

PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO SULFÉNICO EN ALBÚMINA DE PLASMA

Martina Steglich Guarino

Tutora: Dra. Lucía Turell

Co-tutora: Dra. Beatriz Alvarez

Tesina para la obtención del título de la Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Enzimología – Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Octubre 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Albúmina sérica humana.....	7
2.1.1 Generalidades y estructura	7
2.1.2 Metabolismo y distribución	8
2.1.3 Funciones	9
2.1.4 Uso farmacéutico	10
2.1.5 HSA recombinante	10
2.2 Tioles biológicos	11
2.2.1 Generalidades y funciones	11
2.2.2 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....	13
2.2.3 Oxidación de tioles biológicos.....	14
2.3 Tiol de la HSA.....	15
2.3.1 Heterogeneidad.....	15
2.3.2 Reactividad	17
2.3.3 Rol en el contexto intravascular.....	19
2.4 Ácido sulfénico en proteínas	20
2.4.1 Generalidades	20
2.4.2 Roles en proteínas.....	22
2.4.3 Detección.....	23
2.5 Ácido sulfénico en HSA.....	31
2.5.1 Formación de HSA-SOH	31
2.5.2 Reactividad de HSA-SOH	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo general	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	37
4.1 Materiales	37
4.2 Soluciones	37
4.3 Soluciones de HSA.....	38
4.4 Soluciones de AhpE	39
4.5 Cuantificación de proteínas por el ensayo del ácido bicinónico (BCA)	40

4.6 Reacción de HSA-SH con NEM-biotina	40
4.7 Reacción de HSA-SOH con DCP-Bio1.....	40
4.8 Reacción de HSA-SOH con BCN-Bio1.....	41
4.9 Reacción de AhpE-SOH con DCP-Bio1	41
4.10 Detección de marca de biotina con FluoReporter® Biotin Quantitation Assay Kit.....	41
4.11 Análisis por espectrometría de masa “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)” de HSA tripsinizada.....	42
4.12 Análisis por espectrometría de masa “Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)” de AhpE (proteína entera).....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
5.1 Detección de la marca de biotina con el FluoReporter Biotin Quantitation Assay kit.....	43
5.2 Reacción de HSA reducida con NEM-biotina	43
5.3 Reacción de HSA oxidada con DCP-Bio1	44
5.4 Reacción de HSA oxidada con BCN-Bio1	52
6. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	58
7. REFERENCIAS.....	59
8. AGRADECIMIENTOS.....	68

ABREVIATURAS

HSA	Albúmina Sérica Humana
HSA-SH	Albúmina con el tiol en la forma reducida
HSA-SOH	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfénico
HSA-SO ₂ H	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfínico
HSA-SO ₃ H	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfónico
TNB	5-Tio-2-nitrobenzoato
DTNB	5-5'-Ditiobis-2-nitrobenzoato
NEM-biocitina	N α (3-maleimidilpropionil)biocitina
DCP-Bio1	3-(2,4-dioxociclohexil)propil-biotina 1
BCN-Bio1	Biciclo[6.1.0]nonino-biotina 1
AhpE	Alquilhidroperóxido reductasa E
AhpE-SH	AhpE con el tiol en la forma reducida
AhpE-SOH	AhpE con el tiol oxidado a ácido sulfénico
AhpE- SO ₂ H	AhpE con el tiol oxidado a ácido sulfínico
AhpE-S-DCP-Bio1	Producto de la reacción de AhpE-SOH y DCP-Bio1
BCA	Ácido Bicinconónico
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry

1. RESUMEN

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína mayoritaria del plasma. De las 35 cisteínas que posee, solo la Cys34 se encuentra libre. En plasma el 70% del tiol se encuentra reducido (HSA-SH) constituyendo el 80% de los tioles reducidos del compartimiento intravascular. Dicho tiol reacciona con especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, por lo que funciona como atrapador de especies reactivas. En el plasma, donde las defensas antioxidantes son escasas, el rol de la HSA cobra importancia. La oxidación por dos electrones del tiol de la albúmina conduce a la formación de un ácido sulfénico (HSA-SOH) relativamente estable. La formación de derivados de este tipo ha sido detectada en una creciente lista de proteínas y ha sido vinculada a procesos de estrés oxidativo, señalización celular y catálisis redox. Nuestro grupo ha logrado la detección del ácido sulfénico de la albúmina *in vitro* y lo ha caracterizado desde el punto de vista de su reactividad y estabilidad. Por lo tanto, dado que HSA-SOH ya ha sido detectado *in vitro* y que HSA-SH funciona como atrapador de especies reactivas en plasma, es nuestra hipótesis que el intermediario sulfénico también se forma en dicho compartimiento. Es por esto, que en este trabajo se pusieron a punto técnicas tendientes a su detección *in vivo*. Para ello se utilizó HSA comercial y se realizó la oxidación con peróxido de hidrógeno en condiciones optimizadas para obtener el máximo rendimiento de HSA-SOH.

Las sondas seleccionadas (DCP-Bio1 y BCN-Bio1) se encuentran derivatizadas con biotina. Esta última se cuantificó por fluorescencia utilizando un kit disponible comercialmente. En primer lugar se verificó el funcionamiento del sistema de detección de biotina en HSA utilizando la reacción entre NEM-biotina y HSA-SH. Luego se evaluó la sonda derivada de dimedona, DCP-Bio1, en distintas condiciones de reacción. En todos los casos, la relación biotina/HSA fue pequeña, y similar para la HSA oxidada y el control de HSA reducida. A partir de un estudio cinético se determinó que la reacción entre HSA-SOH y DCP-Bio1 es lenta y no logra competir con el decaimiento espontáneo de dicho sulfénico. La validez del método en su conjunto se confirmó utilizando la alquilhidroperóxido reductasa E, constatando la detección de AhpE-S-DCP-Bio1 mediante fluorescencia y espectrometría de masa de proteína entera.

La detección de HSA-SOH se logró utilizando la sonda derivada de un cicloalquino, BCN-Bio1. El rendimiento de la reacción obtenido por fluorescencia fue de 0.17 biotinas/HSA, indicativo de que se atraparon 0.17 HSA-SOH/HSA, consistente con resultados previos de nuestro grupo utilizando TNB. El análisis por espectrometría de masa de la proteína oxidada, tratada con la sonda y tripsinizada, mostró la formación del alquenil sulfóxido esperado. Se comprobó además que BCN-Bio1 no reacciona con HSA-SH.

El hecho de haber logrado el objetivo de este trabajo que consistió en la puesta a punto de las técnicas para la detección de ácido sulfénico en HSA comercial, nos habilita a comenzar a trabajar con muestras de plasma.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Albúmina sérica humana

2.1.1 Generalidades y estructura

La albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés, Human Serum Albumin) es la proteína mayoritaria del plasma. Está presente a una concentración de ~ 43 g/L (~ 0.6 mM), constituyendo el 60% de las proteínas plasmáticas. En su secuencia presenta una gran cantidad de aminoácidos ácidos y básicos, además de presentar un único triptófano y 35 cisteínas. Estas últimas forman 17 enlaces disulfuros, restando una única cisteína libre, la Cys34. Cabe destacar que se trata de una proteína simple en cuanto a que se compone solo de aminoácidos, ya que no se encuentra glicosilada, ni posee grupos prostéticos u otros aditivos. A pH fisiológico la HSA posee 215 iones por molécula y ~ 19 cargas negativas, que en conjunto le confieren una buena solubilidad [1].

Su estructura cristalográfica ya ha sido resuelta. Se trata de una proteína monomérica globular, compuesta en un 67 % por α -hélices y sin hojas β -plegadas, que presenta tres dominios homólogos, I, II y III (contando desde el amino terminal). Cada uno de estos dominios se subdivide en los subdominios A y B (Figura 2.1) [2].

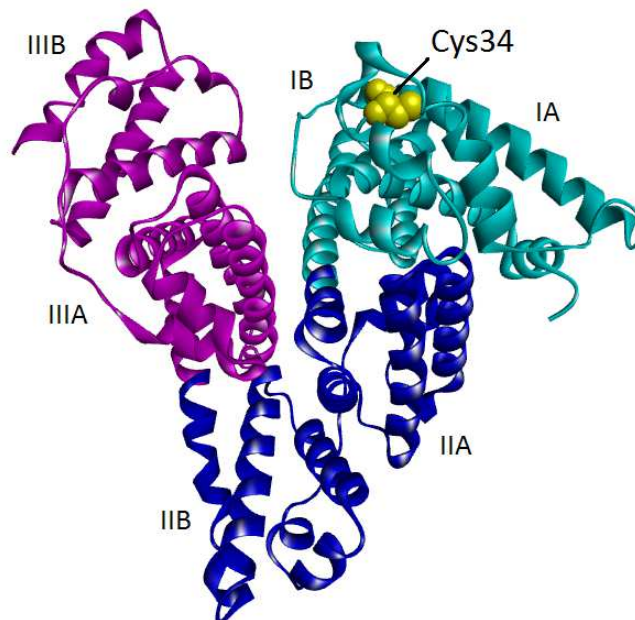


Figura 2.1. Estructura tridimensional de la HSA. Se muestra el dominio I en celeste, el II en azul y el III en violeta. La Cys34 se muestra en amarillo. La figura se generó utilizando el Discovery Studio Visualizer 4.0 (PDB ID: 4EMX).

