO 0,5 - 0,7	LB + glucosa + ampicilina 37°C hasta DO 0,6 - 0,8 o 0,8 - 1	LB + glucosa + ampicilina 37°C hasta DO favorable del clon
<b>Inducción (IPTG)</b>	0,5 mM	1, 1,5 y 3 mM	1,5 mM C71S 1 mM C76S	IPTG nuevo: 1,5 mM C71 1 mM C76S	1,5 mM C71 1 mM C76S
<b>Temperatura y tiempo de inducción</b>	30°C 4 - 5 horas	20 °C ON o 30°C 4 - 5 horas	30°C 4 - 5 horas	30°C 4 - 5 horas	30°C 4 - 5 horas
<b>Lisis bacteriana</b>			PMSF	PMSF	PMSF

#### 4.2.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% (SDS-PAGE)

Esta electroforesis es una técnica que es capaz de separar proteínas según su carga por el campo eléctrico al que se someten. Se agrega SDS, un detergente aniónico que carga negativamente a las proteínas, y en cantidades adecuadas se une a la mayoría de las proteínas en una relación peso/peso constante, por lo que la carga aportada es proporcional a la masa de la proteína, permitiendo este tipo de electroforesis SDS-Page, separar las proteínas según su tamaño. Además, al buffer usado para preparar las muestras se le puede agregar DTT que reduce los enlaces disulfuro que contengan las proteínas. Se realizan dos geles diferenciados por el buffer stock, un gel concentrador al 12%, que cumple la función de juntar todas las proteínas para que entren juntas en el gel separador al 5%. El gel separador que define el tamaño del poro generado por la poliacrilamida y así el tamaño de moléculas a separar, las proteínas se separan por su tamaño. Las muestras se preparan para cargar en el gel con el buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE con DTT o sin DTT. Luego de preparadas, las muestras se incuban a 95 °C por 5 min para desnaturalizar las proteínas y se centrifugan brevemente.

#### 4.2.3.4 Transferencia del gel de poliacrilamida-SDS al 12% (SDS-PAGE) a la membrana de nitrocelulosa (Western blot)

Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para poder identificar las proteínas recombinantes con anticuerpos de manera específica (western blot). Se realiza aplicando una corriente eléctrica de 100 V y 350 mA durante una hora, generando el pasaje de las proteínas presentes en el gel cargadas negativamente hacia el polo positivo en el que se encuentra la membrana. Se comprueba la transferencia tiñendo la membrana con solución Ponceau por 5 minutos.

#### 4.2.3.5 Inmunodetección

El bloqueo se realiza con solución de bloqueo a temperatura ambiente por 1 hora o a 4°C ON. Luego se incuba con el anticuerpo policlonal de conejo anti-c-TXNPx elaborado por el laboratorio, por 1 hora a temperatura ambiente en la

dilución 1/5000 con la solución de incubación de anticuerpos. Se realizan 3 lavados con la solución de lavado por 5 minutos con agitación vigorosa.

El segundo anticuerpo es el anticuerpo anti-proteína G (conejo) de *ThermoFisher* “*HRP-rec-Protein G*” (cat. numb. 10-1223) que es acoplado a proteína HRP, se incuba 1 hora a temperatura ambiente en la dilución 1/15000. También se realizan 3 lavados de 5 minutos con agitación vigorosa.

Finalmente se realiza el revelado con el kit de la solución de revelado (*Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* de *Thermo Scientific*) por 10 minutos, para luego visualizarlo en un equipo ImageQuant800.

#### 4.2.3.6 Tinción del gel de poliacrilamida-SDS al 12% (SDS-PAGE) con azul de coomassie

La tinción del gel de poliacrilamida se realiza con azul de coomassie por 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Luego se saca el exceso de la tinción con agua destilada, para así comenzar a destañir con solución de *Destain* y visualizar la tinción sólo en las bandas que corresponden a proteína. Finalmente se escanea en el equipo ImageQuant800.

### 4.2.4 Purificación de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

#### 4.2.4.1 Purificación por columnas *His SpinTrap*

Se realiza una pequeña prueba de purificación en fases solubles y precipitadas que dependen del clon elegido. Se comienza expresando la proteína en las condiciones del método E, donde se realiza un western blot y se analiza que existe una baja cantidad de proteína recombinante. Es por ello que se usan las columnas *His SpinTrap* (*GE Healthcare*) que están cargadas de moléculas de sefarosa y  $\text{Ni}^{2+}$ .

Posteriormente, una vez comprobada la existencia de las proteínas recombinantes en las fracciones solubles o precipitada, se procede a la purificación de la proteína mediante la columna. Primero se centrifuga la columna por 30 segundos a 100 x.g para eluir la solución de almacenamiento. Segundo se añade 500  $\mu\text{L}$  del buffer de inicio, que según el caso será el buffer de inicio

desnaturalizante o nativo, se centrifuga a 100 x.g por 30 segundos. Se aplican 600 µL de muestra y se centrifuga a 100 x.g por 30 segundos, luego se vuelve a aplicar muestra y centrifugar, recolectando en este paso el material no unido. Luego se lava la columna aplicando 600 µL de buffer de inicio que será nativo o desnaturalizante según el caso, se centrifuga a 100 x.g por 30 segundos y se recolecta esta fracción que corresponde a lavados. Por último, se eluye con 200 µL de buffer de elución ya sea nativo o desnaturalizante con previa centrifugación a 100 x.g por 30 segundos, luego se vuelve a aplicar este buffer y centrifugar.

Para comprobar la presencia de la proteína en los eluidos se realiza un gel de proteínas SDS-PAGE al 12%, con posterior transferencia y western blot.

#### 4.2.4.2 Purificación por columnas *HiTrap™ HP Affinity Column*

Para la purificación de las proteínas recombinantes se realizó el método F de la expresión y análisis de las proteínas recombinantes. Luego se sigue el protocolo para la purificación que es descrito por Gardner (2009), en el que se utilizan columnas *HiTrap™ HP Affinity Column (Amersham Pharmacia Biotech)* que están cargadas con Ni<sup>2+</sup>. Es necesario que los sobrenadantes obtenidos en el paso de expresión de proteínas sean filtrados por filtros de 0,22 µm, también filtrar todos los buffers necesarios para la purificación con filtros de 0,45 µm. En estas columnas, el flujo que se usa es un poco menor al recomendado, siendo de 4 mL/min. Se realiza utilizando una bomba peristáltica.

Primero es necesario lavar la columna con 5-10 volúmenes de agua para remover el etanol al 20% de almacenamiento. Luego se equilibra la columna con 5 volúmenes de buffer de inicio nativo. Posteriormente se aplica la muestra, que es la fracción soluble o sobrenadante obtenida en la expresión proteica, haciéndola recircular por la columna por media hora para que la proteína se una a los átomos de níquel. El siguiente paso es realizar dos lavados que tiene la función de facilitar el despegado de las proteínas que se hayan unido inespecíficamente a la columna: el primero con 5 volúmenes de buffer de inicio nativo y el segundo con 5 a 9 volúmenes de buffer de lavado nativo. El último lavado es medido en el espectrofotómetro a 280 nm para asegurar que ya no sale proteína. Finalmente, se eluye la proteína con buffer de elución nativo, con 4 mL por cada tubo que en total son de 6 a 8. Todos los eluidos son medidos en el espectrofotómetro a 280 nm, para saber cuáles tienen proteína.

Para comprobar que la proteína se encuentra en los eluidos, se realiza electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y luego su tinción por azul de coomassie. De esta manera, se identifican los eluidos que contienen solo la proteína de interés, para que posteriormente por diálisis se remueva el imidazol que contienen los eluidos de la proteína.

## 4.2.5 Análisis funcional

### 4.2.5.1 Actividad peroxidasa por método de ensayo acoplado para c-TXNPx wt, c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

La actividad peroxidasa de las proteínas c-TXNPx wt o mutantes, se midió en un ensayo acoplado con todos los componentes del sistema mencionado en la figura 5, los cuales tienen como fin restaurar el estado reducido de la c-TXNPx para que por su actividad peroxidasa siga reduciendo las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno. En este sistema, la actividad es estimada como consumo de NADPH a través del espectrofotómetro, por la propiedad de absorber luz a 340 nm, mientras que el producto NADP<sup>+</sup> del uso de NADPH por la TR no lo hace.

Para el caso de las reacciones con c-TXNPx wt se usó 300  $\mu$ M NADPH, 2 o 5  $\mu$ M tripanotión reductasa (TR), 50  $\mu$ M dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), 5  $\mu$ M triparredoxina (TcTXN1), y 1 o 3  $\mu$ M de la proteína c-TXNPx wt en buffer HEPES. El desencadenante del funcionamiento del sistema es el terbutil hidroperóxido (t-BOOH) a 50  $\mu$ M. El volumen final de la reacción es de 50  $\mu$ L. Las corridas realizadas para cada situación de c-TXNPx (sin, con 1  $\mu$ M o con 3  $\mu$ M) brindaron valores, a los que se le resta el primer valor de absorbancia a todos los siguientes y se grafica según el tiempo.

Para el caso de las corridas con c-TXNPxC71S o C76S y como control c-TXNPx o m-TXNPx, se usó 300  $\mu$ M NADPH, 2  $\mu$ M tripanotión reductasa (TR), 50  $\mu$ M dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), 5  $\mu$ M triparredoxina (TcTXN1), y 3  $\mu$ M de la proteína c-TXNPx, mutada o m-TXNPx en buffer HEPES. El desencadenante del funcionamiento del sistema es el terbutil hidroperóxido (t-BOOH) a 50 o 100  $\mu$ M. El volumen final de la reacción es de 50  $\mu$ L. Las corridas se realizaron por duplicado para cada proteína: c-TXNPx, c-TXNPxC71S, c-TXNPxC76S y m-TXNPx. A los

valores obtenidos se le resta el primer valor de absorbancia a todos los siguientes y se grafica en función del tiempo.

#### 4.2.5.2 Análisis del estado de oxidación de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

Se incubó a c-TXNPx, c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S en las siguientes condiciones: en presencia de DTT 10 mM para reducir las; en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación 1:1 M para oxidarlas; y el tratamiento de sobreoxidación de la proteína se llevó a cabo mediante la inactivación de la proteína mediante ciclos de rotación múltiple con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y DTT 10 mM. Las proteínas recombinantes se resolvieron en SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con dos anticuerpos diferentes: anti-peroxiredoxina-SO<sub>3</sub> (anti-Prx-SO<sub>3</sub>), que reconoce el péptido sulfonilado correspondiente a la secuencia del sitio activo conservado de Prxs (dilución AbFrontier 1/1000 o 1/2000) y anti-c-TXNPx (dilución 1/5000) que es el que se venía usando en los western blot de expresión de proteínas.

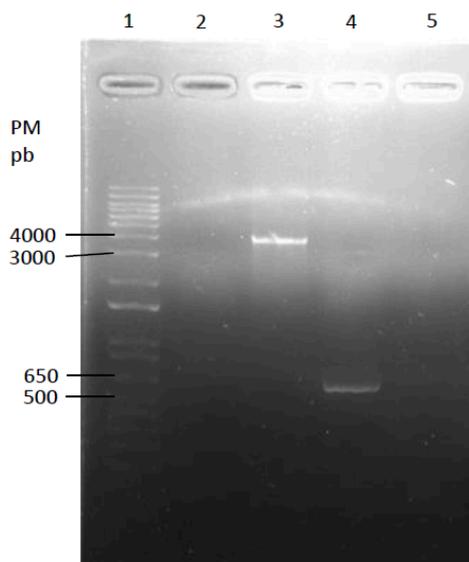
## 5. Resultados

### 5.1 Generación de mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPXC76S

#### 5.1.1 Mutagénesis sitio dirigida por PCR

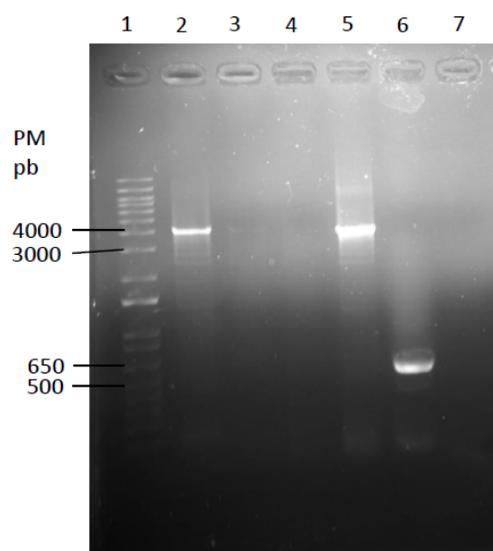
Para la obtención de dos plásmidos con el inserto de la triparredoxina peroxidasa citosólica mutada en C71S y en C76S, se realizó una mutagénesis sitio dirigida con los cebadores *forward* y *reverse* utilizando una ADN polimerasa Phusion en la PCR. El cebador *forward* es el que contiene la secuencia codificante de la c-TXNPx con la modificación del codón que corresponde a la cisteína 71 o 76 por serina, el *reverse* es consecutivo al *forward* como se ve en la figura 8. En la reacción de PCR primero se genera la desnaturalización térmica del ADN plasmídico que se forma del vector pQE30 y la secuencia wt de c-TXNPx. Luego, en la temperatura de *annealing*, los cebadores generan puentes de hidrógeno según las interacciones de Watson y Crick a la secuencia de aproximadamente 20 nucleótidos correspondiente a la región de la c-TXNPx en el vector. Una vez reconocida la secuencia por los cebadores, la temperatura disminuye y comienza el ciclado para que la polimerasa, que es adaptada a elevadas temperaturas, funcione generando muchas copias del plásmido con la secuencia mutada.

Para el caso del mutante C76S la temperatura de *annealing* especificada por el proveedor es de 65,8°C. A esta temperatura amplificó una banda a la altura de los 4000 pb que podría corresponder con el plásmido de interés que tiene un tamaño de 3400 pb correspondiente al vector, más 600 pb del inserto, que se visualizó mediante un gel de agarosa al 1%, como se aprecia en la figura 9. No hubo amplificación para el caso del mutante C71S que tenía especificada una temperatura de *annealing* de 63°C. Los controles utilizados permiten validar que la PCR funciona correctamente, ya que en el carril 4 se obtuvo una banda a la altura de los 600 pb que corresponde al inserto de la secuencia wt, y en el carril 5 no se obtuvo amplificación porque no hay ADN.



**Figura 9. Amplificación del plásmido pQE30-c-TXNPx mediante mutagénesis sitio dirigida.** Gel de agarosa al 1% con el producto de PCR. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (*ThermoFisher* cat. numb. 10787018); Carril 2: pQE30-c-TXNPx-C71S; Carril 3: pQE30-c-TXNPx-C76S; Carril 4: pQE30-c-TXNPx wt con cebadores que sólo amplifican el inserto; Carril 5: control negativo s/ADN.

Para amplificar la mutación C71S se realizaron dos cambios: se probaron otras temperaturas de *annealing* y se probó utilizar un buffer de la ADN polimerasa que es específico para ADNs enriquecidos en guaninas y citosinas (Buffer GC). Se realizó un gradiente de temperaturas de *annealing* de 58, 60 y 62°C en el buffer HF. Se realizó el mismo gradiente en el buffer GC. En la figura 10 se observa el resultado de la PCR, donde se obtiene la amplificación de una banda a la altura de 4000 pb a una temperatura de *annealing* de 58°C, con una banda de mayor intensidad cuando se usa el buffer GC.



**Figura 10. Amplificación del plásmido-c-TXNPx C71S.** Gel de agarosa al 1% de pQE30-c-TXNPx-C71S con distintas Temp. ann. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb (*ThermoFisher* cat. numb. 10787018); Carril 2: Temp. ann. 58°C con buffer Phusion HF 1X; Carril 3: Temp. ann. 60°C con buffer Phusion HF 1X; Carril 4: Temp. ann. 62°C con buffer Phusion HF 1X; Carril 5: Temp. ann. 58°C con buffer GC Phusion HF 1X; Carril 6:

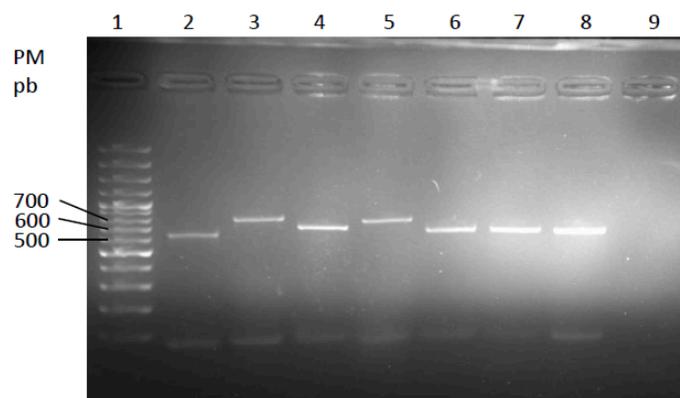
c-TXNPx wt con cebadores que solo amplifican el inserto; Carril 7: control negativo s/ADN.

Los plásmidos amplificados por la polimerasa y en los que se ve resultado del tamaño del plásmido en los geles de agarosa, se trataron con *DpnI* para eliminar el ADN metilado, luego se ligaron con T4 ligasa y se transformaron en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  para amplificar los plásmidos, y además ser resguardado correctamente.

### 5.1.2 Purificación de ADN plasmídico para la confirmación de mutagénesis sitio dirigida y la posterior secuenciación

Una vez que se obtuvieron bacterias transformadas con los plásmidos, a partir de esos clones, se purificó el ADN plasmídico por protocolo de *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (50). La presencia de plásmidos con la secuencia de interés pQE30-c-TXNPxC71S y pQE30-c-TXNPxC76S se verificó por PCR con la enzima *MangoMix™* la cual amplifica únicamente la región de ADN que contiene la secuencia codificante de la c-TXNPx, por lo que corresponde a un tamaño de 600 pb como se ve en la figura 11. Sin embargo algunos clones (carril 2, 3 y 5) no se ubican en el tamaño correspondiente a 600 pb, lo cual puede deberse a inserciones de secuencia en la secuencia original correspondiente a c-TXNPx, para comprobarlo es necesaria la secuenciación.

Podemos decir que en el ADN plasmídico que transformamos en bacterias previamente, existe el inserto de interés correspondiente a c-TXNPx, pero algunos podrían tener variaciones que deberían ser corroboradas por secuenciación.



**Figura 11. Análisis de la presencia del inserto c-TXNPx en los clones aislados.** Gel de agarosa al 2%. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (*ThermoFisher* c 15628019); Carril 2 y 3 clones de c-TXNPxC76S; Carriles 4 al 7 clones de c-TXNPx-C71S; Carril 8: c-TXNPx wt; Carril 9: control negativo s/ADN.