Si bien existe homología entre los dominios en cuanto a su estructura primaria y terciaria, su disposición es asimétrica. Así, la forma característica de corazón, surge a partir de la orientación casi perpendicular de los dominios I y II entre sí, con el dominio III desprendiéndose del II en un ángulo de 45° [2]. La molécula de HSA sufre cambios conformacionales cuando se encuentra en condiciones no fisiológicas. Por ejemplo, dependiendo del grado de acidez o basicidad del ambiente, podemos encontrar distintos isómeros conformacionales, gracias al gran número de residuos ácidos y básicos presentes en su estructura [1,3]. La unión a ácidos grasos también determina cambios conformacionales, destacándose desviaciones en las posiciones de los subdominios IA y IIIB determinadas por la rotación del dominio I respecto al III [3]. A nivel local los cambios debido a la unión de ácidos grasos son más sutiles, pero de gran importancia ya que conducen a un aumento en la exposición de la Cys34 [4].

2.1.2 Metabolismo y distribución

La HSA se sintetiza predominantemente en el hígado, a una velocidad de 10-15 g/día en adultos sanos, lo que representa el 10 % de la síntesis proteica de dicho órgano [5]. La síntesis sigue la regla de “un gen - una proteína” y el plegamiento se da cotraduccionalmente comenzando en el amino terminal hacia el carboxilo terminal, y con la formación secuencial de los enlaces disulfuro a partir de la segunda cisteína. La razón por la cual la Cys34 no participa en la formación de disulfuros aún no está clara. La HSA recién sintetizada posee dos segmentos adicionales en el extremo amino terminal llamados prepéptido (18 aminoácidos) y propéptido (6 aminoácidos), que son escindidos por la enzima convertasa al momento de secretar la proteína. El prepéptido marca a la HSA como una proteína de secreción, mientras que la función del propéptido es hasta el momento desconocida [1].

No existe almacenamiento de HSA en el hepatocito por lo que una vez sintetizada, su secreción al torrente sanguíneo es inmediata. Se ha determinado que el 60 % de la HSA no se ubica en el compartimento intravascular, sino en espacios intersticiales y extracelulares, principalmente piel y músculo. La vida media de la proteína es de 19 días y se estima que una molécula de HSA abandona la circulación cada 22-24 horas. El proceso de degradación tiene lugar mayoritariamente en músculo, piel, hígado y riñón [1].

En el organismo, la HSA puede asociarse a la superficie de células endoteliales por unión específica, de manera consistente con una interacción receptor-ligando. Por un lado, la HSA nativa es reconocida por un receptor conocido como gp60 o albodina, presente en células endoteliales. Este receptor es el responsable del transporte transendotelial de la HSA nativa. De esta manera, una vez que se da la unión de la HSA al receptor se produce la internalización y subsecuente transcitosis, sin ingresar aparentemente al sistema de degradación lisosomal [1,6]. Por otro lado, la HSA no nativa, aquella que se encuentra desnaturalizada o modificada en residuos específicos,

se une a los receptores gp18 y gp30 con gran afinidad. Estos receptores presentes en células endoteliales median la unión de la HSA no nativa a la superficie celular, para que ésta sea luego endocitada y degradada en los lisosomas. Se ha postulado que el cambio conformacional en la HSA inducido por los distintos tipos de modificación, es suficiente para prevenir el reconocimiento de gp60 y aumentar la afinidad por gp18 y gp30 [1,7–9].

2.1.3 Funciones

La HSA posee variados roles biológicos que comprenden tanto al compartimiento intra como extravascular, y se describen a continuación.

Transporte de metabolitos. La HSA es conocida por su habilidad de unir y transportar moléculas de distintos tipos, tanto endógenas como exógenas, lo que le ha dado la reputación de “esponja molecular”. Esto se ve facilitado por la flexibilidad de la estructura que le permite adaptarse a los distintos ligandos y por la gran variedad de sitios de unión presentes en los tres dominios. Entre las moléculas que une se encuentran ácidos grasos de cadena media y larga, colesterol, bilirrubina, hemina, fosfolípidos, hormonas esteroideas (progesterona, testosterona, estradiol, estrona y aldosterona), vitaminas liposolubles (A, D, E y K), vitamina B12, ácidos biliares, y aminoácidos [1,10,11]. Presenta además varios sitios de unión a iones metálicos, siendo capaz de unir Cu (I/II), Cd (II), Hg (II), Au (I/II), Co (II/III), Mg (II), Ca (II), Al (II), Mn (II), Pt (II), Ni (II) y Tb (III). En cuanto a su capacidad de unir drogas, se incluyen en la lista warfarina, penicilina, tetraciclina, sulfamidas, digoxinas, barbituratos, entre otras [10,11]. Esta característica de la HSA de unir y transportar una gran cantidad de ligandos de distinta índole, la ha llevado a ser una molécula de especial interés en investigaciones de carácter farmacológico, clínico y nutricional.

Funciones en la circulación. Al constituir el 60 % de las proteínas plasmáticas, la HSA es responsable del 80 % de la presión coloidosmótica del plasma (~25 mmHg), por lo que ayuda en gran medida a mantener el agua en el compartimiento intravascular. Es considerada además el principal anión macromolecular en plasma dado que presenta ~19 cargas negativas a pH fisiológico. La gran cantidad de grupos ionizables a pH neutro y su bajo punto isoeléctrico le confiere además la mayor capacidad amortiguadora de pH en fluidos extravasculares [1].

Funciones de protección. Se ha propuesto que la HSA cumple un rol antioxidante, que deriva en parte de los ligandos que es capaz de unir. Uno de los ejemplos es la bilirrubina, que gracias a su capacidad de atrapar radicales lipoperoxilo ha sido propuesta como antioxidante. Además, la unión de la HSA a la bilirrubina no permite que ésta atraviese la barrera hematoencefálica, previniendo potenciales efectos neurotóxicos. La unión de cationes metálicos por otro lado, evita fenómenos como química de Fenton. Este es el caso del cobre, que se une con gran afinidad a un sitio en

el N-terminal, inhibiendo parcialmente procesos de oxidación. El efecto neto de la HSA sobre la oxidación catalizada por metales depende de la naturaleza del metal y de sus sitios de unión. También es importante la cantidad de metal unido, es decir, la proporción metal/HSA, y de si lo que se mide es la oxidación de moléculas exógenas o de la propia HSA, ya que en ésta hay residuos aminoacídicos capaces de reaccionar con los oxidantes formados [12]. A su vez, pero no menos importante, la HSA constituye un importante blanco de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxinitrito (ONOO⁻), y ácido hipocloroso (HOCl). Como consecuencia se dice que la HSA es un atrapador de especies reactivas, donde el principal responsable es el tiol de la Cys34 [12,13]. Cabe destacar que esta función de la HSA es importante ya que el plasma es un compartimiento relativamente pobre en lo que respecta a defensas antioxidantes.

2.1.4 Uso farmacéutico

La terapia con albúmina ha sido usada por más de 50 años en diversas situaciones entre las que se incluyen hipovolemia, shock, quemaduras, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, cirugías y hemodiálisis entre otras. Esta terapia es relativamente costosa y las ventajas sobre otros fluidos alternativos de menor costo es un tema que ha generado controversia durante años y que hoy día continúa en debate [14,15].

Recientemente, se ha ampliado el espectro de usos de la albúmina gracias a su potencial como transportadora de drogas. Por ejemplo, se utiliza conjugada a compuestos sintéticos orgánicos que actúan sobre células tumorales, como las tiosemicarbazonas, obteniendo como resultado un aumento en la direccionalidad y en la eficacia de la droga [16]. También se la conjuga a complejos de siRNA que se utilizan como alternativa para el silenciamiento de la expresión de proteínas aberrantes específicas. Se ha observado que dicha incorporación resulta en la protección de los complejos contra endonucleasas extracelulares, ayuda a preservar la capacidad del complejo y aumenta la internalización y la eficacia de silenciamiento [17]. El uso de albúmina en nanopartículas también es bastante reciente, y apunta a diversas aplicaciones tales como el tratamiento genético de enfermedades neurodegenerativas [18,19] y el tratamiento del cáncer [20].

2.1.5 HSA recombinante

La demanda de HSA en el mercado ha aumentado en los últimos tiempos debido a que posee diversas aplicaciones, como ya se ha comentado, desde el punto de vista de su uso clínico y del trabajo de investigación *in vitro* en el laboratorio. La producción de HSA comercial se basa mayormente en el fraccionamiento de plasma humano y se encuentra por lo tanto, limitado por las donaciones de sangre. Además esta HSA presenta un riesgo potencial por la posible presencia de patógenos

sanguíneos como los virus de la hepatitis o de la inmunodeficiencia humana, entre otros. Todos estos factores han impulsado el desarrollo de técnicas para la obtención de HSA recombinante (HSAr). Al no ser obtenida del plasma de distintos donantes, la HSAr presenta la ventaja de estar libre de patógenos y de ser menos heterogénea en cuanto a las modificaciones postraduccionales que pueda presentar. Otra ventaja es que se puede producir a gran escala, disminuyendo el costo económico. Se han ensayado distintos sistemas de expresión, como microorganismos procariotas y eucariotas, así como también animales y plantas transgénicas [21]. Por ejemplo, se lograron buenos rendimientos de HSAr mediante la producción en semillas de arroz, que según estudios de caracterización física y bioquímica, es equivalente a la HSA del plasma [22]. También se ha obtenido HSAr muy similar a la plasmática mediante la producción en *Pichia pastoris*, donde los estudios mostraron que la estructura secundaria, la posición y conectividad de los enlaces disulfuro e incluso la estructura terciaria son las mismas [2,23]. Se ha demostrado también mediante estudios *in vivo* que la vida media, excreción, antigenicidad y distribución de HSAr en tejidos es comparable a la HSA obtenida del plasma [24,25]. En este sentido, en el año 2007 se autorizó el uso con fines médicos de HSAr producida en *P. pastoris* y apenas un año más tarde comenzó a utilizarse en Japón con fines terapéuticos, teniendo éxito en pacientes con cirrosis hepática, shock hemorrágico y pacientes sometidos a cirugías cardíacas, entre otras [25–27]. En nuestro laboratorio se está trabajando en la expresión y purificación utilizando *P. pastoris* [28,29].

2.2 Tioles biológicos

2.2.1 Generalidades y funciones

El azufre es requerido por todos los organismos vivos y podemos encontrarlo en la naturaleza en una inmensa variedad de biomoléculas, que incluyen a las proteínas, azúcares, ácidos nucleicos, cofactores y metabolitos de bajo peso molecular. Es así como el azufre, junto con el carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y fósforo, es un componente elemental de los seres vivos. En cuanto a su ubicación en la tabla periódica, el azufre se encuentra en el grupo VIA junto al oxígeno (y al selenio), por lo que comparten en cierta medida propiedades como la reactividad química. Sin embargo, el posicionarse un período más abajo que el oxígeno le confiere al azufre varias propiedades distintas que son aprovechadas por las moléculas que lo contienen. Un ejemplo surge de comparar los enlaces disulfuro y los enlaces peróxido, donde la mayor estabilidad de los primeros es una de las principales causas de que sean parte integral de la estructura de las proteínas, y no así los segundos. Por otro lado, los tioles son mejores nucleófilos que los alcoholes como resultado de la combinación de menor electronegatividad y disponibilidad de pares de electrones libres [30]. Además con una configuración electrónica $[\text{Ne}]3s^23p^4$, el azufre posee seis electrones de valencia y un orbital-d vacío que le permiten tener una amplia variedad de estados de oxidación,

cada uno con reactividades y propiedades físicas propias. La forma totalmente reducida corresponde al tiol (RSH), compuesto organosulfurado formado por un grupo sulfhidrilo unido a un átomo de carbono. El estado de oxidación del tiol es -2, donde el átomo de azufre grande y polarizable, es rico en electrones y nucleofílico. De hecho, la nucleofilia se ve aumentada en la forma desprotonada, conocida como anión tiolato (RS^-) [30,31].

En sistemas biológicos los tioles pueden encontrarse en cisteínas y sus derivados de alto y bajo peso molecular. Los tioles son buenos reductores, con un potencial de reducción $E^\circ(RSSR/2RSH)$ de -0.24 V en el caso de la cisteína libre, y son además buenos nucleófilos. Esto, sumado a la capacidad del grupo tiol de pasar de su estado reducido a diferentes estados oxidados, les confiere gran versatilidad química que les permite participar en un amplio espectro de reacciones y procesos en las proteínas, por lo que las funciones de este grupo son diversas. Por ejemplo, cumplen roles estructurales mediante la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares que facilitan el correcto plegamiento de las proteínas y ayudan a estabilizar la estructura terciaria y/o cuaternaria. Éste es el caso de muchas proteínas de secreción, como la HSA. Además, los residuos de cisteína pueden participar en la coordinación de iones metálicos formando centros ferrosulfurados y dedos de zinc, entre otras estructuras. Por otro lado, existen enzimas que poseen en su sitio activo un residuo de cisteína altamente reactivo cuyo estado redox no cambia durante el ciclo catalítico, y donde las propiedades nucleofílicas de dicho residuo son las responsables de la catálisis. Algunas de estas enzimas son la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa y las cisteína proteasas. Las cisteínas más conservadas son las que están directamente involucradas en procesos de catálisis redox, y se hallan por ejemplo en oxidorreductasas. Estos residuos son oxidados a ácido sulfénico ($RSOH$) o a disulfuros ($RSSR'$) y son posteriormente regenerados por enzimas especializadas [32]. Otros residuos de cisteína son sensibles a la oxidación, lo que les permite sensor los niveles de especies reactivas, y actuar como interruptores en diversos procesos, de manera que constituyen transductores de la señalización mediada por dichas especies [33]. Como las propiedades químicas de las modificaciones que puede sufrir el tiol son diversas, le confieren especificidad a la señalización [34]. Varias de las modificaciones oxidativas que pueden sufrir los tioles son rápidamente reversibles, lo que les permite iniciar, amplificar y terminar la señalización redox mejor que el resto de los residuos aminoacídicos [35]. Estas cisteínas se pueden encontrar en factores de transcripción, sensores redox, quinasas y otras proteínas regulatorias [36]. Otras cisteínas son sitios de modificaciones postraduccionales y pueden ser las responsables de marcar el destino de la proteína que la contiene. Algunas cisteínas no cumplen roles específicos ni se encuentran conservadas, por lo que se les llama cisteínas huérfanas [32].

El contenido de cisteína de las proteínas es menor que lo esperado según el número de codones que la codifican. De hecho, la cisteína representa un 3.28 % del

total de los codones mientras que el porcentaje típico de éste aminoácido en proteínas es de 2.2 % o menos. Por otro lado, el contenido de cisteína en proteínas no es igual en todos los organismos, sino que aumenta con la complejidad de los mismos. Esto indica que aunque este aminoácido se encuentre subrepresentado entre los organismos, la introducción de la cisteína fue gradual durante la evolución. Por ejemplo, en humanos, bovinos y ratones la ocurrencia de cisteína es de 2.26 %. Para maíz, arroz y tomate es 1.62 - 1.69 %, mientras que para la levadura 1.21 %. Dentro de los procariotas, el contenido en bacterias ronda el 1 % y en arqueas 0.40 %. Según la hipótesis planteada, las habilidades de la cisteína han sido tomadas por la evolución y aprovechadas para el desarrollo de organismos más complejos. Se propone incluso que la aparición de la cisteína puede haber sido posterior en comparación con otros aminoácidos [37].

2.2.2 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

Durante muchos años se asumió que el rol de los radicales libres en la biología estaba limitado a reacciones que impactaban perjudicialmente sobre las funciones biológicas. Sin embargo, el descubrimiento de la generación endógena de $\cdot\text{NO}$ en mamíferos y el hallazgo de que esta pequeña molécula, de difusión libre, participaba en vías de transducción de señales específicas, representó un nuevo e importante paradigma. Este nuevo rol del $\cdot\text{NO}$ y otras especies reactivas del nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés, Reactive Nitrogen Species) se extendió luego a las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species), ganando gran aceptación [33]. Hoy día se sabe que las especies oxidantes poseen roles cruciales en el mantenimiento de la homeostasis y en eventos de señalización que pueden limitar el daño. De hecho, el resultado depende de varios factores. Por un lado, depende de la naturaleza, reactividad y concentración de la especie oxidante y de la molécula blanco. Además son determinantes los fenómenos de difusión y la localización celular del oxidante, y por último pero no menos importante, la presencia de moléculas encargadas de la defensa antioxidante. Se conoce como “señalización redox”, a las respuestas biológicas impulsadas por cambios en los niveles de especies oxidantes, y como estrés oxidativo a la alteración de dicha señalización, producida por el desbalance entre los oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros [38–40].

Las especies reactivas a las que estamos haciendo referencia, son generadas por sistemas enzimáticos como NADPH oxidasas, xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa, y también por medio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial como consecuencia directa del metabolismo aeróbico, entre otras [39,41]. Los términos ROS y RNS incluyen tanto especies radicalares como no radicalares. Algunos ROS son el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), los radicales peróxido ($\text{ROO}\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl). Las RNS son aquellas que derivan del óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), como el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), el dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). También está incluido

el radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) que se forma mayoritariamente como producto de la reacción entre el peroxinitrito y el dióxido de carbono (CO_2) [38].

2.2.3 Oxidación de tioles biológicos

Los oxidantes pueden reaccionar con distintos blancos biológicos, como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Estas últimas constituyen el blanco de ataque más importante ya que son las macromoléculas más abundantes en los organismos vivos y exhiben las velocidades de reacción más elevadas [41]. En particular la cisteína, debido a sus características químicas, es muy susceptible al ataque.

Los tioles pueden sufrir distintos procesos de oxidación, generando a su vez distintos productos. Por ejemplo, pueden reaccionar con disulfuros (RSSR') mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro reversibles (Figura 2.2, vía a). También pueden reaccionar con oxidantes de dos electrones como hidroperóxidos (POOH) y formar ácido sulfénico (Figura 2.2, vía b). Los ácidos sulfénicos son por lo general inestables y se generan como intermediarios en los procesos de oxidación. Una vez formados, pueden sobreoxidarse a ácido sulfínico (RSO_2H) y sulfónico (RSO_3H), en procesos típicamente irreversibles. El ácido sulfénico también puede reaccionar con un tiol para dar un disulfuro, con otro ácido sulfénico para dar un tiosulfinato ($\text{RS(O)SR}'$), o con una amina o amida para dar una sulfenamida (RSNHR'). Estas reacciones que puede sufrir el ácido sulfénico se retomarán con mayor profundidad más adelante. Por otro lado, los tioles pueden sufrir oxidaciones de un electrón al reaccionar con radicales libres, formando un radical tílo (RS^{\cdot}), una especie altamente reactiva (Figura 2.2, vía c). Los radicales tílo pueden reaccionar consigo mismos o con tioles, para formar disulfuros o radical anión disulfuro ($\text{RSSR}'^{\cdot-}$), respectivamente. Finalmente, por reacción de un radical tílo con oxígeno se genera radical tioperoxilo (RSOO^{\cdot}) que a su vez puede dar origen a ácido sulfínico y sulfónico [12,42,43].