Los ADN plasmídicos obtenidos se secuenciaron para corroborar la existencia de la mutación. Se enviaron varios clones diferentes de los plásmidos con concentraciones de entre 60 ng/μL y 200 ng/μL a Macrogen (Korea). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante blastn y blastx en el geneBank con los datos de la secuencia de la c-TXNPx. Los clones deben tener únicamente la mutación puntual de adenina por timina en la secuencia de ADN (codón *tgc* por *agc*) que en la traducción cambia la cisteína (en la posición 71 o 76) por serina, en lo demás no debe diferir en absoluto. Entonces, debe coincidir en un 99% con el gen que corresponde a c-TXNPx wt en *Trypanosoma cruzi*, como se aprecia en la figura 12. De los 14 clones que se mandaron a secuenciar, 5 contenían la mutación C76S y 4 la C71S, los demás correspondían a clones de c-TXNPxC71S que tenían inserciones de aproximadamente 40 nucleótidos o algunas estaban truncadas.

A

SECUENCIA DEL GEN DE C-TXNFXC718

Query: H231114-006 M06\_10\_pQE-F.ab1 Query ID: lcl|Query\_111341 Length: 1287  
>Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidase, putative (Tc00.1047053487507.10), partial mRNA  
Sequence ID: XM\_797300.1 Length: 600  
>Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidase, putative (Tc00.1047053509445.10), partial mRNA  
Sequence ID: XM\_799478.1 Length: 600  
>Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidase, putative (Tc00.1047053505983.9), partial mRNA  
Sequence ID: XM\_801128.1 Length: 600  
Range 1: 1 to 600

Score:1103 bits(597), Expect:0.0,  
Identities:599/600(99%), Gaps:0/600(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 194 ATGTCCTGCGGAGACGCAAAGCTCAACCACCCGGCGCCCGACTTCAATGAGACGGCGCTG 253
          |||
Sbjct 1 ATGTCCTGCGGAGACGCAAAGCTCAACCACCCGGCGCCCGACTTCAATGAGACGGCGCTG 60

Query 254 ATGCCCAACGGCACCTTCAAGAAGGTGGCTCTCACCTCCTACAGGGCAAGTGGCTGGTG 313
          |||
Sbjct 61 ATGCCCAACGGCACCTTCAAGAAGGTGGCTCTCACCTCCTACAGGGCAAGTGGCTGGTG 120

Query 314 CTCTTCTTCTACCCGATGGACTTCACCTTCGCTCGCCCCACAGAGATCTGCCAATTCTCG 373
          |||
Sbjct 121 CTCTTCTTCTACCCGATGGACTTCACCTTCGCTCGCCCCACAGAGATCTGCCAATTCTCG 180

Query 374 GACCGTGTGAGGAGTTCCTGACATTGGCAGCGAGGTGCTTGCCCTGCTCCATGGACAGC 433
          |||
Sbjct 181 GACCGTGTGAGGAGTTCCTGACATTGGCAGCGAGGTGCTTGCCCTGCTCCATGGACAGC 240

Query 434 GAGTACTCCCATCTGGCCTGGACAAGCATTGAGCGCAGCGTGGCGGACTTGGCCAGATG 493
          |||
Sbjct 241 GAGTACTCCCATCTGGCCTGGACAAGCATTGAGCGCAGCGTGGCGGACTTGGCCAGATG 300

Query 494 AACATCCCCATTCTTGCCGACAAGACCAAGTGCATCATGAAGTCGTATGGTGTGCTGAAG 553
          |||
Sbjct 301 AACATCCCCATTCTTGCCGACAAGACCAAGTGCATCATGAAGTCGTATGGTGTGCTGAAG 360

Query 554 GAGGAGGATGGCGTGGCCTACCGTGGCCCTTTTCATCATCGACCCGAAGCAGAACCTGCGG 613
          |||
Sbjct 361 GAGGAGGATGGCGTGGCCTACCGTGGCCCTTTTCATCATCGACCCGAAGCAGAACCTGCGG 420

Query 614 CAGATCACCGTCAACGACCTCCCCGTTGGCCCGCAGCTGGACGAGGCCCTTCGCCTTGTG 673
          |||
Sbjct 421 CAGATCACCGTCAACGACCTCCCCGTTGGCCCGCAGCTGGACGAGGCCCTTCGCCTTGTG 480

Query 674 AAGGCGTCCAGTTCGTGGAGAAGCATGGCGAGGTGTGCCCCGCCAACTGGAAGCCCGGT 733
          |||
Sbjct 481 AAGGCGTCCAGTTCGTGGAGAAGCATGGCGAGGTGTGCCCCGCCAACTGGAAGCCCGGT 540

Query 734 GACAAGACGATGAAGCCGGATCCCGAAAAGTCCAAGGAGTACTTTGGTGTGTCGCGTAG 793
          |||
Sbjct 541 GACAAGACGATGAAGCCGGATCCCGAAAAGTCCAAGGAGTACTTTGGTGTGTCGCGTAG 600
```

Score:414 bits(1064), Expect:5e-142,  
Method:Compositional matrix adjust.,  
Identities:198/199(99%), Positives:198/199(99%), Gaps:0/199(0%)

```
Query 195 MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALTSYKQKWLVLFFYPMDFTFVCPTEICQFS 374
          |||
Sbjct 1 MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALTSYKQKWLVLFFYPMDFTFVCPTEICQFS 60

Query 375 DRVKEFSDIGSEVLACSMDSYSHLAWTSIERKRGGQMNIPILADKTKCIMKSYGVLK 554
          |||
Sbjct 61 DRVKEFSDIGSEVLACSMDSYSHLAWTSIERKRGGQMNIPILADKTKCIMKSYGVLK 120

Query 555 EEDGVAYRGLFIIDPKQNLQITVNDLPVGRDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPG 734
          |||
Sbjct 121 EEDGVAYRGLFIIDPKQNLQITVNDLPVGRDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPG 180

Query 735 DKTMKPDPEKSKEYFGAVA 791
          |||
Sbjct 181 DKTMKPDPEKSKEYFGAVA 199
```

**B**

```

SECUENCIA DEL GEN DE C-TXNFXC768

Query: H231114-006_004_3_pQE-F.ab1 Query ID: lcl|Query_88065 Length: 1200

>Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidase (Tryp) mRNA, complete cds
Sequence ID: AF106856.1 Length: 1250
Range 1: 74 to 673

Score:1103 bits(597), Expect:0.0,
Identities:599/600(99%), Gaps:0/600(0%), Strand: Plus/Plus

Query 193 ATGTCCTGCGGAGACGCAAAGCTCACCCACCCGGCGCCCGACTTCAATGAGACGGCGCTG 252
          |||
Sbjct 74 ATGTCCTGCGGAGACGCAAAGCTCACCCACCCGGCGCCCGACTTCAATGAGACGGCGCTG 133

Query 253 ATGCCCAACGGCACCTTCAAGAAGGTGGCTCTCACCTCCTACAAGGGCAAGTGGCTGGTG 312
          |||
Sbjct 134 ATGCCCAACGGCACCTTCAAGAAGGTGGCTCTCACCTCCTACAAGGGCAAGTGGCTGGTG 193

Query 313 CTCTTCTTCTACCCGATGGACTTCACTTCGTCTGCCCCACAGAGATCTGCCAATTCTCG 372
          |||
Sbjct 194 CTCTTCTTCTACCCGATGGACTTCACTTCGTCTGCCCCACAGAGATCTGCCAATTCTCG 253

Query 373 GACCGTGTGAAGGAGTTCTCTGACATTGGCTGCGAGGTGCTTGCAGCTCCCATGGACAGC 432
          |||
Sbjct 254 GACCGTGTGAAGGAGTTCTCTGACATTGGCTGCGAGGTGCTTGCAGCTCCCATGGACAGC 313

Query 433 GAGTACTCCCATCTGGCCTGGACAAGCATTGAGCGCAGCGTGGCGGACTTGGCCAGATG 492
          |||
Sbjct 314 GAGTACTCCCATCTGGCCTGGACAAGCATTGAGCGCAGCGTGGCGGACTTGGCCAGATG 373

Query 493 AACATCCCCATTCTTGCCGACAAGACCAAGTGCATCATGAAGTCGTATGGTGTGCTGAAG 552
          |||
Sbjct 374 AACATCCCCATTCTTGCCGACAAGACCAAGTGCATCATGAAGTCGTATGGTGTGCTGAAG 433

Query 553 GAGGAGGATGGCGTGGCGTACCCTGGCCCTTTTCATCATCGACCCGAAGCAGAACCTGCGG 612
          |||
Sbjct 434 GAGGAGGATGGCGTGGCGTACCCTGGCCCTTTTCATCATCGACCCGAAGCAGAACCTGCGG 493

Query 613 CAGATCACCGTCAACGACCTCCCGGTTGGCCGCGACGTGGACGAGGCCCTTCGCTTGTG 672
          |||
Sbjct 494 CAGATCACCGTCAACGACCTCCCGGTTGGCCGCGACGTGGACGAGGCCCTTCGCTTGTG 553

Query 673 AAGCGTITCCAGTTCTGTTGGAGAAGCATGGCGAGGTGTGCCCCGCAACTGGAAAGCCCGGT 732
          |||
Sbjct 554 AAGCGTITCCAGTTCTGTTGGAGAAGCATGGCGAGGTGTGCCCCGCAACTGGAAAGCCCGGT 613

Query 733 GACAAGACGATGAAGCCGGATCCCGAAAAGTCCAAGGAGTACTTTGGTGTGTCGCGTAG 792
          |||
Sbjct 614 GACAAGACGATGAAGCCGGATCCCGAAAAGTCCAAGGAGTACTTTGGTGTGTCGCGTAG 673

Score:414 bits(1064), Expect:2e-142,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:198/199(99%), Positives:198/199(99%), Gaps:0/199(0%)

Query 193 MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALTSYKKGKWLVLFFYPMDFTFVCPTEICQFS 372
          |||
Sbjct 1 MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALTSYKKGKWLVLFFYPMDFTFVCPTEICQFS 60

Query 373 DRVKEFSDIGCEVLAASSMDSEYSHLAWTSIERKRGGGLQMNIPILADKTKCIMKSYGVLK 552
          |||
Sbjct 61 DRVKEFSDIGCEVLAASSMDSEYSHLAWTSIERKRGGGLQMNIPILADKTKCIMKSYGVLK 120

Query 553 EEDGVAYRGLFIIIDPKQNLRQITVNDLPVGRDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPG 732
          |||
Sbjct 121 EEDGVAYRGLFIIIDPKQNLRQITVNDLPVGRDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPG 180