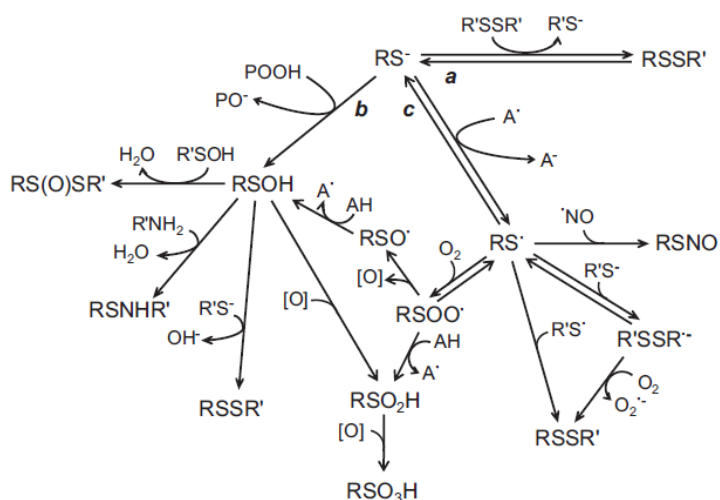


Figura 2.2. Vías de oxidación del tiol por mecanismos de uno y dos electrones. Tomado de [12].

2.3 Tiol de la HSA

2.3.1 Heterogeneidad

Como ya se comentó, la HSA posee 35 residuos de cisteína de los cuales solo una permanece libre (Cys34). La HSA en plasma es heterogénea respecto al estado de oxidación de la Cys34, pudiéndose encontrar como una mezcla de mercaptalbúmina con el tiol en estado reducido (HSA-SH) y no mercaptalbúmina con el tiol modificado. En adultos sanos, la fracción mercaptalbúmina comprende el ~75 % del total de la HSA circulante. Por otro lado, la fracción no mercaptalbúmina consiste principalmente en HSA que se encuentra formando disulfuros mixtos (HSA-SSR) con tioles de bajo peso molecular, la mayoría con cisteína, y en menor medida con cisteinilglicina, homocisteína y glutatión. Entre el 1-2 % del total de la HSA circulante posee su tiol oxidado a ácido sulfínico (HSA-SO₂H) y sulfónico (HSA-SO₃H). Otra forma en la que se puede encontrar el tiol de Cys34 es como S-nitrosoalbúmina (HSA-SNO), una forma que ha sido detectada en concentraciones <0.2 μM y que puede funcionar como reservorio de óxido nítrico. El tiol también puede encontrarse formando aductos carbonilados generados a partir de la reacción con aldehídos α,β-insaturados por medio de una adición de Michael [12].

Se ha observado en estudios que involucran espectrometría de masa o cromatografía, que en ciertas condiciones existe un aumento de las formas oxidadas de la HSA y una disminución de la reducida, como consecuencia directa del estrés oxidativo. Algunas de estas condiciones incluyen la existencia de alteraciones renales y hepáticas, diabetes mellitus, envejecimiento, hemodiálisis y ejercicio intenso (Tabla 2.1). Al ser el tiol más abundante del plasma y uno de los principales blancos de modificaciones oxidativas, se cree que el estado redox de la HSA puede ser un potencial biomarcador del estrés oxidativo [44,45].

Esta heterogeneidad respecto al estado de oxidación de la Cys34 también existe en HSA comerciales. En un trabajo reciente de nuestro grupo se comparó el estado redox de tres HSA comerciales sin ningún tratamiento previo, mediante cromatoenfoque y espectrometría de masa de las fracciones eluídas. Se observaron importantes diferencias entre las distintas fuentes de HSA en el porcentaje de HSA oxidada de manera irreversible conformada principalmente por HSA-SO₂⁻ [46].

Tabla 2.1. HSA oxidada en condiciones patológicas y de estrés oxidativo elevado. Adaptado de [28].

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

2.3.2 Reactividad

La reactividad de la Cys34 se encuentra finamente controlada por el entorno proteico. Según estudios cristalográficos, la Cys34 se localiza en la superficie del dominio I con el átomo de azufre hacia el interior, de manera que el tiol queda en una hendidura en la estructura terciaria de la misma, a una profundidad de ~ 9.5 Å [2]. Cerca del átomo de azufre podemos encontrar tres grupos ionizables: el carboxilato del Asp38, el imidazol de la His39 y el hidroxilo de la Tyr84 (Figura 2.3). Se postula que este particular entorno es el responsable de las propiedades inusuales de la Cys34. Por ejemplo se ha visto que el oxígeno del hidroxilo de la Tyr84 establece un enlace de hidrógeno con el azufre de la Cys34, que parece estabilizar el tiolato y disminuir el pK_a del mismo. De esta manera, eventos de oxidación de la cisteína impactan directamente en la conformación y en la dinámica del dominio I, y en la interfase de éste y el dominio II, conduciendo en ciertos casos a la pérdida del enlace de hidrógeno. La Tyr84 también está involucrada en el control de la accesibilidad a la Cys34 gracias a que se posiciona en un loop flexible que restringe el acceso. Así, efectos alostéricos en dicha tirosina causados por la unión de ligandos en distintas partes de la molécula, o modificaciones postraduccionales, pueden alterar la reactividad de la Cys34 *in vivo* [47].

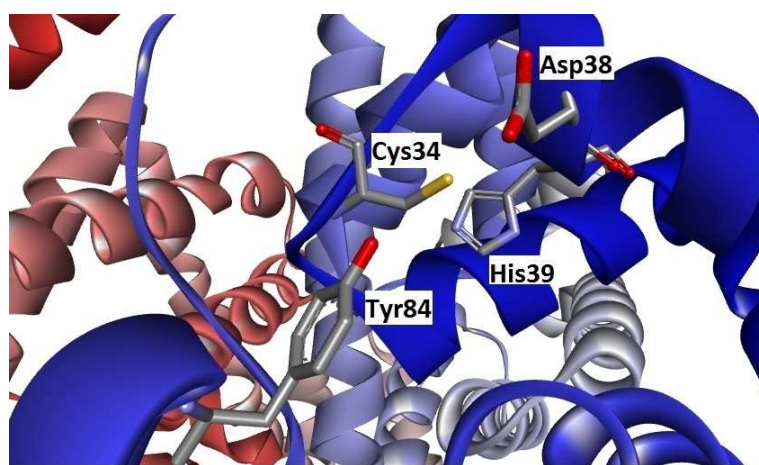


Figura 2.3. Entorno aminoacídico de la Cys34. Se destacan Asp38, His39 y Tyr84. La estructura se generó utilizando el Discovery Studio Visualizer 4.0 (PDB ID: 4EMX).

En cuanto a la constante de acidez (pK_a) del tiol de la HSA, existen reportes que indican que es de ~ 7 e incluso menor a 5 [12]. Según distintos trabajos de nuestro grupo, el pK_a para la HSA libre de ligandos es de ~ 8 [4,48], un poco menor que el de una cisteína en un péptido típico ($pK_a = 9.1$) [49]. Estas diferencias en las determinaciones pueden atribuirse principalmente a tres factores. Primero, es posible que el tiol exista en múltiples conformaciones, que dotan a dicho grupo de

reactividades diferentes. Segundo, la HSA también sufre cambios conformacionales de acuerdo al pH, que afectan también la reactividad del tiol [1]. Finalmente, la unión de ligandos también modula el pK_a , por lo que los resultados pueden variar según la fuente de HSA utilizada en el experimento [4].

Si comparamos la reactividad independiente del pH (correspondiente al 100 % del tiol en forma de tiolato, RS^-) del tiol de la HSA contra los tioles de bajo peso molecular, se puede observar que la reactividad del primero es menor. Con peróxido de hidrógeno por ejemplo, la constante independiente del pH es $\sim 5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la HSA [4], mientras que para tioles de bajo peso molecular con pK_a comparables, ronda los $18\text{-}26 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [50]. La diferencia es de hasta tres órdenes de magnitud a favor de dichos tioles cuando comparamos la reactividad con moléculas un poco más grandes, como el 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB). En este caso, su reactividad se ve aún más restringida, como consecuencia directa del posicionamiento del grupo tiol de la Cys34 en una hendidura de la estructura tridimensional de la proteína. Se genera de esta manera un cierto impedimento estérico que sumado a la limitada exposición al solvente del tiol, dificultan el correcto alineamiento geométrico entre las especies que van a reaccionar [12].

Trabajos previos de nuestro grupo mostraron que la reactividad de HSA-SH varía dependiendo de si la proteína presenta o no ácidos grasos unidos. Por un lado se evaluó la reactividad con DTNB en presencia de distintos ácidos grasos (ácido láurico 12:0, mirístico 14:0, palmítico 16:0, esteárico 18:0 y oleico 18:1 $\Delta 9$) en proporción 5:1 a 25 °C y pH 7.4. En ausencia de los mismos, la constante de reacción fue de $14.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C y pH 7.4), mientras que en presencia de estos se observó un incremento de ~ 6 veces, con constantes en el rango de $92\text{-}117 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ según el ácido graso. Por otro lado se evaluó la reactividad con peróxido de hidrógeno, de HSA deslipidada y lipidada con ácido esteárico en proporción 5:1. Las constantes obtenidas fueron de 1.4 y $2.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4) para la muestra deslipidada y lipidada respectivamente, lo que indica que cuando la HSA se encuentra complejada a ácidos grasos, la constante de oxidación se duplica. Se evidenció además una disminución del pK_a de 0.5 unidades cuando la HSA presentaba ácidos grasos unidos, lo que implica que la proporción de tiolato a pH 7.4 aumenta en comparación a la HSA deslipidada. Esta variación en el pK_a puede explicarse por cambios conformacionales que se producen cuando la proteína se encuentra complejada a ácidos grasos, y que hacen que el tiol quede más expuesto al solvente y se modifique el microambiente electrostático. Más precisamente, el área accesible al solvente del átomo de azufre, calculada a partir de datos cristalográficos, es de 0.7 \AA^2 para HSA deslipidada y 6.4 \AA^2 para HSA complejada a ácido palmítico 16:0. Resumiendo, el aumento observado en la reactividad de HSA-SH en presencia de lípidos puede explicarse por un lado, por el cambio conformacional generado a partir de la unión de los ácidos grasos que tiene como consecuencias, un aumento en la exposición al solvente del grupo tiol y un menor impedimento estérico que permite el

mejor alineamiento geométrico de las especies que van a reaccionar. Además, la mayor exposición al solvente determina la disminución del pK_a y como consecuencia una mayor disponibilidad de tiolato pronto para reaccionar [4].

2.3.3 Rol en el contexto intravascular

Como se comentó previamente, el plasma es un compartimiento relativamente pobre en lo que respecta a defensas antioxidantes. Algunos de los antioxidantes de bajo peso molecular que se pueden encontrar incluyen, tioles en su forma reducida (12-20 μM), ácido ascórbico (30-150 μM), bilirrubina (5-20 μM) y ácido úrico (160-450 μM). A su vez, la concentración de tioles totales reducidos se encuentra entre 0.4-0.6 mM, muy diferente de los 50 mM que se encuentran en el espacio intracelular. Dado que los tioles en plasma se encuentran más oxidados y en menor concentración que en el interior celular, las relaciones tiol/disulfuro también disminuyen. De esta manera, a diferencia de la situación intracelular donde dicha relación es alta, en plasma son menores a 0.1 en el caso de la cisteína, cisteinilglicina y homocisteína, y apenas ~ 2 y ~ 3 para el glutatión y la HSA [12].

El plasma presenta además una importante variedad de proteínas que incluyen a la HSA, inmunoglobulinas, apolipoproteínas, inhibidores de proteasas, componentes del complemento, y factores de coagulación, entre otras. Sin embargo, solo dos de las 150 proteínas más abundantes tienen capacidad antioxidante. Estas son la HSA que comprende el 80 % de los tioles plasmáticos, y la glutatión peroxidasa 3 (Gpx3) que puede encontrarse en individuos sanos a concentraciones de 0.5-0.8 μM [12]. Esta enzima se encarga de reducir hidroperóxidos a expensas de glutatión como sustrato reductor.

A diferencia del plasma, el eritrocito es muy rico en defensas antioxidantes y es capaz de participar ampliamente en el atrapamiento de especies reactivas. Algunos de los antioxidantes no enzimáticos que posee son el ácido ascórbico, la vitamina E y el glutatión. Además posee enzimas como CuZn superóxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y el sistema peroxirredoxina/tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. La peroxirredoxina más abundante del eritrocito es la Prx2, que alcanza concentraciones de 240 μM y cuyas constantes de reacción con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito son 1.0×10^8 y $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente [51]. Una molécula oxidante que difunda en forma típica ($10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) alcanzará el eritrocito en pocos milisegundos, si consideramos que la distancia promedio entre los eritrocitos es de $\sim 3 \mu\text{m}$. Por lo tanto, los antioxidantes presentes dentro del eritrocito serán el principal blanco de aquellos oxidantes que puedan atravesar la membrana del eritrocito.

En el caso del peróxido de hidrógeno, que reacciona con HSA-SH con una constante de $2.3 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7.4), probablemente alcance el eritrocito y sea

consumido por Prx2 antes de encontrarse con una molécula de HSA y reaccionar con ella. Otro posible competidor podría ser Gpx3, cuya constante con peróxido de hidrógeno es $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, la baja concentración de glutatión pone en duda esta posibilidad [12]. Cuando el oxidante es el peroxinitrito la situación cambia. En condiciones fisiológicas y por lo tanto en presencia de CO_2 , el peroxinitrito forma rápidamente dióxido de nitrógeno (NO_2) y radical carbonato $\text{CO}_3^{\cdot-}$, una especie más reactiva y cuya capacidad de difusión es menor, por lo que la HSA del plasma será un blanco importante [45]. Cuando se trata de oxidantes cargados o muy reactivos, u oxidantes secundarios generados a nivel de macromoléculas como lípidos o proteínas, es de esperar que la HSA del plasma constituya uno de los blancos principales. Todo esto muestra como la oxidación de HSA-SH dependerá de las constantes de reacción y de la concentración de HSA-SH, así como también de los potenciales competidores, y de aspectos de difusión y compartimentalización [12].

2.4 Ácido sulfénico en proteínas

2.4.1 Generalidades

Mientras estudios sobre la oxidación de tioles en compuestos pequeños inferían la formación de ácido sulfénico (RSOH), surgió la interrogante de si los mismos principios serían válidos en el contexto más complejo de los tioles proteicos. El primer indicio surgió en 1955 a raíz del trabajo de Fraenkel-Conrat, en el cual se observó la formación de un intermediario sulfenilo de yoduro (mismo estado de oxidación que RSOH) en una proteína del virus del mosaico de tabaco. Se propuso entonces la hipótesis de que el ácido sulfénico podía formarse por un mecanismo de oxidación de dos electrones, como intermediario en la formación de disulfuros en proteínas [52]. Desde entonces y hasta la actualidad, la formación de ácido sulfénico ha sido detectada en una creciente lista de proteínas, cumpliendo distintos roles.

La formación de ácido sulfénico en proteínas puede darse por distintas vías. La más reconocida es aquella en la que se genera como producto directo de la reacción de un tiolato (RS^-) con peróxido de hidrógeno. Se trata de una oxidación por dos electrones, que según el mecanismo propuesto involucra el ataque nucleofílico del azufre sobre uno de los oxígenos del peróxido de hidrógeno, resultando en la generación de ácido sulfénico y anión hidroxilo (OH^-) los cuales sufren una transferencia de protón para culminar en sulfenato (RSO^-) y agua [53] (Figura 2.4, vía a). Se destaca también la formación de sulfénico a partir de la reacción de tiolato con alquil hidroperóxidos (Figura 2.4, vía b), ácido peroxinitroso/peroxinitrito (Figura 2.4, vías c y d) y ácidos hipohalosos (Figura 2.4, vías h y e. X: Cl, Br, I, SCN). En este último se forma un haluro de sulfenilo a partir de la reacción con el tiolato (Figura 2.4, vía h), que luego se hidroliza produciendo ácido sulfénico (Figura 2.4, vía e). De manera similar, el ácido sulfénico puede formarse por reacción de un tiolato con una cloramina (Figura 2.4, vías i y e). Otras vías menos comunes son la hidrólisis de disulfuros (Figura 2.4, vía

g) donde se genera además de un sulfénico, un tiol, y la hidrólisis de S-nitrosotioles (Figura 2.4, vía f). La reacción de un tiol o tiolato con un tiosulfinato conduce a la formación de un nuevo disulfuro y un sulfénico. Finalmente, el sulfénico puede formarse a partir de la formación de un radical tiolo el cual puede reaccionar con oxígeno y en una reacción en cadena dar lugar a un ácido sulfénico (vías de un electrón, Figura 2.2) [54–56].

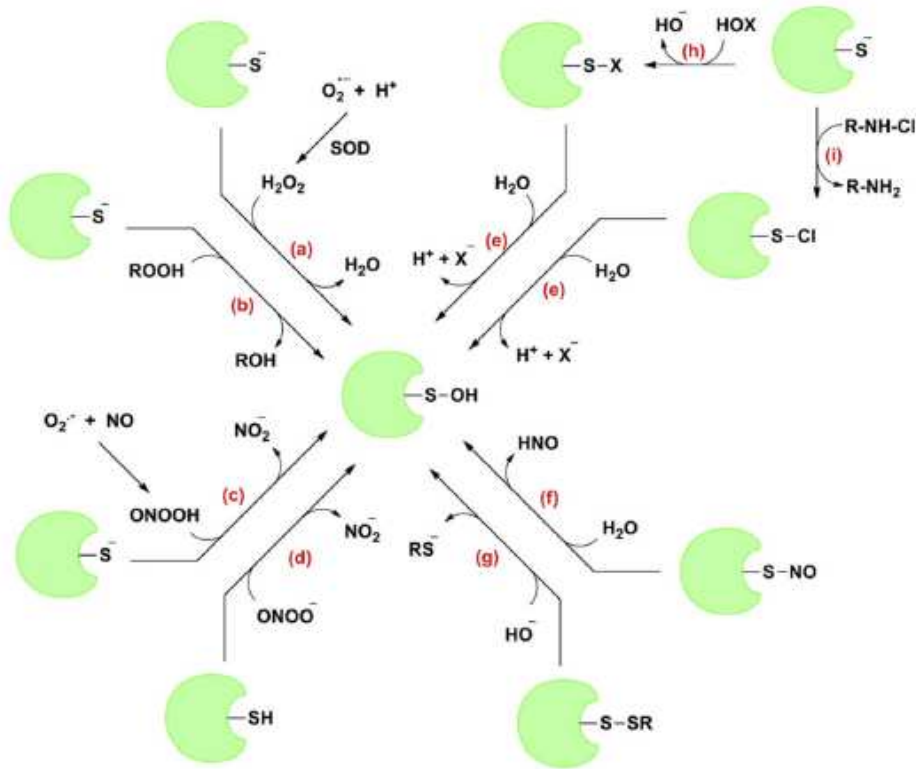


Figura 2.4. Mecanismos de formación de sulfénico por oxidación por dos electrones. Tomado de [30].