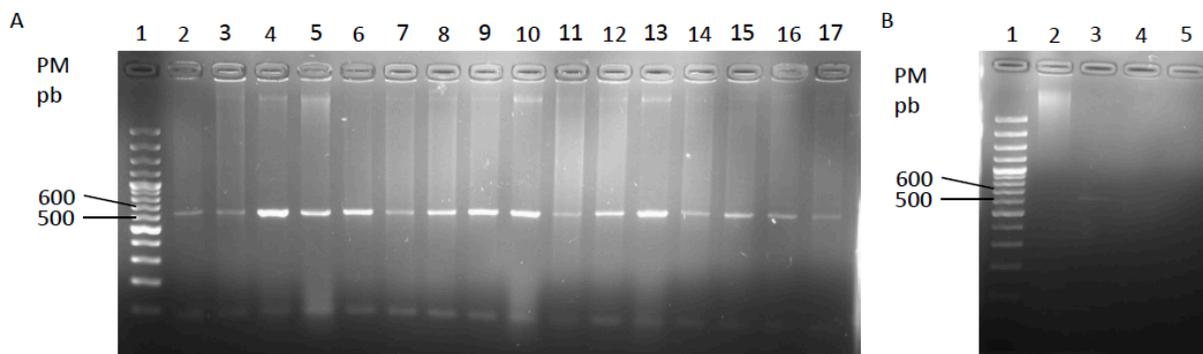
Query 733 DTKMKPDPEKSKEYFGAVA 789
          |||
Sbjct 181 DTKMKPDPEKSKEYFGAVA 199

```

**Figura 12. Análisis de los clones obtenidos por secuenciación. A.** Secuenciado nucleotídico del inserto del vector, donde *Query* hace referencia al clon secuenciado y *Sbjct* a la secuencia de ADN encontrada en la base de datos, y la traducción de la secuencia de nucleótidos obtenida, evidenciando la mutación en la cisteína 71 por una serina. **B.** Lo mismo que A, pero la mutación es en la cisteína 76 por una serina.

## 5.2 Confirmación de la presencia del ADN plasmídico pQE30-c-TXNPxC71S y pQE30-c-TXNPx C76S en las células de expresión

Una vez obtenidos los plásmidos pQE30-c-TXNPx-C71S y C76S, estos fueron transformados en bacterias *E. coli* M15. Varios clones de bacterias transformadas fueron confirmados por colony PCR. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% como se muestra en la figura 13.

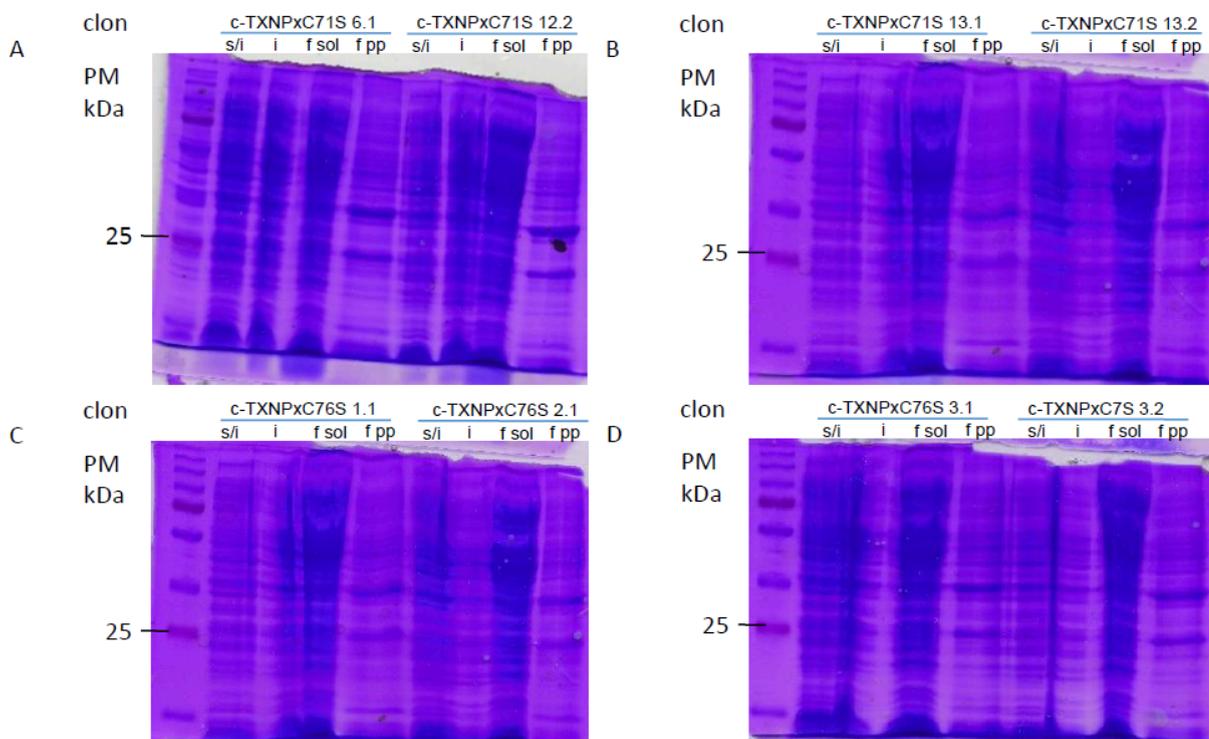


**Figura 13. Análisis de la presencia del inserto c-TXNPx en los clones de *E. Coli* M15 elegidos para la expresión de la proteína recombinante. A.** Gel de agarosa al 2%. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (*ThermoFisher* c 15628019); Carril 2 al 10: c-TXNPxC71S clones 6.1, 6.2, 10.1, 10.2, 12.1, 12.2, 13.1, 13.2 y 13.3; Carril 11 al 17: c-TXNPxC76S clon 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 3.1 y 3.2. **B.** Gel de agarosa al 2%. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2: c-TXNPxC76S clon 4.1; Carril 3: ADN pQE30-c-TXNPxC76S; Carril 4: pQE30; Carril 5: s/ADN.

Todos los clones amplificaron la secuencia del tamaño correspondiente a c-TXNPx que es de 600 pb, menos el clon 4.1 de c-TXNPxC76S que dió un *smear* y no se siguió usando en la expresión. El siguiente paso fue el ajuste del método de expresión para determinar la solubilidad de las proteínas recombinantes partiendo de algunos de los clones en los que se muestra resultado de amplificación.

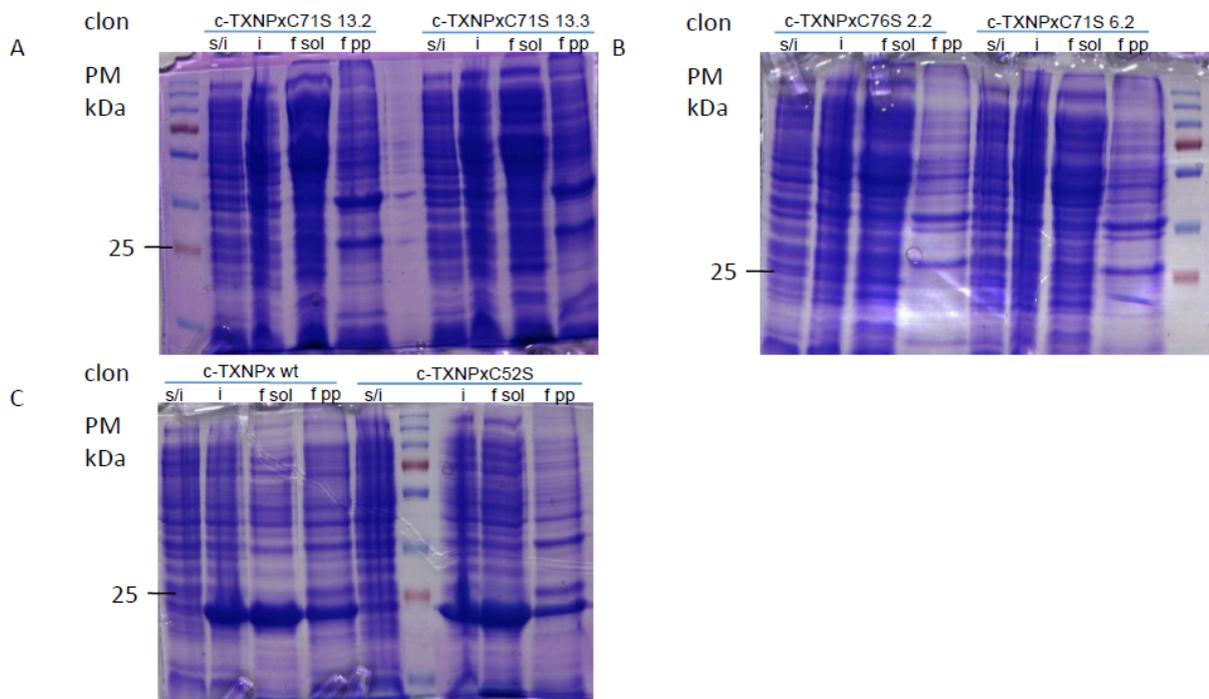
### 5.3 Expresión inicial de c-TXNPxC71S y C76S

Se llevó a cabo un ensayo de inducción y expresión usando el protocolo A, que es el usado para la proteína wt, expresándose en la fracción soluble y en cantidades elevadas. Luego se llevó a cabo la primera expresión de las proteínas recombinantes que en su forma monomérica tienen un tamaño de 22 kDa en los clones de c-TXNPxC71S 6.1, 12.2, 13.1 y 13.2 y en los clones de c-TXNPxC76S 1.1, 2.1, 3.1 y 3.2, según el método A, obteniendo como resultado un gel SDS-PAGE al 12% con las distintas fracciones obtenidas y que es teñido con azul de coomassie.



**Figura 14. Primera expresión de los mutantes de c-TXNPx.** Geles de poliacrilamida al 12% con tinción de coomassie. Ensayo de expresión en las condiciones descritas en el método A de la expresión de las proteínas recombinantes, analizando las fracciones sin inducir (s/i), inducida (i), soluble (f sol) y precipitada (f pp). El marcador de peso molecular tiene un rango de 10 a 250 kDa PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26619). En A y B se analiza el mutante c-TXNPxC71S en los distintos clones (6.1, 12.2, 13.1 y 13.2), en C y D el mutante c-TXNPxC76S en los clones (1.1, 2.1, 3.1 y 3.2).

En los geles de la figura 14 no se observa una expresión clara que represente a la proteína recombinante a la altura de los 22 kDa correspondientes al monómero, por lo que se incluye en el ensayo de expresión por el método A algunos controles que verificarán el adecuado manejo técnico del protocolo. Los controles son: bacterias que expresan la proteína wt c-TXNPx y otro mutante de c-TXNPx en el que se reemplaza la cisteína 52 (C<sub>p</sub>) por serina (realizado anteriormente en el laboratorio), en ambos se sabe que la expresión se obtiene en cantidades significativas. Además, se agregó un nuevo clon: c-TXNPxC71S 13.3.



**Figura 15. Expresión de los mutantes c-TXNPx, la proteína wt y el mutante C52S.** Geles de poliacrilamida al 12% con tinción de coomassie. Ensayo de expresión en las condiciones descritas en el método A de la expresión de las proteínas recombinantes, analizando las fracciones sin inducir (s/i), inducida (i), soluble (f sol) y precipitada (f pp). Marcador de peso molecular: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26619). En A se analiza el mutante c-TXNPxC71S en los distintos clones (13.2 y 13.3), en B el mutante c-TXNPxC76S en los clones (2.2 y 6.2) y en C la proteína wt c-TXNPx en *E. coli* M15 y el mutante c-TXNPxC52S.

En la figura 15 se puede apreciar cómo, tanto la proteína wt o el mutante c-TXNPxC52S, se expresan en grandes cantidades, sin observarse claramente expresión en los mutantes C71S y C76S en el tamaño correspondiente al monómero. Para los siguientes experimentos, tomando en cuenta que estas proteínas podrían estar expresándose a bajos niveles, para detectarlas elegimos realizar western blot en la puesta a punto del ensayo, ya que se cuenta con un anticuerpo policlonal anti c-TXNPx. Previo a realizar el western blot, se escaneó la membrana con el ponceau correspondiente para corroborar la correcta transferencia del gel de poliacrilamida hacia la membrana, además de ser referencia de la cantidad total de proteína que se sembró.

## 5.4 Puesta a punto del ensayo de expresión y análisis de solubilidad de los mutantes c-TXNPxC71S y C76S

Como no se obtuvo expresión en el método A para los mutantes, se modificó el protocolo en diferentes parámetros que comúnmente son evaluados para encontrar el método ideal que permita la expresión de los mutantes.

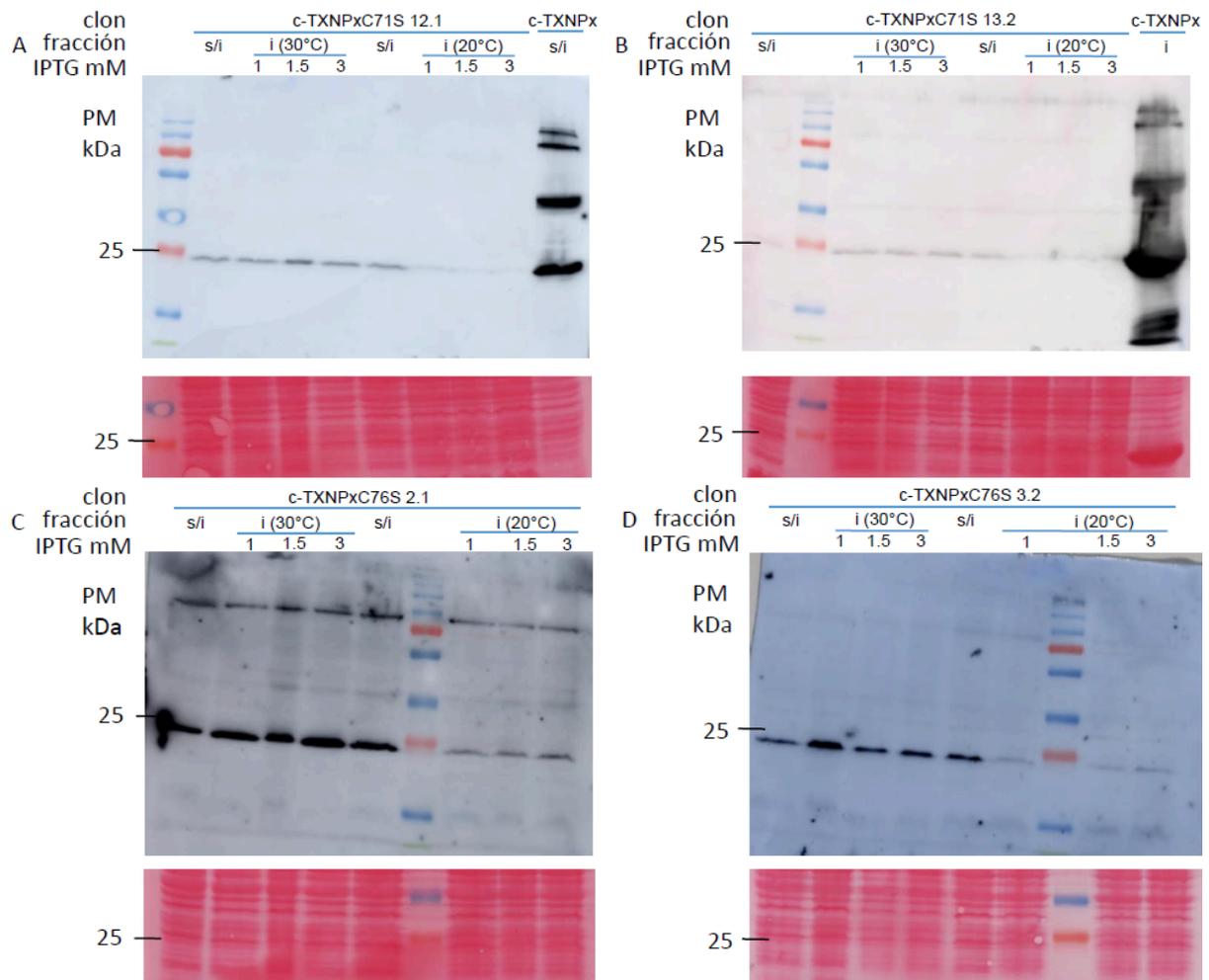
### 5.4.1 Ajuste del ensayo mediante el método B

Luego de la expresión inicial vista anteriormente, optamos por cambiar condiciones de la expresión de los mutantes, los que se detallan en el método B. Las modificaciones incluyen: agregado de glucosa al 1% al cultivo de crecimiento de las bacterias y la inducción con distintas concentraciones de IPTG, así como también distintas temperaturas de inducción. El IPTG es un análogo molecular de la alolactosa que elimina el represor del operón lac para así inducir la expresión génica, en este caso la expresión de los mutantes de c-TXNPx, por lo que es probable que en algunos casos se necesite de una concentración mayor para generar una mejor inducción. Se eligen los clones c-TXNPXC71S 12.1 y 13.2 y c-TXNPxC76S 2.1 y 3.2.

Con esto se busca comprobar cuál concentración del inductor es mejor según el clon, así como cuál temperatura de inducción asociada a determinado tiempo es

más adecuada, teniendo en cuenta que se usa un medio enriquecido con glucosa que permite un mejor crecimiento de las bacterias.

Como se observa en la figura 16, a partir del western blot con anticuerpos anti-c-TXNPx específicos podemos ver que la temperatura de inducción a 20°C ON muestra menos proteína en la forma monomérica a la altura de los 22 kDa (casi nula) en comparación a la temperatura de 30°C por 4 o 5 horas que se estaba utilizando en el método A. Por otro lado, vemos que para los mutantes de c-TXNPxC71S se obtiene un mayor resultado en la condición de inducción con 1.5 mM de IPTG, pero para el caso de los de c-TXNPxC76S se obtiene un resultado más adecuado en la concentración de 1 mM. Podríamos elegir las concentraciones mayores para el caso de c-TXNPxC76S porque muestran una banda más ancha en el caso del clon 2.1, pero como en el clon 3.2 no sucede lo mismo sino que disminuye la señal, optamos por seguir adelante con 1 mM de IPTG porque es el único que mantiene la intensidad de banda en ambos clones del mutante.



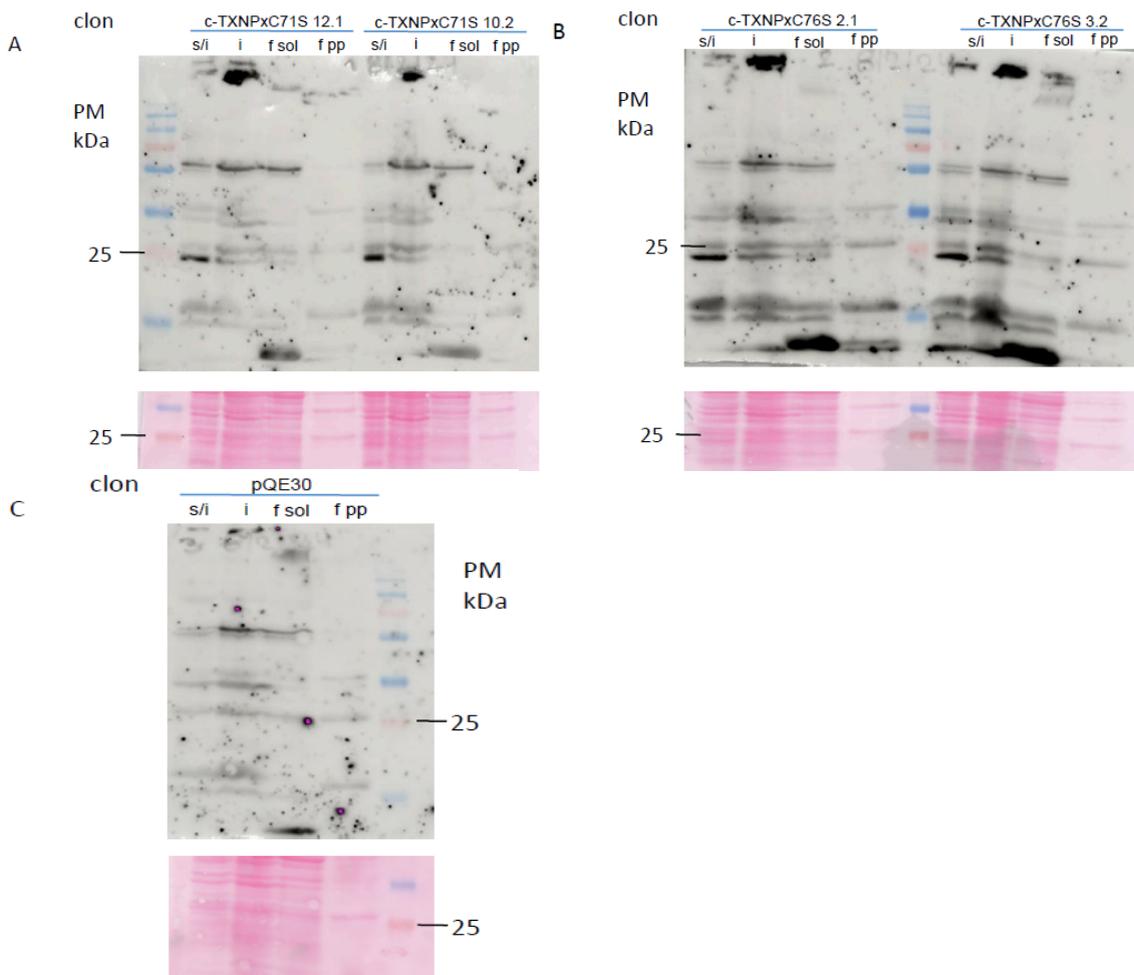
**Figura 16. Análisis de la expresión de los mutantes de c-TXNPx según el método B.** Western blot con un anticuerpo policlonal anti-c-TXNPx, con los respectivos Ponceau. El ensayo de expresión se realizó en las condiciones descritas en el método B de la expresión de las proteínas recombinantes, analizando las fracciones sin inducir (s/i) e inducida (i) con distintas concentraciones de IPTG (1 mM, 1,5 mM y 3 mM). Marcador de peso molecular: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26619). En A y B se analiza el mutante c-TXNPxC71S en los distintos clones (12.1 y 3.2) además de c-TXNPx wt como control, en C y D el mutante c-TXNPxC76S en los clones (2.1 y 3.2).

#### 5.4.2 Ajuste del ensayo mediante el método C

En los ensayos previos no se usó PMSF como inhibidor de proteasas, el cual es necesario para que las proteasas que se expresan de manera basal no degraden las proteínas que se sintetizan, entre las que están las nuestras. Para comprobar

que no estuviera existiendo degradación de las proteínas de interés que fueron expresadas, se realizó una prueba con el agregado de PMSF a una concentración final de 1 mM, a las concentraciones finales de IPTG estipuladas para cada mutante: 1,5 mM para c-TXNPxC71S y 1 mM para c-TXNPxC76S.

Se realizó un western blot para c-TXNPx, como se ve en la figura 17, la banda correspondiente al monómero de la proteína se presenta en las fracciones inducidas y más aún en las fracciones sin inducir, siendo escasa en la fracción soluble y en la precipitada. Para los dos clones de c-TXNPxC76S y el clon 12.1 de c-TXNPxC71S existe una mayor expresión en la fracción soluble que en la precipitada. El control negativo, correspondiente a bacterias con el plásmido de expresión vacío (figura 18.C) nos brinda una referencia de la señal inespecífica que podemos estar obteniendo, ya que no existe en esas fracciones la proteína del tamaño esperado. De nuevo, para todos los casos se obtuvo el Ponceau.



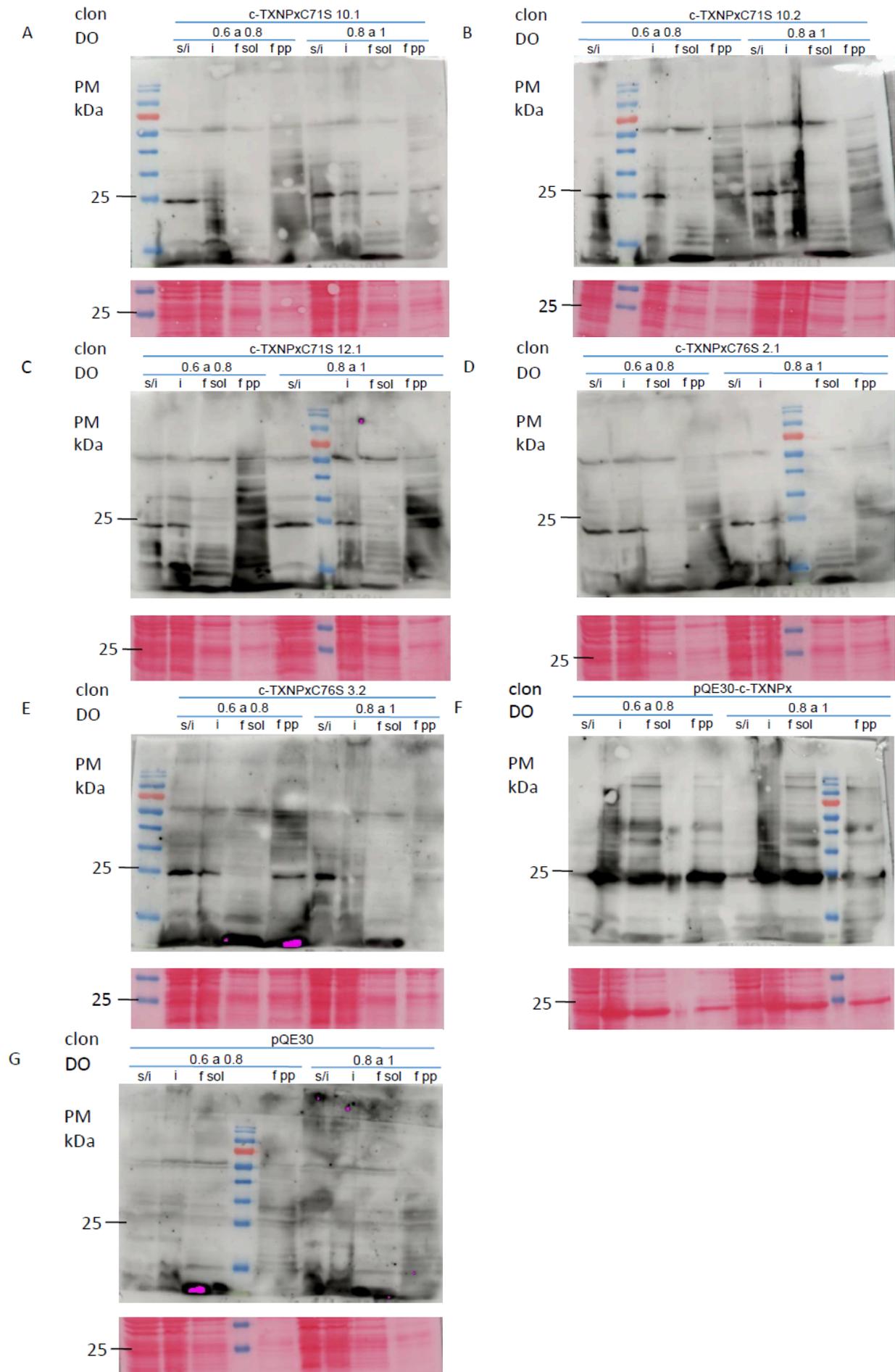
**Figura 17. Análisis de la solubilidad de los mutantes de c-TXNPx.** Western blot con anticuerpos anti-c-TXNPx, con los respectivos Ponceau. El ensayo de expresión se realizó en las condiciones del método C, analizando las fracciones sin inducir (s/i), inducida (i), soluble (f sol) y precipitada (f pp). Marcador de peso molecular: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26619). En A analiza el mutante c-TXNPxC71S en los distintos clones (12.1 y 10.2), en B el mutante c-TXNPxC76S en los clones (2.1 y 3.2) y en C el control negativo con el vector pQE30 en *E. coli* M15.

### 5.4.3 Ajuste del ensayo mediante el método D

El resultado anterior muestra que existe una expresión basal sin inducción, pero al agregar el inductor la expresión es menor a la basal, esto podría sugerir que

la proteína es tóxica o se precipita y va hacia la fracción precipitada, por lo que es necesario seguir ajustando el método de expresión de proteínas.

Se probaron distintos parámetros, detallados en el método D de la expresión de proteínas. Uno es el momento donde se inicia la inducción de la proteína: a una DO de 0,6 a 0,8 o de 0,8 a 1. Lo otro fue hacer una nueva preparación de IPTG, por si no estuviera activo. Además, se realizó el agregado de ampicilina 0,1 mg/mL en el cultivo que se deja crecer a 37°C hasta la DO deseada. Esto se realizó porque se ha visto que en algunos casos, las bacterias pueden expulsar el plásmido si no está la presión del antibiótico (“Bacteria Expression Support—Troubleshooting - UY,” n.d.). Al realizar el gel de poliacrilamida al 12%, y el western blot, pudimos definir qué condición es la mejor según el mutante. El resultado se muestra en la figura 18.



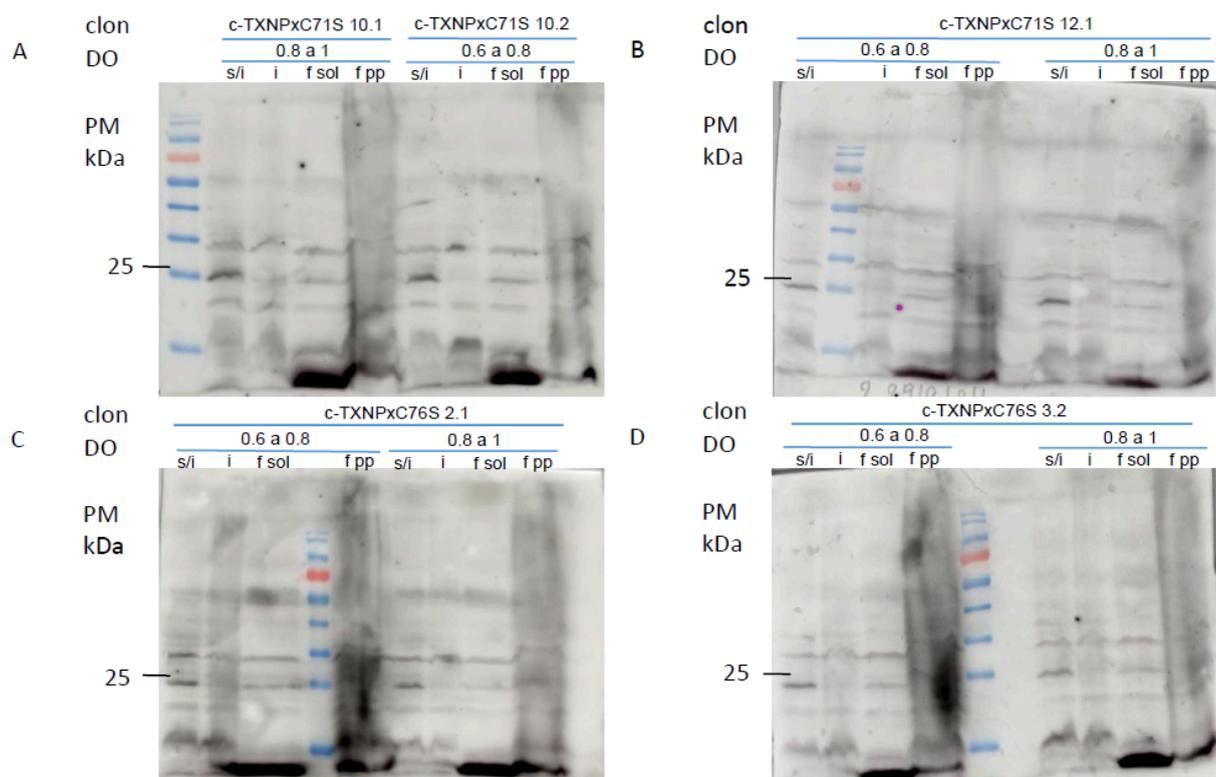
**Figura 18. Análisis de la expresión de los mutantes de c-TXNPx según el método D de la expresión de proteínas.** Western blot con anticuerpos anti-c-TXNPx, con los respectivos Ponceau. El ensayo de expresión es el realizado según el método D que agrega ampicilina al cultivo de crecimiento de bacterias, se prepara IPTG nuevo y se estudia la inducción en distintos momentos de DO (0,6 a 0,8 o 0,8 a 1), analizando las fracciones sin inducir (s/i), inducida (i), soluble (f sol) y precipitada (f pp). El marcador de peso molecular tiene un rango de 10 a 180 kDa PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26616). En A hasta C se analiza el mutante c-TXNPxC71S en los distintos clones (10.1, 10.2 y 12.1), en D y E el mutante c-TXNPxC76S en los clones (2.1 y 3.2), en F el control positivo del plásmido pQE30-c-TXNPx en *E. coli* M15 y en G el control negativo con el vector pQE30 en *E. coli* M15.

A partir de los resultados obtenidos de la figura 18, consideramos que: de c-TXNPXC71S el clon 10.1 de DO 0,8 a 1 produce la proteína mutada en la fracción soluble y precipitada, el clon 10.2 de DO 0,6 a 0,8 la produce en la fracción precipitada, el clon 12.1 de DO 0,6 a 0,8 y de 0,8 a 1 la producen en la fracción precipitada; y de c-TXNPxC76S el clon 2.1 de DO 0,6 a 0,8 produce la proteína mutada en la fracción precipitada y el de DO 0,8 a 1 en la soluble, el clon 3.2 de DO 0,6 a 0,8 y de 0,8 a 1 la produce en la fracción precipitada. Es por ello, que se eligen estos clones para producir y realizar la prueba de purificación de los mutantes en las fracciones correspondientes.

## 5.5 Purificación de los mutantes c-TXNPxC71S y C76S

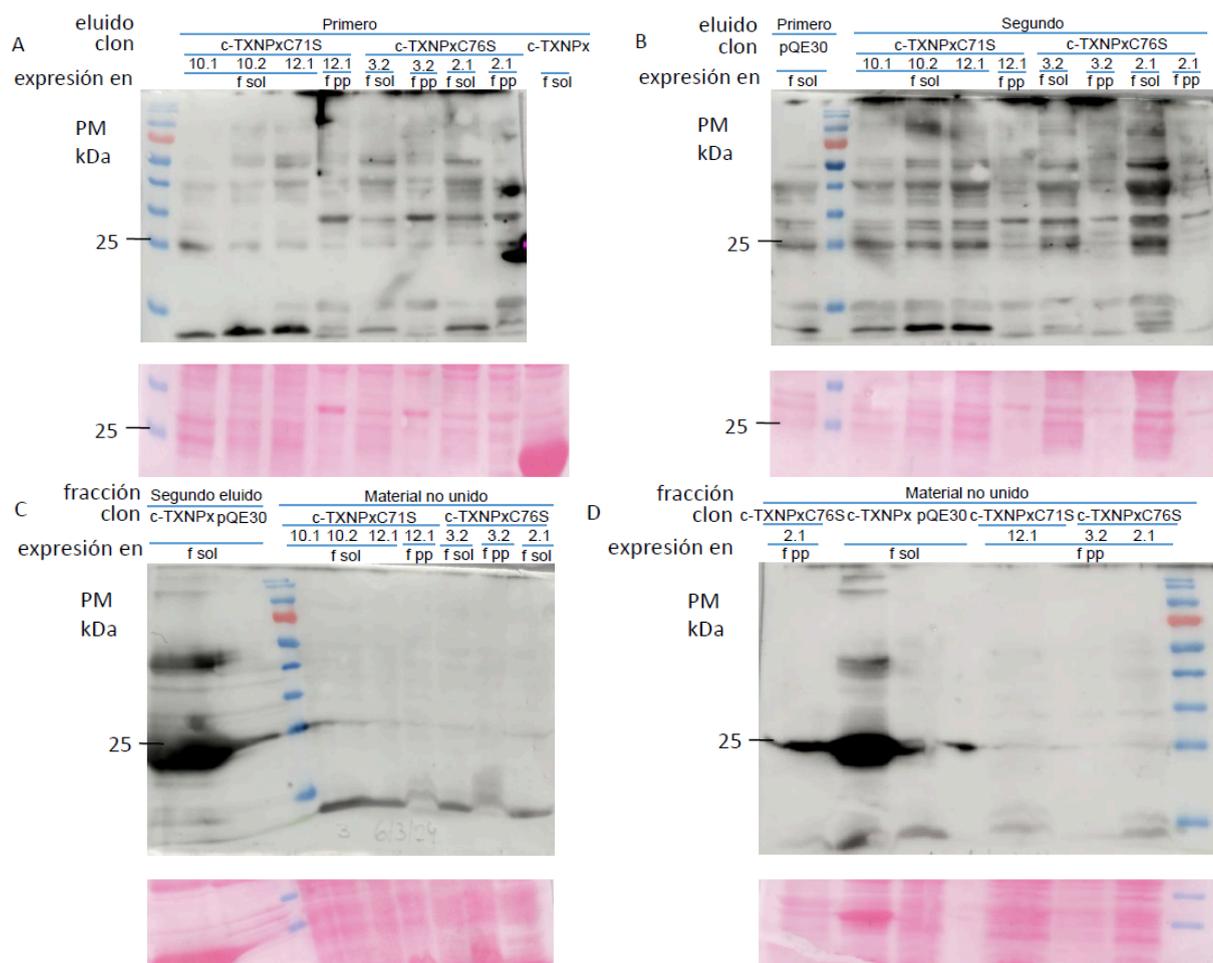