Una característica muy importante del ácido sulfénico es que puede actuar como electrófilo y como nucleófilo. Este carácter dual permite que una vez formado el sulfénico metaestable, pueda ser transformado en otras especies de mayor estabilidad, por distintas reacciones. Por ejemplo, mediante condensación con el tripéptido glutatión (GSH) se forma un disulfuro mixto proteína-SSG (S-glutationilación). Esto ha sido propuesto como un mecanismo de protección del tiol contra la sobreoxidación, pudiendo ser rápidamente revertido para dar nuevamente el tiol en su forma reducida, gracias a la acción de tiorredoxinas, glutarredoxinas y glutatión [31]. Si la condensación se da con un tiol proteico se produce la formación de un disulfuro intra o intermolecular, dependiendo de si el tiol pertenece a la misma molécula o a otra. Se pueden formar también sulfenamidas (RSN(H)R') como producto de la condensación del sulfénico con una amina (RNH2) o amida (RCONH2) [57,58]. Por

otro lado, la reacción de dos sulfénicos lleva a la producción de tiosulfatos (Figura 2.2) [59].

La sobreoxidación a ácido sulfínico y sulfónico (Figura 2.2) puede ocurrir si el sulfénico se encuentra con altas concentraciones de oxidante, un proceso que se considera irreversible en la célula. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que la reducción del sulfínico de algunas peroxirredoxinas humanas puede ocurrir *in vivo*. Más precisamente, se ha identificado una enzima sulfirredoxina, que cataliza la reducción del ácido sulfínico de una 2-CysPrx a expensas de ATP y un reductor[60].

La reactividad del ácido sulfénico varía según la proteína de acuerdo a varios factores. Análisis estructurales han puesto en evidencia que ciertas características del microambiente proteico promueven la reactividad de la cisteína con oxidantes y/o potencian la estabilidad del sulfénico de las proteínas. El mayor determinante de la estabilidad del sulfénico es la ausencia de tioles en las proximidades con los que pueda reaccionar. La formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, la limitada accesibilidad al solvente y a otros tioles, y la asociación con elementos apolares presentes en la estructura proteica también contribuyen a aumentar la estabilidad del ácido sulfénico [59,61].

2.4.2 Roles en proteínas

En diversas proteínas, la formación de ácido sulfénico como consecuencia de la oxidación de una cisteína durante el ciclo catalítico le confiere propiedades antioxidantes. Este es el caso de las peroxirredoxinas (Prxs), enzimas que están altamente expresadas en los organismos de todos los reinos y que en eucariotas superiores constituyen las enzimas antioxidantes más abundantes del citosol. Las Prxs se encargan de detoxificar peróxido de hidrógeno, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos, dependiendo del tipo de Prxs [31]. Las glutatión peroxidasa (Gpxs), enzimas antioxidantes relacionadas a las Prxs en cuanto a su función y estructura, también se encargan de la detoxificación de hidroperóxidos. En la gran mayoría de los invertebrados, las Gpxs poseen cisteína en su sitio activo, mientras que en mamíferos contienen selenocisteína. En este caso, se produce la oxidación del selenol por acción del hidroperóxido y se forma un selenenato (Cys-SeO⁻). La reducción del hidroperóxido es catalizada a expensas de GSH [31].

Además de participar como intermediario en el ciclo catalítico de enzimas antioxidantes, el sulfénico también está involucrado en sensar señales y gatillar la respuesta celular al estrés oxidativo. Unas de las primeras enzimas relevantes desde el punto de vista de la señalización, en donde se mostró que la actividad enzimática se inhibía por la formación de un ácido sulfénico en un residuo de cisteína crítico del sitio activo, fueron las fosfatasa de tirosina (PTPs) [62]. Estas enzimas se encargan de catalizar la hidrólisis de fosfotirosinas de proteínas transductoras de señales que

juegan un rol central en el metabolismo de la célula, en el crecimiento, proliferación y diferenciación, así como también en la respuesta inmune, entre otras [63]. Sin embargo, en lo que respecta al peróxido de hidrógeno como oxidante, la oxidación de dicha cisteína deberá ocurrir indirectamente, a partir de la oxidación de otras cisteínas, ya que la constante de reacción de las PTPs con peróxido de hidrógeno es varios órdenes de magnitud menor que para las peroxirredoxinas y glutatión peroxidasa, por lo que no podrían competir [64].

Algunos factores de transcripción también son sensibles a peróxidos. Este es el caso de OhrR, un factor de transcripción de *Bacillus subtilis*, que normalmente se encuentra en la célula en su estado totalmente reducido. En este estado, OhrR se une al ADN y actúa reprimiendo la expresión de OhrA, una peroxidasa dependiente de cisteína. OhrR posee una cisteína crítica, altamente conservada, que en condiciones de estrés oxidativo reacciona rápidamente con hidroperóxidos orgánicos conduciendo a la formación de un ácido sulfénico. Este puede reaccionar rápidamente con tioles de bajo peso molecular para formar disulfuros mixtos o alternativamente formar una sulfenamida. Estas modificaciones hacen que OhrR se inactive y se disocie del ADN. Así, la formación del intermediario sulfénico en condiciones de estrés oxidativo, conduce a la desrepresión de la transcripción del gen [65].

Un trabajo reciente del grupo de Carroll, K. muestra que el sulfénico también está involucrado en la regulación redox de la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), donde la oxidación de una cisteína altamente conservada del sitio activo lleva a un aumento de la actividad quinasa [66]. Una vez activado, EGFR retransmite la señal a través de distintas cascadas de señalización intracelular [67]. Otros ejemplos en los que la formación reversible de ácido sulfénico en una cisteína crítica enciende o apaga la actividad enzimática de factores de transcripción son OxyR de *Escherichia coli* [68] y Orp1-Yap1 de levadura [69].

Finalmente, el sulfénico participa en el plegamiento no-enzimático de proteínas *in vitro* en el que se genera como intermediario de la formación de disulfuros [70]. Un claro ejemplo es el de la RNasa A, una proteína que en su estado nativo posee cuatro disulfuros, y cuyo plegamiento *in vitro* es inhibido en presencia de arsenito (agente reductor para Cys-SOH) [71].

2.4.3 Detección

El descubrimiento de los roles que juega el ácido sulfénico en las vías de señalización celular y como defensa antioxidante, sumado a la creciente evidencia sobre las consecuencias patológicas del estrés oxidativo llevaron a que surgiera gran interés por detectar la formación de dicha especie en proteínas. Sin embargo, la inestabilidad del ácido sulfénico, la ausencia de propiedades espectrales características

en el UV-visible y el pequeño tamaño de esta modificación postraduccional, hacen de su detección un gran desafío [30].

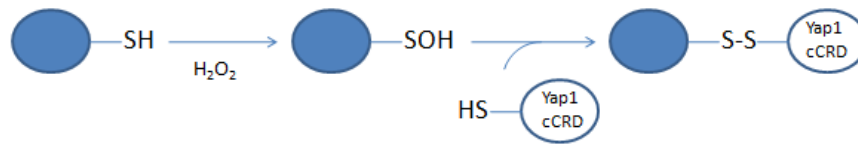
Detección por métodos espectroscópicos

Técnicas como la cristalografía de rayos X, NMR y espectrometría de masa han permitido estudiar la estructura y el microambiente local de sulfénicos proteicos. Por ejemplo, se utilizó cristalografía de rayos X para caracterizar la Cys42 del centro redox de la flavoproteína NADH peroxidasa, constatando la formación de ácido sulfénico a partir de dicho tiol [72]. Esto también se comprobó por NMR [73]. Más recientemente, se resolvieron por cristalografía las estructuras de las formas reducida, oxidada a ácido sulfénico y disulfuro mixto de SarZ, un regulador de la transcripción de *Staphylococcus aureus* que posee un residuo de cisteína capaz de sensar los niveles de peróxido [74]. Por otro lado, la formación de sulfénico puede ser detectada por espectrometría de masa como un cambio en el m/z equivalente a la adición de un átomo de oxígeno (+16 Da). Esto se logró por ejemplo en la metionina sulfóxido reductasa (MsrA) de *E. coli* que cataliza la reducción de metionina sulfóxido a través de un mecanismo que incluye la formación de un intermediario ácido sulfénico en una cisteína crítica para la catálisis [75]. En nuestro grupo se evidenció la formación de HSA-SOH mediante espectrometría de masa de proteína entera, al estudiar la reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno [28]. Otros ejemplos de detección por espectrometría de masa son el factor de transcripción OhrR [65] y la aldosa reductasa en condiciones de isquemia cardíaca [76]. Sin embargo la detección de ácido sulfénico en proteínas mediante métodos espectroscópicos presenta dos limitantes fundamentales. Una de ellas es que se limita al análisis *in vitro* de proteínas aisladas. La segunda es que el sulfénico debe ser estable [30].

Métodos basados en una sonda codificada genéticamente

En 2007 se reportó una sonda producto de la ingeniería genética (Yap1-cCRD) capaz de atrapar a proteínas que formen ácido sulfénico *in vivo*. Dicha sonda se creó a partir del factor de transcripción de *S. cerevisiae* Yap1, el cual reacciona con el ácido sulfénico formado en la proteína receptora de oxidantes Orp1, inhibiendo así el transporte de Yap1 al núcleo. La sonda, Yap1-cCRD, consiste en 85 aminoácidos del dominio C-terminal rico en cisteínas de Yap1, al cual se le mutaron dos de los tres residuos de cisteína nativos (C620A y C629T). De esta manera queda una sola cisteína (C598) capaz de reaccionar con el ácido sulfénico y formar un disulfuro mixto (Figura 2.5). La sonda además posee una cola de histidina que permite enriquecer la muestra en las proteínas marcadas, para su posterior análisis [77]. Fue así como estos investigadores lograron identificar ~30 proteínas que podrían tener una cisteína que se oxidara a ácido sulfénico, en *E. coli* [77] y *S. cerevisiae* [78]. Las desventajas de esta sonda son su eficiencia relativamente baja y el alto riesgo de falsos positivos [79].

A



B

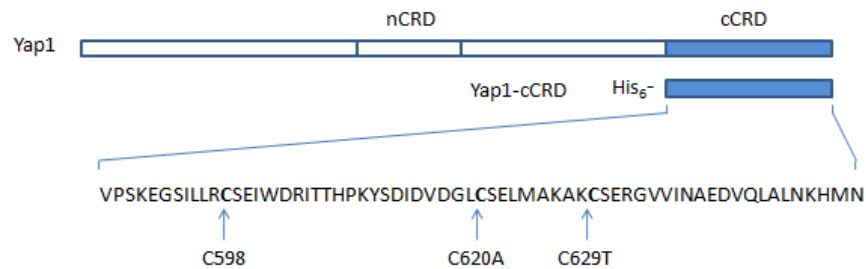


Figura 2.5. Detección de ácidos sulfénicos proteicos con la sonda Yap1-cCRD. A) Formación de ácido sulfénico a partir de la oxidación del tior por H_2O_2 y posterior reacción del sulfénico con el grupo tior de Yap1-cCRD para formar un disulfuro mixto. B) Se destaca el dominio C-terminal rico en cisteínas (cCRD) de Yap1 a partir del cual se construyó la sonda Yap1-cCRD, con dos de las tres cisteínas mutadas. Adaptado de [77].

Métodos de detección basados en reactividad química

Inspirados tanto en el carácter electrofílico como en el nucleofílico débil del átomo de azufre del ácido sulfénico, se han desarrollado una gran variedad de sondas químicas que revolucionaron el área de la detección de dicha especie. Un método importante que se utiliza para detectar y cuantificar sulfénico se basa en la facilidad que tienen estos de reaccionar con tioles para formar disulfuros. En este sentido se utiliza por ejemplo el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), una molécula pequeña de color amarillo que presenta un máximo de absorbancia característico a 412 nm. El TNB contiene un grupo tior que reacciona estequiométricamente con el ácido sulfénico (Figura 2.6). La pérdida de absorbancia a 412 nm del TNB luego de la mezcla de una muestra que contenga ácido sulfénico puede utilizarse para la cuantificación del mismo, siempre y cuando la solución de TNB no posea DTNB o DTT contaminantes [70,80–82]. De esta manera Poole, L. y colaboradores demostraron que se forma ácido sulfénico en el centro redox de la NADH peroxidasa de estreptococo [80]. Algunos años más tarde y con una estrategia similar, demostraron que en la AhpC se forma sulfénico durante la reducción de peróxido de hidrógeno [81,83]. Comentaremos el caso de la albúmina sérica humana más adelante.

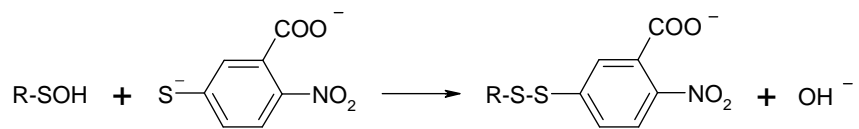


Figura 2.6. Reacción entre R-SOH y TNB para formar el disulfuro mixto R-S-S-TNB.

La reacción del ácido sulfénico con el reactivo electrofílico 7-cloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) es simple pero poco específica ya que NBD-Cl reacciona también con grupos nucleofílicos como tioles, aminas y fenoles. En todos los casos, los productos tienen características espectrales distintivas (Figura 2.7) [84]. El producto de la reacción entre NBD-Cl y el sulfénico es un sulfóxido, R-S(O)-NBD, con un máximo de absorción a ~350 nm, mientras que para el tioéter que se forma como resultado de la reacción con el tiol, es ~420 nm (Figura 2.7) [85]. Sin embargo, más allá de que el máximo de absorción del sulfóxido es característico, existen algunas excepciones, por lo que la mejor manera de lograr la detección con este reactivo es mediante espectrometría de masa. Fue así como Poole, L. y colaboradores observaron el sulfénico que se forma durante el ciclo catalítico de la AhpC y NADH peroxidasa [86]. Muchas otras proteínas han sido estudiadas de esta manera, entre ellas la PTP [62], OhrR de *B. subtilis* [65], y Orp1 [69]. La ventaja es que los productos de la reacción son reducibles por DTT, por lo que se puede recuperar la proteína en su forma reducida [86].

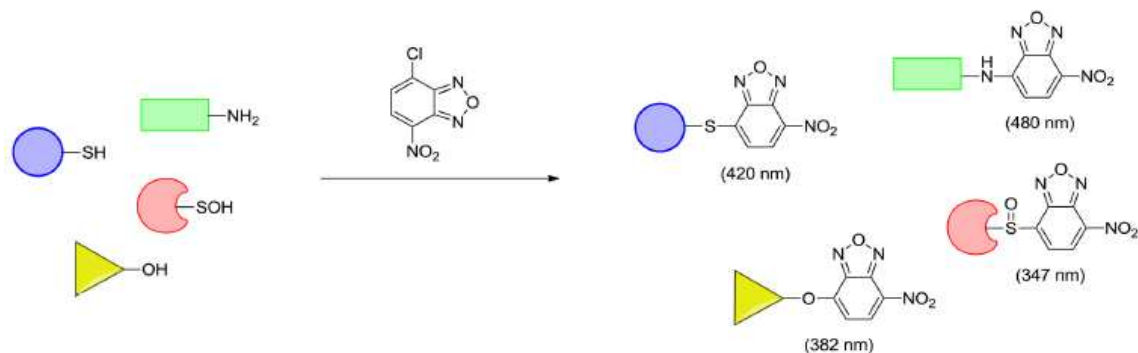


Figura 2.7. Reacción de NBD-Cl con nucleófilos en proteínas. Se muestran los distintos productos con sus correspondientes máximos de absorción. Tomado de [30].

Otra manera de detectar al ácido sulfénico es utilizando arsenito de sodio, un reductor capaz de reducir al sulfénico volviendo a la forma tiol. Por lo tanto, determinando los tioles antes y después del tratamiento con arsenito de sodio se puede hallar la concentración de ácido sulfénico [87]. Esta técnica también se ha utilizado en muestras complejas. En ese caso luego del tratamiento con peróxido de hidrógeno se incubaba con N-etilmaleimida (NEM) para bloquear los tioles reducidos. En el siguiente paso se hace la reducción de los sulfénicos formados con arsenito y luego se bloquean los nuevos tioles con N-etilmaleimida-biotina, permitiendo la detección por western blot con anticuerpos específicos [88].

Sin duda una de las moléculas precursoras del arsenal de sondas que se utilizan hoy día para la detección, es la dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexadiona). Se trata de un compuesto nucleofílico que reacciona con el ácido sulfénico, actuando este como electrófilo, para dar un tioéter estable, irreversible frente a reductores como DTT o TCEP (Figura 2.8) [79]. La reacción de condensación que se da entre la dimedona y el sulfénico fue reportada en 1974 por el grupo de Allison, W. Estos investigadores lograron seguir la incorporación de dimedona marcada con ^{14}C en la Cys149 del sitio activo de la GAPDH oxidada, mientras que en la enzima reducida no se evidenció dicho fenómeno [89]. Desde entonces, otros han sido capaces de detectar sulfénicos modificados con dimedona por espectrometría de masa [76,90–92]. Sin embargo el uso de dimedona está limitado debido a la ausencia de características espectrales o de afinidad que permitan una fácil detección. Esta situación mejoró en el 2009 con el desarrollo de anticuerpos que reconocen con alta afinidad y especificidad a los complejos proteína-S-dimedona y que permitieron la detección de los mismos por Western blot e inmunofluorescencia. Esta aproximación ha sido utilizada para estudiar el estado redox de los tioles en líneas celulares de cáncer de mama [93], entre otros.