### 5.5.1 Prueba de purificación de las proteínas mutantes, según el método E

Considerando las expresiones de los clones en la fracción precipitada o soluble, se realiza una prueba de purificación en las columnas *His SpinTrap* (*GE Healthcare*) mediante el protocolo del método E de expresión de proteínas. Antes de realizar la purificación, se realizó un western blot con las muestras obtenidas para corroborar que la proteína se está expresando, resultado mostrado en la figura 19.



**Figura 19. Análisis de la expresión de los mutantes de c-TXNPx según el método E de la expresión de proteínas.** Western blot con anticuerpos anti-c-TXNPx. El ensayo de expresión es el pautado según el método E para largar la purificación, analizando las fracciones sin inducir (s/i), inducida (i), soluble (f sol) y precipitada (f pp). Marcador de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26616). En A y B se analiza el mutante c-TXNPxC71S en los distintos clones (10.1 con DO 0,8 a 1, 10.2 con DO 0,6 a 0,8 y 12.1 con ambas DO) y en C y D el mutante c-TXNPxC76S en los clones (2.1 y 3.2, ambos con los dos casos de DO).

Para evaluar la purificación se realizó western blot con previo ponceau para los distintos eluidos y materiales no unidos, como se muestra en la figura 20.



**Figura 20. Fracciones eluidas y materiales no unidos obtenidos de la columna *His SpinTrap* una vez se aplica la muestra.** Western blot con anticuerpos anti-c-TXNPx, con los respectivos Ponceau. El ensayo de expresión es el pautado según el método E para su posterior prueba de purificación. Marcador de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26616). Los clones de c-TXNPxC71S 10.2 se expresan con DO 0,6 a 0,8, 10.1 con DO 0,8 a 1 y 12.1 con ambas. Los de c-TXNPxC76S 3.2 y 2.1 con DO 0,6 a 0,8 y además los dos con DO 0,8 a 1. El control positivo es pQE30 con c-TXNPx wt y el negativo solo es el vector pQE30.

En el western blot se observa que se logró purificar tanto en la fracción soluble como en la precipitada de los clones c-TXNPxC71S 10.1, 10.2 y 12.1 y c-TXNPxC76S 3.2 y 2.1. Destacando que hay clones en los que se ve purificación en la fracción soluble como lo es c-TXNPxC71S 10.1 con DO de 0,8 a 1 y el

c-TXNPxC76S 2.1 con DO 0,6 a 0,8, entonces iniciamos un cultivo de estos clones, a una mayor escala para expresar y purificar las proteínas recombinantes en más cantidad, como lo detallamos en el método F.

### 5.5.2 Purificación de las proteínas mutantes, según el método F

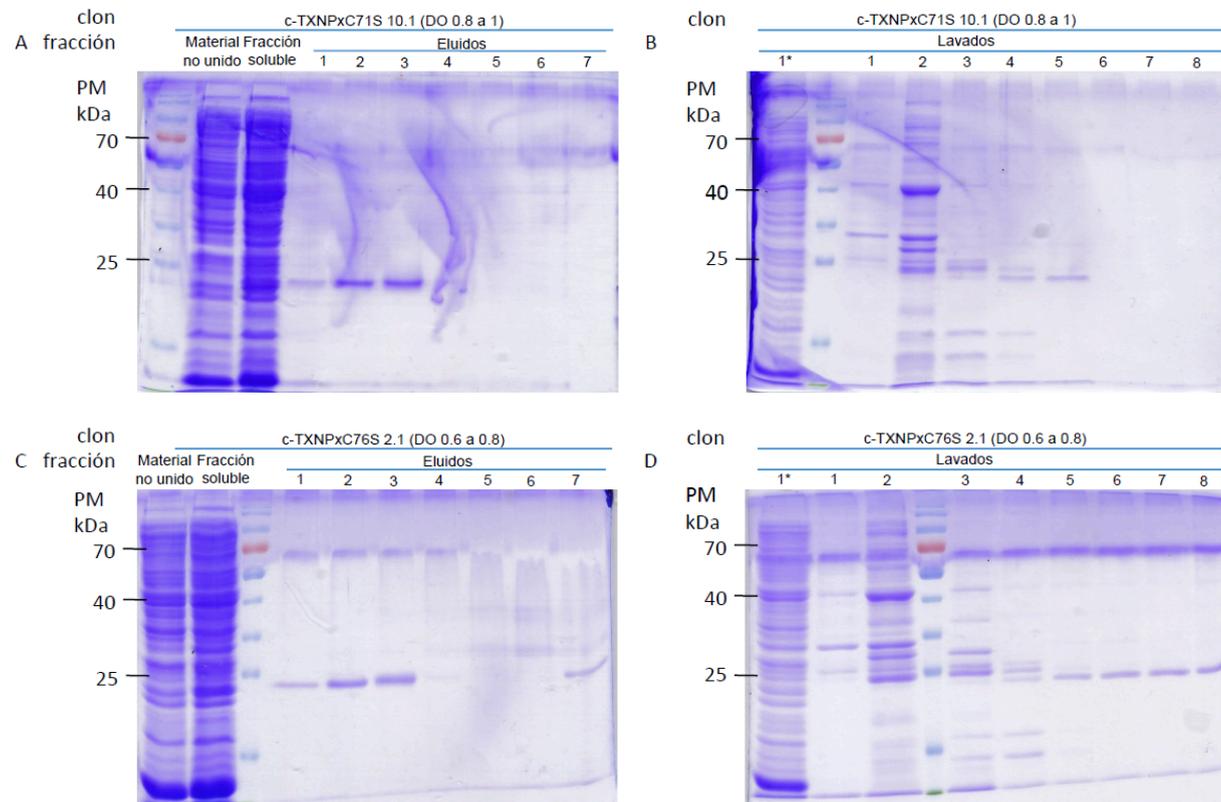
Se realizó una purificación a mayor escala según el método F (igual al E en mayor escala). Se realizó la expresión con los siguientes clones: c-TXNPxC71S 10.1 con DO 0,8 a 1 y c-TXNPxC76S 2.1 con DO 0,6 a 0,8, ambas en la fracción soluble. Se obtuvieron las fracciones solubles como se explicó anteriormente y se procedió a la purificación en columnas de afinidad, *HiTrap™ HP Affinity Column* (Amersham Pharmacia Biotech), cargadas con níquel, ya que las colas de His de las proteínas expresadas (agregadas en el vector pQE30) se unen al níquel de las columnas.

Se realizaron lavados y se lograron eluir las proteínas desde la columna de afinidad. Para corroborar si hubo elución, se midió la absorbancia a 280 nm de los eluidos para ambos mutantes, en la tabla 3 se muestran las concentraciones en mg/mL obtenidas.

**Tabla 3. Concentraciones de los eluidos obtenidos de la columna *HiTrap™ HP Affinity Column***

Eluidos	[c-TXNPxC71S] mg/mL	[c-TXNPxC76S] mg/mL
1	-0.424	-0.420
2	-0.137	-0.230
3	0.165	0.237
4	0	0.035
5	0.008	0.020
6	-0.006	-0.001
7	-0.005	0.031
8	-0.026	0.026
9	-0.072	-0.007
10	-0.004	0.045

Se analizó la purificación mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, donde se sembraron los eluidos, el material no unido, el material soluble, y se visualizó mediante tinción con azul de coomassie.



**Figura 21. Purificación de las proteínas mutantes: c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S.** Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de coomassie. En A y B la purificación para el mutante C71S y en C y D para C76S. Marcador de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26616). Fueron sembradas las distintas fracciones obtenidas en la purificación: las fracciones solubles que es una alícuota de la muestra previo a inyectar en la columna, los materiales no unidos, los lavados (con asterisco el realizado con buffer de inicio nativo) y los eluidos.

En la figura 21 se observa que hubo elución de ambas proteínas mutantes, en alto grado de pureza. Los eluidos se polearon para generar una sola solución de la proteína de interés. Luego se realizó la diálisis y concentración de las

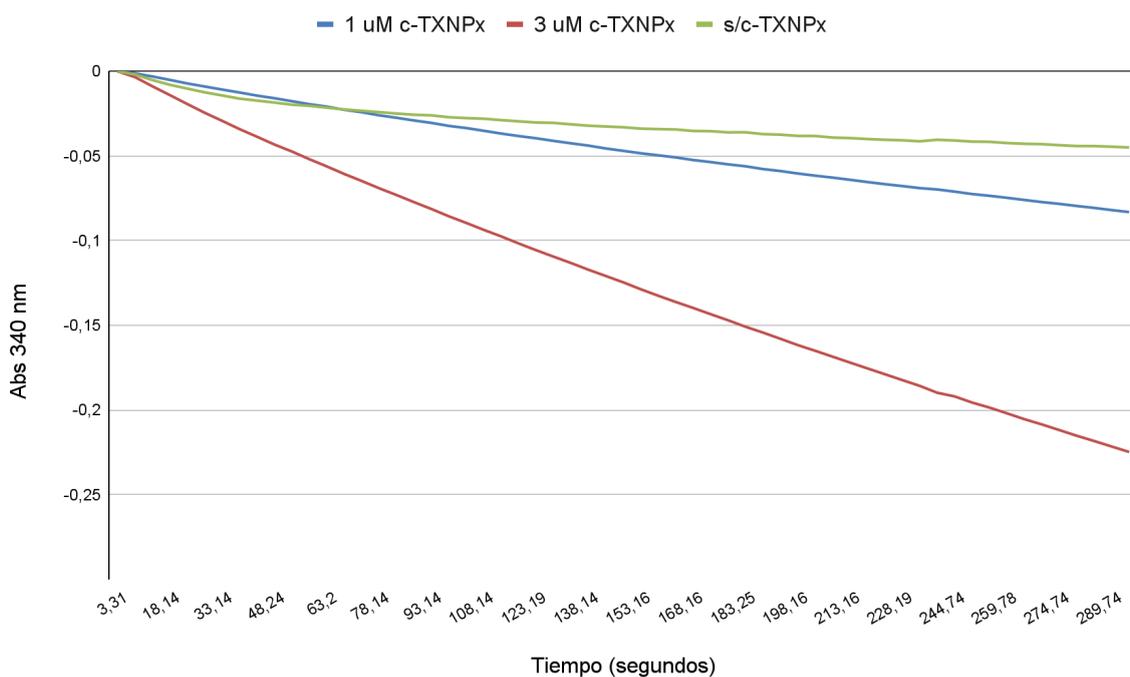
proteínas, donde se cambia el buffer al de la proteína, y también para quitar de la mezcla a los componentes para la purificación, por ejemplo, el imidazol usado para la elución de la proteína. Se obtuvo finalmente la proteína c-TXNPxC71S purificada con una concentración de 4,273 mg/mL y la c-TXNPxC76S con una concentración de 2,447 mg/mL, en ambos casos en un volumen final de 0,5 mL.

## 5.6 Análisis funcional

### 5.6.1 Actividad peroxidasa para c-TXNPx wt

Para el análisis de la actividad peroxidasa se usó el ensayo acoplado, donde están todos los componentes del sistema que tiene el parásito para regenerar a la c-TXNPx: NADPH, TcTR (*T. cruzi* tripanotión reductasa), TcTXN1 (*T. cruzi* triparredoxina 1), TSH<sub>2</sub> (Tripanotión reducido) y c-TXNPx. La c-TXNPx se encarga de reducir al hidroperóxido de tert-butilo (tBOOH) y el resto del sistema se encarga de volverla al estado reducido. La triparredoxina (TcTXN1) le transfiere electrones a la c-TXNPx, y la TcTXN1 oxidada es reducida por el dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), el cual a su vez se reducirá mediante la TR que obtiene sus electrones del NADPH como se mencionó en la introducción. De esta manera midiendo la caída por la absorbancia a 340 nm es posible detectar el consumo de NADPH. Los resultados se expresan graficando la curva de progresión del consumo de NADPH en el tiempo.

Para poner a punto el sistema, el ensayo se realizó con distintas concentraciones de c-TXNPx (1 o 3 µM) contra el blanco sin proteína, evaluando cuál concentración brinda mejores resultados. Se usó 50 µM de tBOOH y 2 µM de TR ya que era lo que previamente había sido usado para la proteína wt y que había funcionado correctamente (Piñeyro et al., 2023).



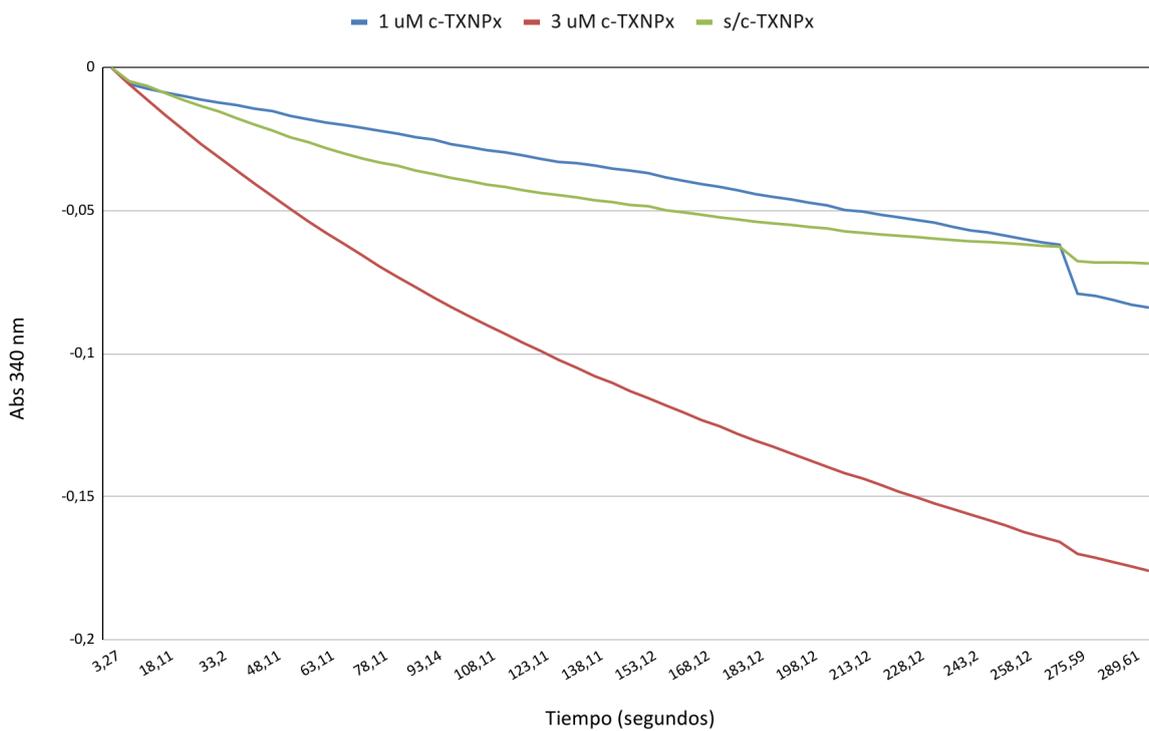
**Figura 22.** Curva de progresión en el tiempo de absorbancia a 340 nm según el tiempo en segundos. Las condiciones del experimento fueron a temperatura de 25°C y pH 7,4. Las reacciones se llevaron a cabo con 300 μM NADPH, 50 μM de dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), 5 μM triparredoxina (TcTXN1), 2 μM de tripanotión reductasa (TR), 50 μM de tBOOH y dos concentraciones de c-TXNPx: 1 μM o 3 μM.

Como vemos, la condición sin proteína tiene muy poca caída de absorbancia, se mantiene en casi 0, por ende la cantidad de NADPH se mantiene y casi no se consume, que es lo esperado ya que no se necesita del pool de proteínas que regenere a c-TXNPx a su estado reducido. La condición con proteína para el caso de 1 μM se asemeja mucho a la condición control sin proteína, pero para 3 μM hay una caída en la absorbancia mayor y por tanto, un consumo mayor de NADPH.

Para comparar ambos resultados en términos de funcionalidad de la enzima, se calcularon los valores de velocidad enzimática de Prx según el diferencial de absorbancia de NADPH sobre el diferencial del tiempo en minutos para el primer minuto aproximadamente, para ello se tuvo en cuenta el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a 340 nm de NADPH que es de 3110 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, el cual demuestra la absorción de NADPH a una concentración de 1 M a determinada longitud de onda y

una cubeta de espesor de 1 cm, usada en la ecuación de la Ley de Lambert-Beer. Cada velocidad obtenida, se divide en la concentración ( $\mu\text{M}$ ) de c-TXNPx. Obtuvimos similares velocidades ( $V[\text{Prx}]^{-1} (\text{min})^{-1}$ ) para las dos concentraciones de c-TXNPx:  $6,818 \times 10^{-6} \mu\text{M NADPH seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para 1  $\mu\text{M}$  de c-TXNPx,  $6,079 \times 10^{-6} \mu\text{M NADPH seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para 3  $\mu\text{M}$  de c-TXNPx y  $7,419898 \times 10^{-3} \mu\text{M NADPH seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  sin c-TXNPx.

Aunque se esperaba un mayor consumo de NADPH, con este ensayo podemos decir que el uso de 3  $\mu\text{M}$  c-TXNPx mostró el mejor consumo de NADPH porque hay una mayor caída, pero en términos de funcionalidad enzimática no varía, ya que las velocidades se mantienen en ambos casos en el mismo ordenes. Puesto que no se obtuvieron niveles de actividad adecuados, se elige aumentar la concentración de TR a 5  $\mu\text{M}$  para mejorar la puesta a punto del sistema



**Figura 23. Análisis de la actividad peroxidasa.** Curva de progresión en el tiempo de absorbancia a 340 nm según el tiempo en segundos. Las condiciones del experimento fueron a temperatura de 25°C y pH 7,4. Las reacciones se llevaron a cabo con 300  $\mu\text{M}$  NADPH, 50  $\mu\text{M}$  de dihidrotripanotión ( $\text{T}[\text{SH}]_2$ ), 5  $\mu\text{M}$  triparredoxina

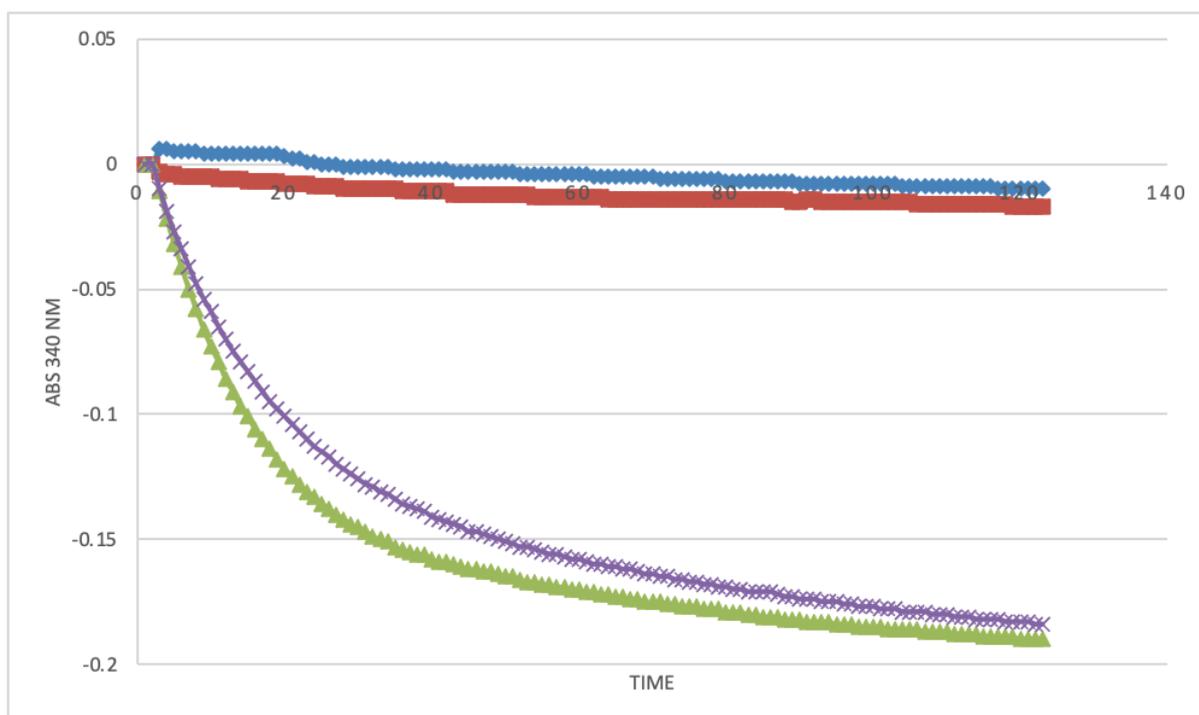
(TcTXN1), 5  $\mu\text{M}$  de tripanotión reductasa (TR), 50  $\mu\text{M}$  de tBOOH y dos concentraciones de c-TXNPx: 1  $\mu\text{M}$  o 3  $\mu\text{M}$ .

En este caso, la velocidad ( $V[\text{Prx}]^{-1} (\text{seg})^{-1}$ ) para las dos concentraciones de c-TXNPx en el primer minuto también fueron similares:  $6,355 \times 10^{-6} \mu\text{M NADPH seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para el caso de 1  $\mu\text{M}$  de c-TXNPx,  $6,301 \times 10^{-6} \mu\text{M NADPH seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para 3  $\mu\text{M}$  de c-TXNPx y  $9,166 \times 10^{-6} \mu\text{M NADPH seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para el caso sin c-TXNPx.

Vemos que aumentar la cantidad de TR a 5  $\mu\text{M}$  no nos permitió ver una mayor caída para la condición de 3  $\mu\text{M}$  de proteína, ni tampoco una mayor velocidad. Por lo que se sigue adelante con la concentración de 2  $\mu\text{M}$  de TR y 3  $\mu\text{M}$  de proteína para los siguientes ensayos de actividad peroxidasa.

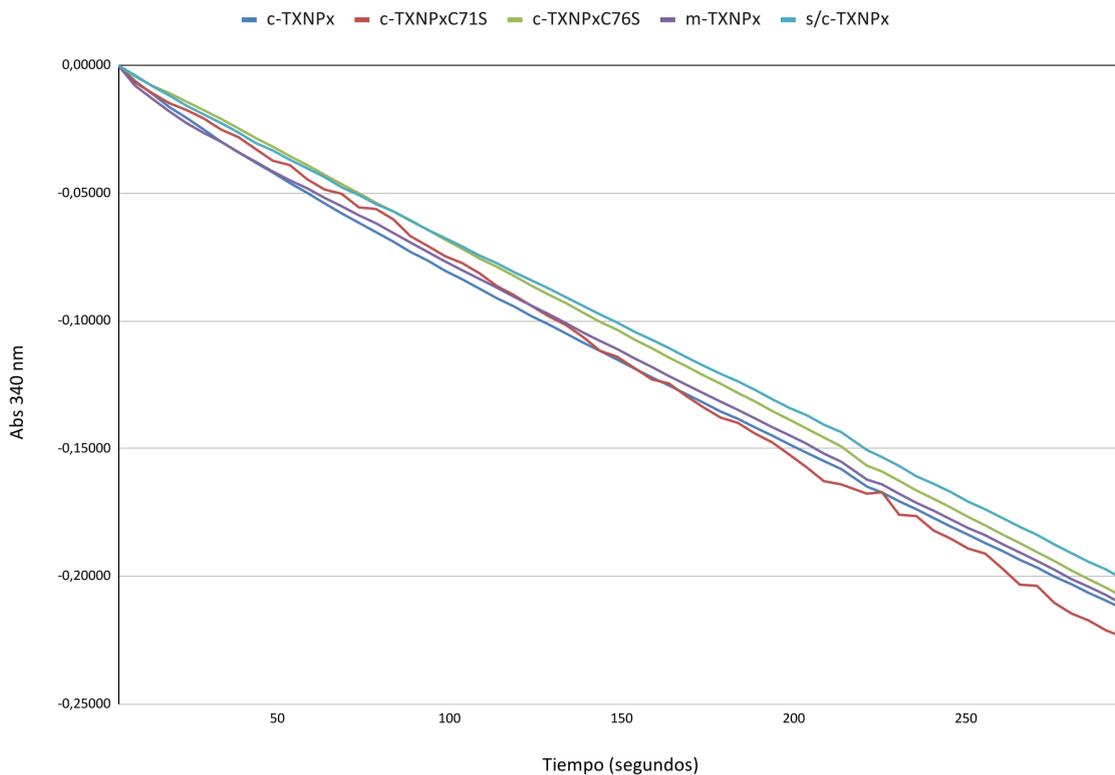
### 5.6.2 Actividad peroxidasa para c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

La proteína que se usó en el siguiente ensayo de actividad peroxidasa fue la c-TXNPxC71S y C76S, además de c-TXNPx wt y m-TXNPx que se usaron como controles, ya que creíamos que la c-TXNPx se encontraba sobreoxidada porque no demostraba tener su caída de  $\text{Abs}_{340 \text{ nm}}$  característica en las figuras 22 y 23, ésta caída característica se muestra en la figura 24, que se obtuvo anteriormente en resultados de actividad peroxidasa para la proteína wt.



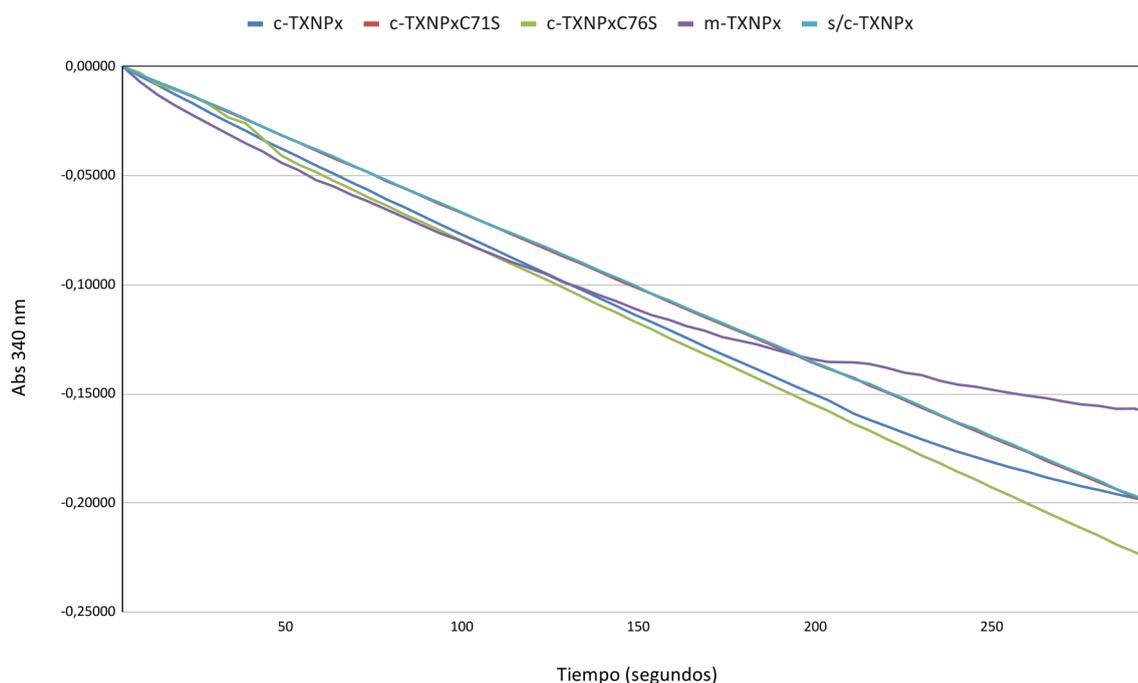
**Figura 24. Análisis de la actividad peroxidasa.** Curva de progresión en el tiempo de absorbancia a 340 nm según el tiempo en segundos, característica de c-TXNPx wt y los controles correspondientes. Las condiciones del experimento fueron a temperatura de 25°C y pH 7,4. Las reacciones se llevaron a cabo con 300 μM NADPH, 50 μM de dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), 5 μM triparredoxina (TcTXN1), 2 μM de tripanotión reductasa (TR), 50 μM de tBOOH y 0.5 μM de proteína (c-TXNPx, c-TXNPxC71S, c-TXNPxC76S y m-TXNPx). Línea azul es el control negativo sin c-TXNPx, la roja es el control negativo sin tBOOH, la verde y la violeta son duplicados de c-TXNPx.

Entonces se realiza el ensayo con las concentraciones que previamente se estipularon para c-TXNPx wt, de 3 μM de proteína y 2 μM de TR, además de la misma concentración de tBOOH que era de 50 μM.



**Figura 25. Análisis de la actividad peroxidasa.** Curva de progresión en el tiempo de absorbancia a 340 nm según el tiempo en segundos. Las condiciones del experimento fueron a temperatura de 25°C y pH 7,4. Las reacciones se llevaron a cabo con 300  $\mu$ M NADPH, 50  $\mu$ M de dihidrotripanotión (T[SH]<sub>2</sub>), 5  $\mu$ M triparredoxina (TcTXN1), 2  $\mu$ M de tripanotión reductasa (TR), 50  $\mu$ M de tBOOH y 3  $\mu$ M de proteína (c-TXNPx, c-TXNPxC71S, c-TXNPxC76S y m-TXNPx).

Vemos que el control sin proteína no tiene diferencia alguna con el control con proteína wt, esto no nos permite obtener datos significativos de nuestros mutantes, que aunque tienen caída, es muy parecida a la del control negativo. Pensamos que tal vez se debía a una escasa cantidad de oxidante y que por ello no se está oxidando lo suficiente la proteína. Se aumentó entonces al doble la cantidad de tBOOH, y se volvió a realizar el ensayo.

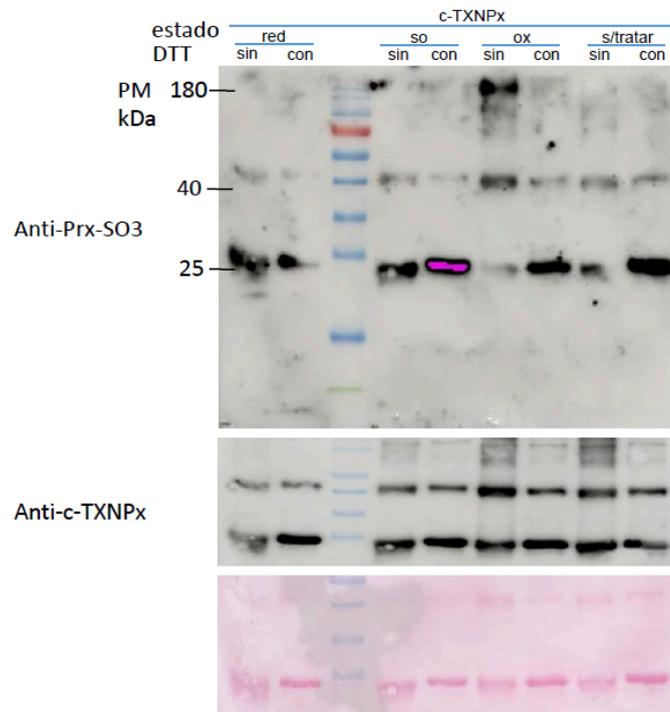


**Figura 26. Análisis de la actividad peroxidasa.** Curva de progresión en el tiempo de absorbancia a 340 nm según el tiempo en segundos. Las condiciones del experimento fueron a temperatura de 25°C y pH 7,4. Las reacciones se llevaron a cabo con 300  $\mu$ M NADPH, 50  $\mu$ M de dihidrotriptanotión ( $T[SH]_2$ ), 5  $\mu$ M triparredoxina (TcTXN1), 2  $\mu$ M de tripanotión reductasa (TR), 100  $\mu$ M de tBOOH y 3  $\mu$ M de proteína (c-TXNPx, c-TXNPxC71S, c-TXNPxC76S y m-TXNPx).

Como se observa en la figura 26, las caídas de absorbancia de NADPH para cada condición de proteína son muy similares entre ellas, incluso entre el control sin proteína como ya sucedió anteriormente, a pesar que el oxidante aumentó su cantidad al doble. Además, el control m-TXNPx se parece mucho a c-TXNPx en cuanto a las caídas de absorbancia, por lo que no sería un problema de esta proteína en particular, sino que de alguna otra proteína del pool que genera finalmente el consumo de NADPH.

Es por ello que se hizo un western blot con la proteína c-TXNPx que se usó en el ensayo de actividad peroxidasa, en los distintos estados: reducida, sobreoxidada, oxidada y sin tratar. Además, se usó en todas las condiciones el agregado o no de DTT, compuesto que se encarga de estabilizar sulfhidrilos libres

de las cisteínas de Prx. Se la analizó con anticuerpos anti-Prx-SO<sub>3</sub> y anti-c-TXNPx, los cuales detectan el residuo de la cisteína 52 que se encuentre sobreoxidada.



**Figura 27. Análisis del estado de sobreoxidación de la c-TXNPx wt usada como control.** Western blot con anticuerpo anti-peroxiredoxina-SO<sub>3</sub> (anti-Prx-SO<sub>3</sub>) o anti-c-TXNPx, y el respectivo ponceau como control de carga. Marcador de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher* cat. numb. 26616). La proteína fue tratada para su estado reducido (red), sobreoxidado (so), oxidado (ox) y sin tratar, con o sin DTT.

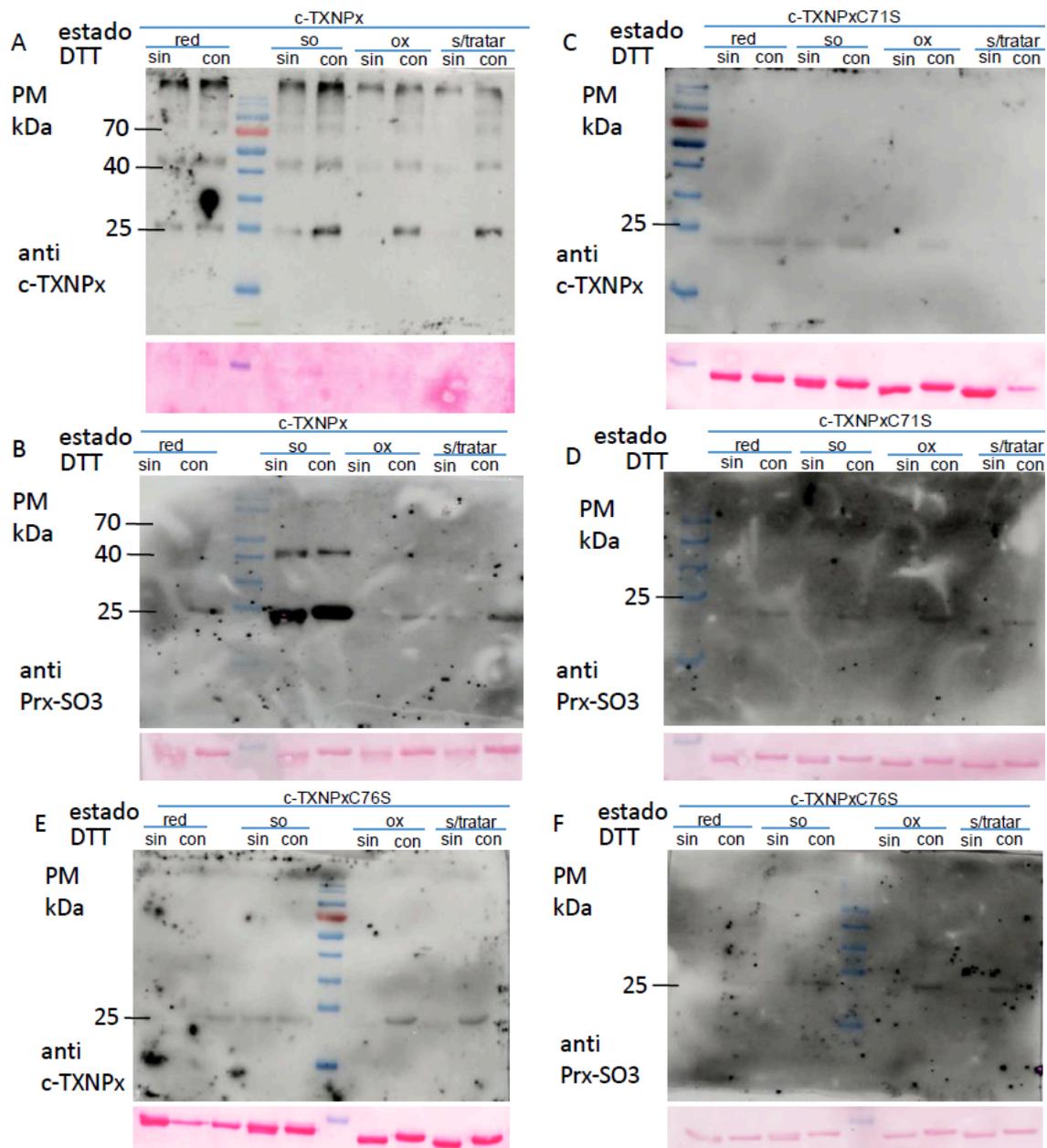
(ox) y sin tratar, con o sin DTT.

Como se ve en la figura 27, la enzima en su estado sin tratar tiene monómeros a la altura de 25 kDa que son detectados por el anticuerpo anti-Prx-SO<sub>3</sub>, lo cual indica que la proteína se encuentra en mayor medida con su cisteína sobreoxidada, y con los anticuerpos anti-c-TXNPx corroboramos que se trata de la proteína de interés. Además, en el estado reducido, no deberíamos detectar nada con el anticuerpo anti-Prx-SO<sub>3</sub>. y tampoco deberíamos detectar bandas a la altura de 25 kDa con el anti-c-TXNPx ya que en estado reducido la enzima tiende a formar más dímeros. De esta manera, encontramos que la proteína utilizada en los ensayos enzimáticos se encuentra inactiva, ya que es detectada por anticuerpos que detectan la cisteína del sitio activo sobreoxidada de Prx.

### 5.6.3 Análisis preliminar del estado de oxidación de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

Se realiza el ensayo de oxidación de los mutantes c-TXNPxC71S y C76S, además de c-TXNPx wt como control positivo, que había sido usada en el ensayo de actividad peroxidasa. Las proteínas se trataron en base al protocolo establecido, de manera de obtener la forma reducida, la oxidada, la sobreoxidada y la sin tratar. En cada tratamiento las muestras se prepararon sin o con DTT, que estabiliza los sulfhidrilos libres, reduciendo en forma significativa la formación de puentes disulfuro, lo cual favorece la formación de monómeros y se realiza un SDS-PAGE.

Como se mostró en la figura 5, en la forma reducida se espera que la proteína forme dímeros o eventualmente oligómeros y que no existan monómeros, en la forma oxidada esperamos dímeros o decámeros en las formas más “sueltas” y en la sobreoxidada esperamos agregados de alto peso molecular. Como vemos en la figura 28, los mutantes presentan un patrón de sobreoxidación distinto que la wt: se sobreoxidan en menor cantidad, ya que no se ven los monómeros en igual intensidad que wt. Y además, no se ven los dímeros ni los oligómeros.



**Figura 28. Análisis del estado de oxidación y oligomerización de la c-TXNPx wt y los mutantes obtenidos.** Western blot de c-TXNPx wt (5 ug) y mutantes C71S y C76S (10 ug) con anticuerpo anti-c-TXNPx y los respectivos ponceau (A, C y E). Western blot de c-TXNPx y los mutantes C71S y C76S (5 ug) con anticuerpo anti peroxirredoxina SO<sub>3</sub> (anti-PRx-SO<sub>3</sub>) y los respectivos ponceau (B, D y F). Marcador de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher cat. numb. 26616). La proteína fue tratada para su estado reducido (red), sobreoxidado (so), oxidado (ox) y sin tratar, con o sin DTT.

En las condiciones oxidadas y sin tratar, cuando se corren en presencia de DTT, existe un pequeño retraso de la migración a la altura de los 25 kDa, lo cual podría sugerir que cuando se oxidan o no se tratan (proteínas que están en su mayoría oxidadas) estarían formando algún puente disulfuro intramolecular.

Se podría inferir que los mutantes no forman oligómeros sobreoxidados y por ende tampoco especies de alto peso molecular, pero sí existe una señal mínima que corresponde al tamaño de los monómeros.

Tanto las proteínas WT como las mutantes mostraron varios oligómeros (dímeros y de mayor peso molecular) a pesar de las condiciones desnaturalizantes y reductoras en las figuras 27 y 28. Corresponden a oligómeros de mayor peso molecular que permanecen inalterados a pesar del tratamiento con DTT, esto señalaría que existen fuertes interacciones entre subunidades que no se alteran en condiciones reductoras y que se ha visto en otras Prxs de parásitos (Alphey et al., 2000; Budde et al., 2003; Castro et al., 2002; Guerrero et al., 2000; Morais et al., 2015).

## 6. Discusión

Como se ha mencionado, las c-TXNPx de *T. cruzi* son estudiadas porque constituyen un importante rol de defensa contra el hospedero una vez que lo infectan. Son capaces de reducir especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno, para que así el parásito evada al sistema inmunológico y tenga éxito en la infección. Elegimos estudiar rol de las cisteínas a través de mutantes de cisteínas en particular porque son residuos que pueden formar puentes disulfuro, inter e intra catenarios, y pueden tener un impacto en cuanto a la estructura o la funcionalidad enzimática evidenciando la importancia de las cisteínas estudiadas. Previamente se habían realizado mutantes de cisteína en posición 57 y 111 que se encuentran expuestas al solvente y que mostraron tener impacto en la oligomerización y en la capacidad de oxidarse (Piñeyro et al., 2019). Además, también se habían realizado mutantes de las C<sub>P</sub> (52) y C<sub>R</sub> (173), las cuales son esenciales para su actividad peroxidasa. Por lo que en este trabajo tenemos el propósito de seguir estudiando dos de las tres cisteínas de TXNPx que aún no han sido estudiadas, teniendo en cuenta que la C76 está solo en *T. cruzi*.

### 6.1 Mutagénesis sitio dirigida para mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

Es interesante el estudio de las proteínas mutantes de estas cisteínas para ver qué rol tienen en la funcionalidad y/o estructura de la enzima. Además, una de las cisteínas que mutamos, la C76, no se encuentra en las Prxs mamíferas lo cual resulta doblemente interesante, ya que probablemente pueda haber sido seleccionada en la especie por alguna característica favorable.

<i>Trypanosoma cruzi</i>	61	DRVKEFS	DIGCEVL	ACSM	DSEYSHLAW	TSIERKR	GGLGQM	NIPILAD	KTKCIM	KSYGVLK	120	
<i>Trypanosoma brucei</i>	61	DRVKEFN	DVDC	CEVI	ACSM	DSEF	SHLAW	TNVERK	KGGLG	TMNIPIL	ADKTKS	IMKAYGVLK 120
<i>Mus musculus</i>	61	DRADEF	FKKLN	CQVI	GASV	DSHF	CHLAW	INTPK	KQGGL	GPMNIP	LISDP	KRTIAQDYGVLK 120
<i>Homo sapiens</i>	61	DRAEEF	FKKLN	CQVI	GASV	DSHF	CHLAW	VNTP	PKKQ	GGLG	PMNIP	LVSDPKRTIAQDYGVLK 120

**Figura 29.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas desde el aminoácido 61 al 120 de la proteína Prx citosólica de *T. cruzi* y *T. brucei*, Prx-1 de *Mus musculus* y de la Prx-1 de *Homo sapiens*. Se marcan en color azul los residuos aminoacídicos en la posición de interés: 71 y 76.

Como vemos en la figura 29, en *T. cruzi* y en *T. brucei* se conservan las cisteínas en la posición 71 y 76, pero en *Mus musculus* y en *Homo sapiens* se conservan solo las cisteínas en la posición 71, ya que la 76 cambia a alanina en Prx-1 y a valina en Prx-2. Estos aminoácidos son similares, ambos son apolares e hidrofóbicos, además tienen propiedades alifáticas por tener en su cadena ramificada un hidrocarburo lineal. En cambio la cisteína es un aminoácido polar sin carga, con una cadena ramificada como la de alanina pero con el agregado del grupo sulfhidrilo (-SH), por ende, son otras las interacciones que puede realizar en su entorno.

Con el objetivo de estudiar el papel de estas cisteínas en la estructura y función de c-TXNPx, se realizó mutagénesis sitio dirigida con el fin de generar dos mutantes de cisteína (C71S y C76S) de la proteína c-TXNPx y poder obtenerlas en forma purificada para realizar ensayos de funcionalidad y oligomerización. Previo a su realización se llevó a cabo el diseño de los cebadores para ambas mutaciones, según el kit de mutagénesis usado que especifica que el cebador *forward* incluye la mutación puntual y el cebador *reverse* es su consecutivo.

Al realizar la PCR en primera instancia, se encontró amplificación para el mutante c-TXNPxC76S pero no para C71S. Entonces se eligieron cambiar algunas condiciones: la más importante es la temperatura de annealing para la que se realiza un gradiente, y por otro lado se prueba si el buffer GC de la ADN polimerasa brinda mejores resultados de amplificación. Los resultados obtenidos mostraron que los cebadores hibridan mejor con el ADN blanco a una temperatura de *annealing*

más baja a la que era estipulada por el proveedor, pero igualmente, no difiere en más de 5 grados con la temperatura de *melting* lo cual es esperado según el protocolo de la enzima ADN polimerasa Phusion, que sugiere hacer un gradiente de temperaturas de *annealing* para encontrar la que mejor se adapta.

Una vez que se obtuvieron los resultados de amplificación del plásmido para ambos mutantes, se eliminó el ADN plasmídico parental metilado con la enzima *DpnI* y se ligaron las cadenas de ADN que contienen la mutación para generar el plásmido. Luego cada plásmido fue transformado en bacterias *E. Coli* DH5- $\alpha$ .

Con la posterior secuenciación de los plásmidos, vimos que de los 14 clones que brindaron resultado en la PCR, solo 9 contenían la mutación deseada. Los 5 restantes correspondientes a c-TXNPxC71S tenían modificaciones en la secuencia, 4 clones tenían inserciones de aproximadamente 40 nucleótidos y el clon restante estaba truncado. Entonces concuerda con que el resultado de la PCR en la figura 11 tenga algunas variaciones en los tamaños. Para el caso de c-TXNPxC76S, las variaciones de tamaño no corresponden a algún defecto en la secuencia, ya que fue el mutante en el que todos los clones evidenciaban la correcta secuencia, sin inserciones y deleciones.

## 6.2 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S: expresión inicial y puesta a punto del ensayo

En cuanto al análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas, se siguió el protocolo detallado en métodos que funciona para la expresión de c-TXNPx wt así como también para otros mutantes de cisteína expresados previamente en el laboratorio (Piñeyro et al., 2019). En la expresión inicial se espera una inducción llamativa de los mutantes por el agregado de IPTG además de una expresión mayor en la fracción soluble en vez de la precipitada.

Los resultados no fueron los esperados, ya que no se veía expresión en ninguno de los mutantes. Fue necesario cambiar algunas condiciones de la expresión, como por ejemplo: las concentraciones del inductor y la temperatura de expresión, la densidad óptica en la que se inicia la inducción o el agregado de ampicilina en el cultivo a inducir. Una vez encontradas las condiciones en las que los

mutantes se expresan en bajas cantidades, continuamos realizando el ensayo de purificación.

Encontramos que existe una mayor expresión en la fracción sin inducir que en la inducida, así como una mayor expresión de la proteína en la fracción precipitada. Es probable que el obtener más proteína en la fracción sin inducir que en la inducida sea a causa de una baja concentración del inductor o una concentración inadecuada para el plásmido, como también a causa de condiciones de expresión desfavorables.

Entonces decidimos probar las distintas variables. Por un lado, elegimos brindarle a las bacterias un crecimiento más enriquecido con el agregado de glucosa al 1% para proveer un medio más rico, lo cual generalmente hace que se exprese mejor la proteína recombinante. Por otro lado, probar distintas concentraciones del inductor IPTG, distintos tiempos y temperatura de inducción. Como mostramos en resultados, la temperatura que se estaba usando de 30°C por 4 a 5 horas es la más adecuada, ya que a 20°C se obtuvo menor expresión que para 30 grados. Para la concentración de IPTG, los mejores resultados fueron a concentraciones mayores a 0,5 mM de IPTG que era lo que estaba estipulado inicialmente, 1,5 mM para el mutante C71S y 1 mM para C76S. Entonces vemos que es importante tener en cuenta las distintas concentraciones de IPTG ya que pueden variar dependiendo del mutante.

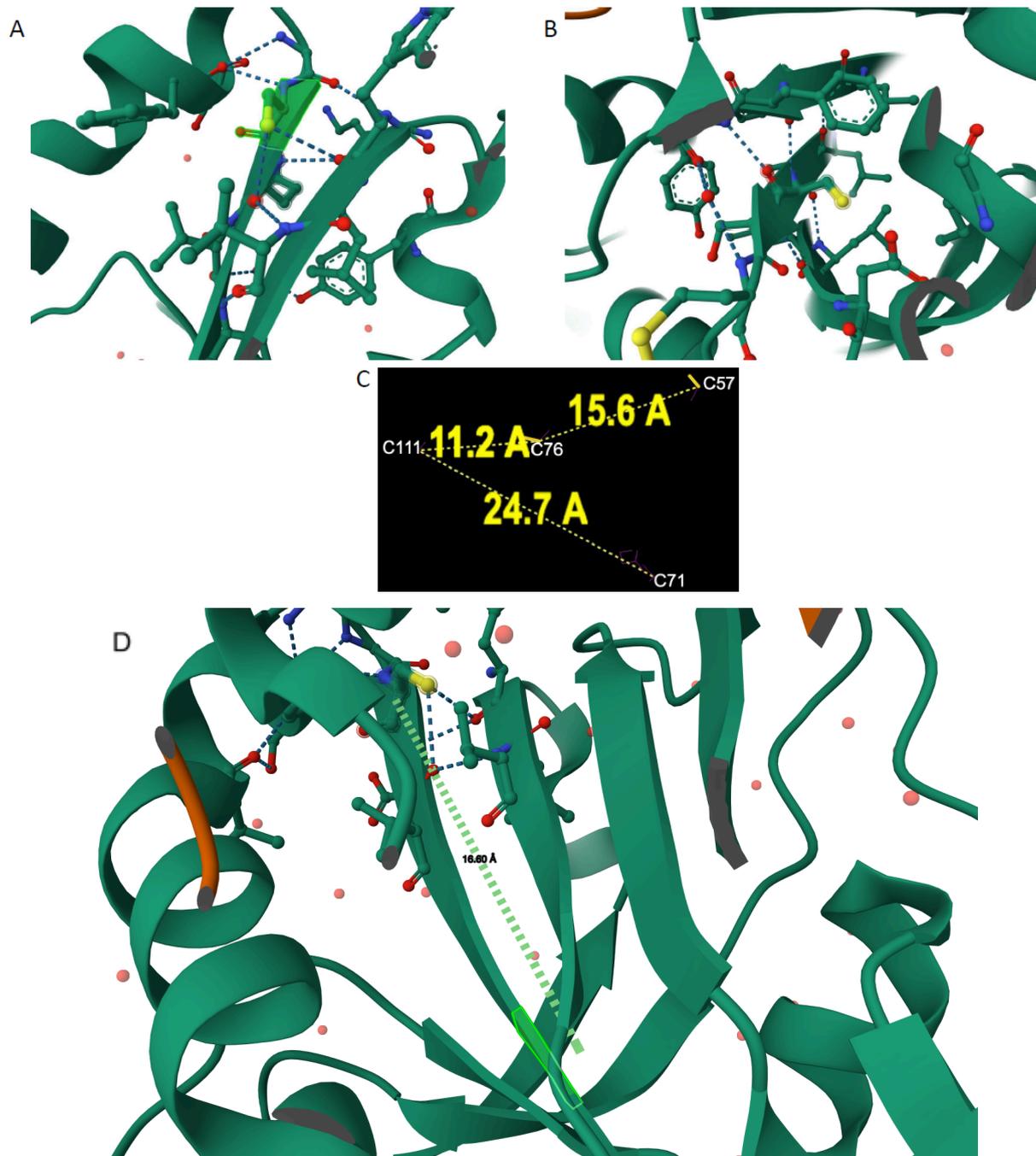
Luego vimos que el hecho de no agregar inhibidor de proteasas al resolubilizar las bacterias cosechadas, podría ser una causa de degradación de la proteína de interés provocando una menor señal en la fracción inducida. Entonces se agregó PMSF, un inhibidor de serina proteasas, proteasas que en su sitio activo tienen residuo de serina encargado de escindir el enlace peptídico en la estructura primaria de las proteínas. La falta de proteasa en el buffer de inicio no causó un problema en la expresión de la proteína, ya que la proteína recombinante no aumentó su expresión en la fracción inducida al agregarle PMSF.

Buscando alternativas o cambios en el método de expresión de mutantes, se encontró que podría ser útil el agregado del antibiótico de ampicilina al cultivo grande, donde se realiza la inducción, de no hacerlo la bacteria podría rechazar el plásmido de expresión y expulsarlo por "no tener la selección necesaria" ("Bacteria Expression Support—Troubleshooting - UY," n.d.). Además también se encontró otro parámetro a tener en cuenta, la existencia de diferencias en la inducción cuando se

realiza en momentos con mayor densidad óptica a lo que estaba establecido (0,5 a 0,7) (Khanh et al., 2020). Entonces estos dos cambios, junto con el uso de IPTG recién preparado, son considerados en la siguiente prueba de expresión, en la que en la mayoría de los clones estudiados no tienen tanta diferencia entre la fracción inducida y sin inducir en cuanto a intensidad de la banda en el western blot. También vemos una solubilidad de la proteína que es más clara, ya sea en la soluble o precipitada. Todos los resultados favorables que ofrecieron los distintos ensayos, fueron usados para la expresión y purificación de las proteínas mutantes.

En comparación a los controles que fueron considerados, ya sea de la proteína wt o de otros mutantes creados anteriormente en el laboratorio, la expresión de las proteínas recombinantes es considerablemente menor. Probablemente sea porque las cisteínas de esa posición que fueron cambiadas por serina generen alguna interacción que les provoque inestabilidad en cuanto a la estructura y que por ello se degradan o precipitan y al final obtengamos menor cantidad.

Mirando la estructura de la c-TXNPx en estado reducido, vimos que en el caso de la C71 el SH puede formar puentes de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del residuo W27, o del residuo E72, mientras que en el caso de la C76 su amida y carbonilo forman enlace de hidrógeno con los residuos F42 y Y43. También se analizaron las distancias entre cisteínas que no sean las reactivas en la estructura de la proteína, como vemos a continuación.



**Figura 30. Interacciones de las cisteínas de c-TXNPx.** **A.** Visualización de la cisteína 71 de la c-TXNPx en medio de los demás aminoácidos **B.** Visualización de la cisteína 76 de la c-TXNPx en medio de los demás aminoácidos **C.** Distancias en ángstrom (Å) de las cisteínas de interés con los residuos más cercanos de cisteína que no son reactivas, como la C57 y C111 **D.** Visualización de la ubicación y distancia en ángstrom (Å) de la cisteína 71 con la cisteína 76 de c-TXNPx. Fotos realizadas en el programa 3D Viewers > Mol\*, en el sitio <https://www.rcsb.org/>.

Las distancias encontradas entre las cisteínas de interés y la C57 y/o C111 no son consideradas cercanas, por ende, no existirían interacciones que puedan verse afectadas por las mutaciones realizadas. Además evaluamos la distancia entre la cisteína 71 y la cisteína 76 que es de 16.6 Å, no consideramos que se encuentren cerca como para generar interacciones estables, pero por algún reordenamiento podrían disminuir la distancia. Cabe destacar que estamos estudiando la c-TXNPx en su estado reducido, quizá en el estado oxidado algún aminoácido se reacomode y se ubique más cerca de las cisteínas de interés.

### 6.3 Purificación de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S

Se realizó una prueba a pequeña escala, para la purificación de las proteínas mutantes, en la que se utilizó las fracciones solubles y precipitadas. Con esto se buscó definir a partir de cuál de las fracciones se obtenía proteína para así realizar los cultivos más grandes y purificar a mayor escala las proteínas recombinantes.

A partir del western blot de las fracciones eluidas de la prueba de purificación, se eligen algunos clones que mostraron expresar los mutantes en cantidades que permiten su purificación, los clones son c-TXNPxC71S 10.1 con DO de 0,8 a 1 y c-TXNPxC76S 2.1 con DO 0,6 a 0,8, ambos en fracción soluble. Considerando que el tamaño de las proteínas recombinantes es de 22 kDa, ambos en el primer eluido se obtienen en escasas cantidades, pero en el segundo eluido la cantidad aumenta, sobre todo para el mutante C76S. En comparación al segundo eluido del control c-TXNPx, nuestros mutantes no se obtienen en grandes cantidades, lo cual era esperado al tener baja expresión de las proteínas.

Entonces a partir de esta prueba de purificación definimos los clones y sus condiciones de expresión para realizar el ensayo de expresión a mayor escala para la purificación a mayor escala de los mutantes, ambos desde la fracción soluble.

Las bandas que se obtienen en los eluidos 1, 2 y 3 en ambos mutantes, coinciden con la altura de la banda que se ve en la fracción soluble pero que se ausenta en el material no unido (22 kDa) y que corresponde al peso molecular esperado de los mutantes. Para el caso de C76S se obtiene además proteína en el

eluido 7, lo cual podría deberse a una interacción más fuerte a la columna que las proteínas que eluyen al principio y que además se pierden en los primeros lavados.

Entonces podemos afirmar que se purificaron las proteínas recombinantes a través de su interacción con la columna mediante la cola de histidinas, las cuales interaccionan débilmente y eluyen en los lavados o interaccionan más fuertemente y eluyen más tarde en los eluidos. Para este problema sugerimos que el lavado sea con buffer de lavado nativo con menor concentración de imidazol (80 o 50 mM en vez de 100 mM), o podría ser un gradiente de imidazol creciente generado por ejemplo con *ÄKTA pure™ chromatography system*, de esta manera le brindamos a la proteína todas las concentraciones posibles de imidazol para que pueda eluir cuando realmente pierda las interacciones con la columna, y así no perderla en lavados.

En cuanto a los dímeros que la proteína wt normalmente crea, de aproximadamente 40 kDa, en los eluidos de los mutantes no se representan bandas a esa altura. Los dímeros son la unidad mínima de la enzima, se ven en condiciones de reducción y son muy estables, por lo que podemos sugerir que esas cisteínas mutadas son importantes en la formación de los dímeros. Lo mismo sucede para el caso de los oligómeros que se forman de varios dímeros, que se observan en la proteína wt normalmente y no se observan en los mutantes.

## 6.4 Análisis funcional: Ensayos de actividad peroxidasa y de estados de oxidación para c-TXNPx wt, cTXNPxC71S y c-TXNPxC76S

El ensayo de actividad peroxidasa para la proteína c-TXNPx wt fue realizado con el fin de poner a punto el ensayo y ser utilizada como control para la actividad peroxidasa que se planificaba realizar cuando se purificaran los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S. Pero se encontró que a simple vista, los gráficos no tenían la caída de absorbancia esperada, eran caídas menores que diferían en muy poco con los controles sin proteína. Además se realiza el cálculo de velocidades de la enzima y ésta no difiere en absoluto para las distintas concentraciones de

c-TXNPx, lo cual estaría indicando que las caídas de absorbancia no eran debidas a la proteína sino a alguno de los demás factores que forman parte del ensayo.

Una vez obtenidos los mutantes, volvimos a realizar el ensayo acoplado, con la proteína wt de control, además de la m-TXNPx. En esos experimentos, observamos que hubo caída de absorbancia en el control negativo, lo que podría sugerir que hay una auto-oxidación de alguno de los componentes de la cadena, que reacciona con el peróxido. Luego comprobamos mediante un western blot con anticuerpos anti-Prx-SO<sub>3</sub> que la proteína sin tratar estaba sobreoxidada, dándole lógica a los resultados del ensayo que eran poco concordantes. Por falta de tiempo no se llegó a poner a punto el método nuevamente.

En cuanto a los ensayos de oxidación, encontramos que la proteína wt se encuentra sobreoxidada como ya lo habíamos chequeado, por la señal con los anticuerpos anti-Prx-SO<sub>3</sub>, además el patrón de sobreoxidación es distinto entre las proteínas wt y los mutantes. Igualmente podemos inferir que los mutantes parecen no oligomerizar, porque no existe señal de los anticuerpos a la altura del peso molecular de 220 kDa o más, lo cual nos podría decir que los residuos aminoacídicos estudiados están involucrados en la formación del decámero u oligómeros mayores, o también del dímero ya que tampoco obtenemos señal a la altura de los 40 kDa, solo se obtienen monómeros que se identifican con una escasa señal.

## 7. Conclusiones

- Se obtuvieron dos mutantes de cisteínas de la c-TXNPx, el mutante C71S y el mutante C76S mediante mutagénesis sitio dirigida, se generaron dos construcciones usando el vector pQE30: c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S. Las mutaciones en el ADN fueron puntuales, cambiando el codón tgc por agc, el cual codifica para serina en vez de cisteína, en la posición 71 o 76 de la cadena aminoacídica.

- Se realizó el análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes. Se pudo poner a punto el ensayo de expresión de las proteínas recombinantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S. En este análisis se probaron diferentes variables, logrando con los sucesivos cambios, una expresión aunque baja de ambas proteínas en la fracción soluble.

- Se logró la purificación de las proteínas c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S en alto grado de pureza. A través de una purificación a gran escala, con las condiciones obtenidas de todas las pruebas efectuadas.

- En cuanto a los ensayos de actividad peroxidasa, se realizaron para los mutantes y la proteína wt. Para la proteína wt se concluye que se encuentra inactivada por sobreoxidación, lo que no permite brindar datos concordantes de actividad para los mutantes.

- En el análisis de la oligomerización, en comparación a la proteína wt, en los mutantes no se observa la oligomerización que se observa en la proteína wt, ya que no se ven bandas de aproximadamente 40 kDa correspondientes al dímero que suele observarse en la proteína wt. Tampoco se observaron formas oligoméricas de mayor tamaño que se presentan cuando la proteína es sometida a tratamiento de sobreoxidación.

## 8. Perspectivas

- Mejorar la expresión de los mutantes c-TXNPxC71S y c-TXNPxC76S. Una posibilidad es clonar ambos genes en otro vector de expresión. Correa et al. (2014) diseñaron un vector que incluye secuencias que codifican a proteínas de unión a la proteína que ayudan en la solubilización de las proteínas blanco, además estas secuencias pueden ser clivadas porque presentan una región de corte para proteasas, por lo que sería una buena alternativa.

Otra posibilidad para mejorar la expresión podría ser probar otro medio de crecimiento de las bacterias, por ejemplo el *Terrific Broth*, ya que es un medio más rico que soporta mayores concentraciones de *E. coli*, obteniendo un mejor rendimiento del ADN plasmídico.

- Con las proteínas recombinantes purificadas, las perspectivas son realizar una caracterización de su funcionalidad, así como oligomerización en distintas condiciones (pH, temperatura, oxidación).

Proponemos que se repitan los ensayos de actividad peroxidasa con el previo purificado de la proteína TR y de la c-TXNPx wt fresca, para obtener la actividad característica de la proteína control, ya que la que se usó estaba con poca actividad. Además, deberían repetirse los ensayos de oligomerización para los mutantes, con el cambio del estado redox, y probar también su oligomerización de la proteína dependiente de pH o temperatura usando gel filtración. Por último, sería deseable que se estudie la actividad chaperona, función conocida en la c-TXNPx wt.

- Finalmente, proponemos el estudio de la doble mutante, es decir, que contenga la mutación de la cisteína 71 y de la cisteína 76, ambas por serina. Para ello proponemos la creación del doble mutante en base a uno de los dos plásmidos que ya se obtuvieron mutados, mediante una nueva PCR con los cebadores ya diseñados.

## 9. Referencias Bibliográficas

- Alphey, M.S., Bond, C.S., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., Hunter, W.N., 2000. The Structure of Reduced Tryparedoxin Peroxidase Reveals a Decamer and Insight into Reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *Journal of Molecular Biology* 300, 903–916. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3881>
- Angelucci, F., Bellelli, A., Ardini, M., Ippoliti, R., Saccoccia, F., Morea, V., 2015. One ring (or two) to hold them all – on the structure and function of protein nanotubes. *FEBS J.* 282, 2827–2845. <https://doi.org/10.1111/febs.13336>
- Angelucci, F., Miele, A.E., Ardini, M., Boumis, G., Saccoccia, F., Bellelli, A., 2016. Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: Several physiological roles for a potential chemotherapy target. *Mol. Biochem. Parasitol.* 206, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.03.005>
- Angelucci, F., Saccoccia, F., Ardini, M., Boumis, G., Brunori, M., Di Leandro, L., Ippoliti, R., Miele, A.E., Natoli, G., Scotti, S., Bellelli, A., 2013. Switching between the alternative structures and functions of a 2-Cys peroxiredoxin, by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 425, 4556–4568. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.002>
- Arias, D.G., Marquez, V.E., Chiribao, M.L., Gadelha, F.R., Robello, C., Iglesias, A.A., Guerrero, S.A., 2013. Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.036>
- Bacteria Expression Support—Troubleshooting - UY [WWW Document], n.d. URL <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/technical-resources/technical-reference-library/protein-expression-support-center/bacterial-expression-support/bacterial-expression-on-support-troubleshooting.html> (accessed 4.5.24).
- Bank, R.P.D., n.d. RCSB PDB - 4LLR: Tryparedoxin peroxidase (TXNPX) from *trypanosoma cruzi* in the reduced state [WWW Document]. URL <https://www.rcsb.org/structure/4LLR> (accessed 3.17.24).
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J.-J., Dietz, K.-J., 2009. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* 583, 1809–1816. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.029>
- Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984. <https://doi.org/10.1038/nature02075>
- Bolduc, J., Koruza, K., Luo, T., Malo Pueyo, J., Vo, T.N., Ezeriņa, D., Messens, J., 2021. Peroxiredoxins wear many hats: Factors that fashion their peroxide sensing personalities. *Redox Biol.* 42, 101959. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101959>
- Bowman, N.M., Kawai, V., Levy, M.Z., Cornejo del Carpio, J.G., Cabrera, L., Delgado, F., Malaga, F., Cordova Benzaquen, E., Pinedo, V.V., Steurer, F., Seitz, A.E., Gilman, R.H., Bern, C., 2008. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 1822–1828. <https://doi.org/10.1086/588299>
- Brizuela, M., Huang, H.M., Smith, C., Burgio, G., Foote, S.J., McMorran, B.J., 2014. Treatment of erythrocytes with the 2-cys peroxiredoxin inhibitor, Conoidin A, prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and enhances parasite sensitivity to chloroquine. *PLoS One* 9, e92411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092411>
- Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Nimtz, M., 2003. Verification of the interaction of a tryparedoxin peroxidase with tryparedoxin by ESI-MS/MS. *Biol. Chem.* 384, 1305–1309. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.146>
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M., 2003. *Diversidad clonal de Trypanosoma cruzi y epidemiología de la enfermedad de Chagas*. *Microbes Infect.* 5, 419–427. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00050-9)

- Castro, H., Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Lünsdorf, H., Wissing, J., Tomás, A.M., 2002. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* 33, 1563–1574. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01088-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01088-2)
- CDC - DPDx - American Trypanosomiasis [WWW Document], 2021. URL <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html> (accessed 7.27.24).
- Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., Rhee, S.G., 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7017–7021.
- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, 2015. *Releve Epidemiol. Hebd.* 90, 33–43.
- Cho, C.-S., Yoon, H.J., Kim, J.Y., Woo, H.A., Rhee, S.G., 2014. Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 12043–12048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401100111>
- Chuang, M.-H., Wu, M.-S., Lo, W.-L., Lin, J.-T., Wong, C.-H., Chiou, S.-H., 2006. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2552–2557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510770103>
- Control of Chagas disease second report of a WHO expert committee. - U.S. Department of Commerce [WWW Document], n.d. URL [https://search.library.doc.gov/discovery/fulldisplay/alma991000290582704716/01USDOC\\_INST:01USDOC](https://search.library.doc.gov/discovery/fulldisplay/alma991000290582704716/01USDOC_INST:01USDOC) (accessed 2.21.24).
- Copley, S.D., Novak, W.R.P., Babbitt, P.C., 2004. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43, 13981–13995. <https://doi.org/10.1021/bi048947r>
- Correa, A., Ortega, C., Obal, G., Alzari, P., Vincentelli, R., Oppezzo, P., 2014. Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Front. Microbiol.* 5, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00067>
- Costa Chaves, G., Abi-Saab Arrieche, M., Rode, J., Mechali, D., Ouverney Reis, P., Vieira Alves, R., Stobbaerts, E., Girón Aguilar, N., Ribeiro, I., 2017. Estimación de la demanda de medicamentos antichagásicos: una contribución para el acceso en América Latina. *Rev. Panam. Salud Pública* 41, e45. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.45>
- Cox, A.G., Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., 2009. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* 425, 313–325. <https://doi.org/10.1042/BJ20091541>
- de Oliveira, W.A., Gómez i Prat, J., Albajar-Viñas, P., Carrazzone, C., Kropf, S.P., Dehousse, A., Camargo, A.M. de A., Anselmi, M., Barba, M.C.P., Guiu, I.C., Barros, M. das N.D.S., Cavalvanti, M. da G.M., Correia, C.B., Martins, S.M., FINDECHAGAS Workgroup, 2022. How people affected by Chagas disease have struggled with their negligence: history, associative movement and World Chagas Disease Day. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 117, e220066. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220066>
- Dias, J.P., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A.V., Martins Netto, E., Grassi, F., Silva, M., Tatto, E., Mendonça, J., Araújo, R.F., Shikanai-Yasuda, M.A., Aras, R., 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 296–300. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000300014>
- Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Martinez, C., Gonzalez, D., Coleman, P., Davies, C., 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol.* 19, 44–49. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)00013-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)00013-2)
- Gardner, M., 2009. Caracterización de la Triparredoxina Peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi* en condiciones de oxidación -reducción.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., Weissman, J.S., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741. <https://doi.org/10.1038/nature02046>

- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P.G., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722–728. <https://doi.org/10.1038/nrm2240>
- Gretes, M.C., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2012. Peroxiredoxins in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 608–633. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4404>
- Guerrero, S.A., Lopez, J.A., Steinert, P., Montemartini, M., Kalisz, H.M., Colli, W., Singh, M., Alves, M.J., Flohé, L., 2000. His-tagged trypanothione peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 410–414. <https://doi.org/10.1007/s002530051634>
- Gurevitz, J.M., Gaspe, M.S., Enriquez, G.F., Provecho, Y.M., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2013. Intensified Surveillance and Insecticide-based Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002158>
- Hall, A., Karplus, P.A., Poole, L.B., 2009. Typical 2-Cys peroxiredoxins—structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* 276, 2469–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2011. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 795–815. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3624>
- Han, Y.-H., Kim, H.-S., Kim, J.-M., Kim, S.-K., Yu, D.-Y., Moon, E.-Y., 2005. Inhibitory role of peroxiredoxin II (Prx II) on cellular senescence. *FEBS Lett.* 579, 4897–4902. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.049>
- Haraldsen, J.D., Liu, G., Botting, C.H., Walton, J.G.A., Storm, J., Phalen, T.J., Kwok, L.Y., Soldati-Favre, D., Heintz, N.H., Müller, S., Westwood, N.J., Ward, G.E., 2009. IDENTIFICATION OF CONOIDIN A AS A COVALENT INHIBITOR OF PEROXIREDOXIN II. *Org. Biomol. Chem.* 7, 3040–3048. <https://doi.org/10.1039/B901735F>
- Hasslocher-Moreno, A.M., Xavier, S.S., Saraiva, R.M., Sousa, A.S. de, 2021. Indeterminate form of Chagas disease: historical, conceptual, clinical, and prognostic aspects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 54, e02542021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0254-2021>
- Haynes, A.C., Qian, J., Reisz, J.A., Furdui, C.M., Lowther, W.T., 2013. Molecular basis for the resistance of human mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin 3 to hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* 288, 29714–29723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473470>
- Heppner, D.E., Janssen-Heininger, Y.M.W., van der Vliet, A., 2017. The Role of Sulfenic Acids in Cellular Redox Signaling: Reconciling Chemical Kinetics and Molecular Detection Strategies. *Arch. Biochem. Biophys.* 616, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.01.008>
- Hofmann, B., Hecht, H.-J., Flohé, L., 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347–364. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.040>
- Ishii, T., Warabi, E., Yanagawa, T., 2012. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50, 91–105. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.11-109>
- Iuchi, Y., Okada, F., Tsunoda, S., Kibe, N., Shirasawa, N., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, Y., Fujii, J., 2009. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem. J.* 419, 149–158. <https://doi.org/10.1042/BJ20081526>
- Jang, H.H., Kim, S.Y., Park, S.K., Jeon, H.S., Lee, Y.M., Jung, J.H., Lee, Sun Yong, Chae, H.B., Jung, Y.J., Lee, K.O., Lim, C.O., Chung, W.S., Bahk, J.D., Yun, D.-J., Cho, M.J., Lee, Sang Yeol, 2006. Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions. *FEBS Lett.* 580, 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.030>
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, S.G., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2004. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a

- molecular chaperone function. *Cell* 117, 625–635.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
- Jönsson, T.J., Ellis, H.R., Poole, L.B., 2007. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* 46, 5709–5721. <https://doi.org/10.1021/bi7001218>
- Karplus, P.A., 2015. A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 80, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.009>
- Khanh, N.V., Linh, N., Phuong, N., Huệ, N., Xuan, N., Khanh, V., Tran Quoc, D., 2020. The Improvement of Recombinant PirA Antigen Expression in *Escherichia coli* M15. *Stem Cell* 11, 9–16. <https://doi.org/10.7537/marsscj110320.02>
- Kimura, R., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S., Kano, S., 2013. 2-Cys peroxiredoxin of *Plasmodium falciparum* is involved in resistance to heat stress of the parasite. *Parasitol. Int.* 62, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.11.005>
- Knoops, B., Loumaye, E., Van Der Eecken, V., 2007. Evolution of the peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* 44, 27–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_2)
- König, J., Galliardt, H., Jütte, P., Schäper, S., Dittmann, L., Dietz, K.-J., 2013. The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *J. Exp. Bot.* 64, 3483–3497. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert184>
- Koo, K.H., Lee, S., Jeong, S.Y., Kim, E.T., Kim, H.J., Kim, K., Song, K., Chae, H.Z., 2002. Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 312–318. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2700>
- Krauth-Siegel, R.L., Comini, M.A., 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1236–1248. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>
- Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., Schmidt, H., 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biol. Chem.* 384, 539–549. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.062>
- Kumsta, C., Jakob, U., 2009. Redox-regulated chaperones. *Biochemistry* 48, 4666–4676. <https://doi.org/10.1021/bi9003556>
- Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect. Dis.* 13, 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- Leyens, G., Donnay, I., Knoops, B., 2003. Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136, 943–955. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(03\)00290-2](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(03)00290-2)
- Li, L., Shoji, W., Oshima, H., Obinata, M., Fukumoto, M., Kanno, N., 2008. Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice. *FEBS Lett.* 582, 2431–2434. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.050>
- Lian, F.-M., Yu, J., Ma, X.-X., Yu, X.-J., Chen, Y., Zhou, C.-Z., 2012. Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp1 peroxiredoxin reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 287, 17077–17087. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357368>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4, 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Loew, O., 1900. A NEW ENZYME OF GENERAL OCCURRENCE IN ORGANISMIS. *Science* 11, 701–702. <https://doi.org/10.1126/science.11.279.701>
- Lopez, J.A., Carvalho, T.U., de Souza, W., Flohé, L., Guerrero, S.A., Montemartini, M., Kalisz, H.M., Nogoceke, E., Singh, M., Alves, M.J.M., Colli, W., 2000. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 767–772. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00159-3)
- Lowther, W.T., Haynes, A.C., 2011. Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 99–109.

- <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3564>
- Melo, R.C.N., Fabrino, D.L., D'Avila, H., Teixeira, H.C., Ferreira, A.P., 2003. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biol. Int.* 27, 853–861. [https://doi.org/10.1016/s1065-6995\(03\)00173-2](https://doi.org/10.1016/s1065-6995(03)00173-2)
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189–197.
- Moon, J.C., Hah, Y.-S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2005. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 280, 28775–28784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505362200>
- Morais, M.A.B., Giuseppe, P.O., Souza, T.A.C.B., Alegria, T.G.P., Oliveira, M.A., Netto, L.E.S., Murakami, M.T., 2015. How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-Cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily. *J Biol Chem* 290, 8582–8590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619205>
- Nakamura, T., Kado, Y., Yamaguchi, T., Matsumura, H., Ishikawa, K., Inoue, T., 2010. Crystal structure of peroxiredoxin from *Aeropyrum pernix* K1 complexed with its substrate, hydrogen peroxide. *J. Biochem. (Tokyo)* 147, 109–115. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp154>
- Nelson, K.J., Knutson, S.T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L.B., Fetrow, J.S., 2011. Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* 79, 947–964. <https://doi.org/10.1002/prot.22936>
- Neumann, C.A., Krause, D.S., Carman, C.V., Das, S., Dubey, D.P., Abraham, J.L., Bronson, R.T., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., Van Etten, R.A., 2003. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424, 561–565. <https://doi.org/10.1038/nature01819>
- News Archive [WWW Document], n.d. . World Heart Fed. URL <https://world-heart-federation.org/news/> (accessed 2.20.24).
- Nogoceke, E., Gommel, D.U., Kiess, M., Kalisz, H.M., Flohé, L., 1997. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* 378, 827–836. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.8.827>
- Noichri, Y., Palais, G., Ruby, V., D'Autreaux, B., Delaunay-Moisan, A., Nyström, T., Molin, M., Toledano, M.B., 2015. In vivo parameters influencing 2-Cys Prx oligomerization: The role of enzyme sulfinylation. *Redox Biol.* 6, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.011>
- Parmigiani, R.B., Xu, W.S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P., Marks, P.A., 2008. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9633–9638. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803749105>
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *Lancet Lond. Engl.* 391, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2015. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001>
- Perkins, A., Nelson, K.J., Williams, J.R., Parsonage, D., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2013. The sensitive balance between the fully folded and locally unfolded conformations of a model peroxiredoxin. *Biochemistry* 52, 8708–8721. <https://doi.org/10.1021/bi4011573>
- Perkins, A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2014. Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles. *Biochemistry* 53, 7693–7705. <https://doi.org/10.1021/bi5013222>
- Peskin, A.V., Dickerhof, N., Poynton, R.A., Paton, L.N., Pace, P.E., Hampton, M.B., Winterbourn, C.C., 2013. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidic cysteine. *J. Biol. Chem.* 288,

- 14170–14177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460881>
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem* 30, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R., Radi, R., 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J.* 410, 359–368. <https://doi.org/10.1042/BJ20071138>
- Piñeyro, M.D., Arias, D., Ricciardi, A., Robello, C., Parodi-Talice, A., 2019. Oligomerization dynamics and functionality of *Trypanosoma cruzi* cytosolic tryparedoxin peroxidase as peroxidase and molecular chaperone. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1863, 1583–1594. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.013>
- Piñeyro, M.D., Chiribao, M.L., Arias, D.G., Robello, C., Parodi-Talice, A., 2023. Overoxidation and Oligomerization of *Trypanosoma cruzi* Cytosolic and Mitochondrial Peroxiredoxins. *Pathog. Basel Switz.* 12, 1273. <https://doi.org/10.3390/pathogens12101273>
- Piñeyro, M.D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., Robello, C., 2008. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.014>
- Piñeyro, M.D., Pizarro, J.C., Lema, F., Pritsch, O., Cayota, A., Bentley, G.A., Robello, C., 2005. Estructura cristalina de la triparedoxina peroxidasa del parásito humano *Trypanosoma cruzi*. *J. Struct. Biol.* 150, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.12.005>
- Poole, L.B., 2005. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 240–254. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.006>
- Poole, L.B., Reynolds, C.M., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Ellis, H.R., Li Calzi, M., 2000. AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6126–6133. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01704.x>
- Poynton, R.A., Peskin, A.V., Haynes, A.C., Lowther, W.T., Hampton, M.B., Winterbourn, C.C., 2016. Kinetic analysis of structural influences on the susceptibility of peroxiredoxins 2 and 3 to hyperoxidation. *Biochem. J.* 473, 411–421. <https://doi.org/10.1042/BJ20150572>
- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1, 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Ramos-Junior, A.N., Sousa, A.S. de, 2017. The continuous challenge of Chagas disease treatment: bridging evidence-based guidelines, access to healthcare, and human rights. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 745–747. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0495-2017>
- Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet Lond. Engl.* 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Reina-San-Martín, B., Cosson, A., Minoprio, P., 2000. Lymphocyte Polyclonal Activation: A Pitfall for Vaccine Design against Infectious Agents. *Parasitol. Today* 16, 62–67. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01591-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01591-4)
- Saccoccia, F., Di Micco, P., Boumis, G., Brunori, M., Koutris, I., Miele, A.E., Morea, V., Sriratana, P., Williams, D.L., Bellelli, A., Angelucci, F., 2012. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Struct. Lond. Engl.* 1993 20, 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.004>
- Salvatella, R., Irabedra, P., Castellanos, L.G., 2014. Interruption of vector transmission by native vectors and “the art of the possible.” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 122–130. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140338>
- Samuels, A.M., Clark, E.H., Galdos-Cardenas, G., Wiegand, R.E., Ferrufino, L., Menacho, S., Gil, J., Spicer, J., Budde, J., Levy, M.Z., Bozo, R.W., Gilman, R.H., Bern, C., 2013. Epidemiology of and Impact of Insecticide Spraying on Chagas Disease in

- Communities in the Bolivian Chaco. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2358.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002358>
- San-Miguel, A., Martin-Gil, F.J., 2009. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. Gac. Médica Bilbao 106, 106–113.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(09\)74661-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(09)74661-X)
- Sayed, A.A., Cook, S.K., Williams, D.L., 2006. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. J. Biol. Chem. 281, 17001–17010.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M512601200>
- Sayed, A.A., Williams, D.L., 2004. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 279, 26159–26166.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M401748200>
- Schmelling, N., 2016. Transformation and Storage Solution (TSS).
- Seo, J.H., Lim, J.C., Lee, D.-Y., Kim, K.S., Piszczek, G., Nam, H.W., Kim, Y.S., Ahn, T., Yun, C.-H., Kim, K., Chock, P.B., Chae, H.Z., 2009. Novel protective mechanism against irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin: Nalpha-terminal acetylation of human peroxiredoxin II. J. Biol. Chem. 284, 13455–13465.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M900641200>
- Shikanai-Yasuda, M.A., Carvalho, N.B., 2012. Oral transmission of Chagas disease. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 54, 845–852.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Soito, L., Williamson, C., Knutson, S.T., Fetrow, J.S., Poole, L.B., Nelson, K.J., 2011. PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. Nucleic Acids Res. 39, D332–337.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq1060>
- Sousa, A.S. de, Vermeij, D., Ramos, A.N., Luquetti, A.O., 2024. Chagas disease. The Lancet 403, 203–218. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01787-7)
- Specker, G., Estrada, D., Radi, R., Piacenza, L., 2022. Trypanosoma cruzi Mitochondrial Peroxiredoxin Promotes Infectivity in Macrophages and Attenuates Nifurtimox Toxicity. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12, 749476.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.749476>
- Teixeira, F., Castro, H., Cruz, T., Tse, E., Koldewey, P., Southworth, D.R., Tomás, A.M., Jakob, U., 2015. Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, E616–E624.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1419682112>
- Tetaud, E., Giroud, C., Prescott, A.R., Parkin, D.W., Baltz, D., Biteau, N., Baltz, T., Fairlamb, A.H., 2001. Caracterización molecular de peroxidases de tripanotona dependientes de tripanotona mitocondrial y citosólica en *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 116, 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00320-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00320-6)
- Ursini, F., Maiorino, M., Forman, H.J., 2016. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. Redox Biol. 8, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.010>
- Usui, M., Masuda-Suganuma, H., Fukumoto, S., Angeles, J.M.M., Hakimi, H., Inoue, N., Kawazu, S.-I., 2015. Effect of thioredoxin peroxidase-1 gene disruption on the liver stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Parasitol. Int. 64, 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.09.013>
- Wilkinson, S.R., Kelly, J.M., 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. Biol. Chem. 384, 517–525. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.060>
- Wilkinson, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, A., Kelly, J.M., 2000. Distintas enzimas mitocondriales y citosólicas median el metabolismo del peróxido dependiente de tripanotona en *Trypanosoma cruzi* \*. J. Biol. Chem. 275, 8220–8225.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8220>
- Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Radic. Biol. Med. 45, 549–561.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>
- Winterbourn, C.C., Metodiewa, D., 1999. Reactivity of biologically important thiol compounds

- with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 322–328.  
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00051-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00051-9)
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Hantgan, R.R., Karplus, P.A., 2002. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493–5504. <https://doi.org/10.1021/bi012173m>
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2003a. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–653.  
<https://doi.org/10.1126/science.1080405>
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., Poole, L.B., 2003b. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.  
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)00003-8)
- World Health Organization (WHO) [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int> (accessed 2.20.24).
- Yamagata, Y., Nakagawa, J., 2006. Control of Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 61, 129–165.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61004-4](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61004-4)