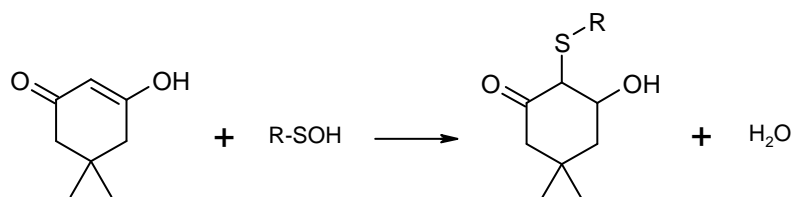


Figura 2.8. Reacción de dimedona con R-SOH, con formación de un tioéter.

Recientemente se han desarrollado conjugados de dimedona-biotina/fluoróforo que permiten la detección mediante técnicas como Western blot y fluorescencia, y que también permiten enriquecer en las proteínas marcadas [94–96]. En el caso particular de las sondas derivatizadas con biotina, el enriquecimiento se puede realizar con resinas de estreptavidina que se une a la biotina con gran afinidad. Los primeros dos análogos de dimedona funcionalizados se reportaron en el 2005. Ambos consisten en una 1,3-ciclohexadiona unida a un conector y luego a un fluoróforo, ácido isatoico (DCP-MAB) o 7-metoxicumarina (DCP-MCC) (Figura 2.9). Se observó además que ambas sondas reaccionan específicamente con ácido sulfénico y no lo hacen con tioles proteicos, disulfuros, nitrosotioles, ácido sulfínico y sulfónico [94].

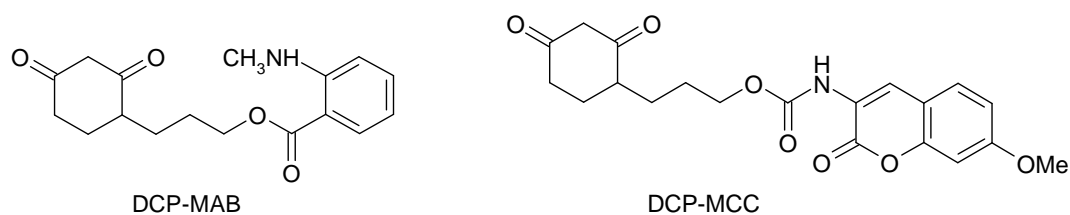


Figura 2.9. Estructuras de DCP-MAB y DCP-MCC.

Dos años después, el mismo grupo reportó siete nuevas sondas de ácido sulfénico basadas en el mismo núcleo de 1,3-ciclohexadiona. Estas sondas pueden dividirse en tres categorías: las que unido al conector tienen biotina (serie DCP-Bio), fluoresceína (serie DCP-FL) y rodamina (serie DCP-Rho) (Figura 2.10). La reactividad de estas sondas se puso a prueba con una variante de la AhpC mutada en la cisteína resolutive (C165S) y con papaína, verificando una reactividad y especificidad similar a la de la dimedona, DCP-MAB y DCP-MCC. El inconveniente de las sondas de las series DCP-FL y DCP-Rho, es que cuando reaccionan covalentemente con ácido sulfénico, la intensidad de emisión se ve parcialmente disminuida. Por ejemplo, para DCP-FL1 conjugada con la AhpC mutada en la cisteína resolutive (AhpC^{C165S}) y con papaína, la emisión disminuía un ~50% y ~75%, respectivamente. En el caso de las de la serie DCP-Rho, se suma el hecho de que se produce un corrimiento de los máximos de excitación/emisión a longitudes de onda mayores. Más allá de todo esto, el análisis tríptico por MS de los complejos sonda-proteína mostró la incorporación de la sonda selectivamente en la posición de la cisteína esperada [95].

En cuanto a las sondas funcionalizadas con biotina, la más estudiada es DCP-Bio1 (Figura 2.10). Se realizaron estudios cinéticos para medir la velocidad de incorporación de la sonda utilizando las proteínas papaína, metionina sulfóxido reductasa (fRMsr) y AhpC. A las dos últimas se les mutaron todas las cisteínas, menos la sensible a la oxidación por peróxido de hidrógeno con el fin de estabilizar al ácido sulfénico naciente. Las constantes de pseudoprimer orden determinadas fueron 1.65 min⁻¹ para la papaína, 0.13 min⁻¹ para fRMsr^{C84S,C94S}, y 0.003 min⁻¹ para la AhpC^{C165S}. Las diferencias de más de 500 veces entre las constantes sugieren que la reactividad de la sonda puede depender de la accesibilidad y/o reactividad del sulfénico. También se evaluó el efecto del pH en la eficiencia de marcado de DCP-Bio1 utilizando fRMsr. Según los resultados, la velocidad de marcado se mantiene entre pH 5.5 y 8.0, con una constante de segundo orden para la reacción de DCP-Bio1 con fRMsr de 0.12 mM⁻¹ min⁻¹. Pero las aplicaciones de esta sonda no se limitan al análisis *in vitro* de proteínas aisladas, sino que también puede ser utilizada en muestras complejas como lisados de células. Además, DCP-Bio1 es capaz de permear al interior celular, lo que permite detectar los ácidos sulfénicos proteicos en células intactas [97,98]. En suma, los potenciales usos de DCP-Bio1 como sonda específica de ácido sulfénico incluyen el estudio de la oxidación de cisteínas en proteínas particulares bajo determinadas

condiciones, el monitoreo de la oxidación de las cisteínas de todas las proteínas de la célula en respuesta a varios estímulos y la identificación de proteínas con residuos de cisteína sensibles a sufrir reacciones de óxido-reducción.

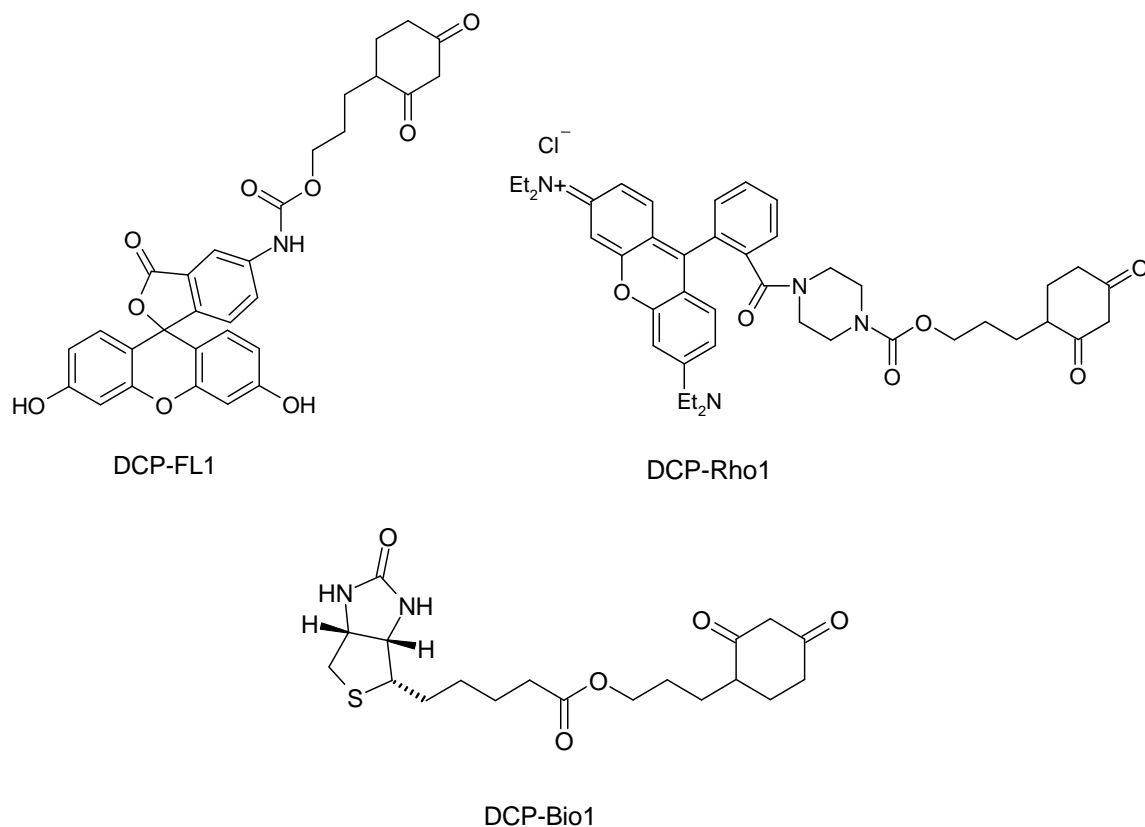


Figura 2.10. Análogos de dimedona funcionalizados con fluoresceína (serie DCP-FL), rodamina (serie DCP-Rho) y biotina (serie DCP-Bio). Se muestra uno representativo, de cada serie.

Otro tipo de sondas basadas en análogos de dimedona son las funcionalizadas con grupos azida (serie DAz) y alquino (serie DYn), muy utilizadas para ensayos en células intactas (Figura 2.11). El tamaño de estas sondas es menor que el de aquellas conjugadas directamente a biotina o a fluoróforos que comentamos más arriba, por lo que se espera una mejora en la permeabilidad celular. Además, disminuye el impedimento estérico que pueda interferir en la reacción con los ácidos sulfénicos proteicos. Por otro lado, estas sondas pueden conjugarse en pasos posteriores a biotina o a fluoróforos, mediante ligación de Staudinger o cicloadición de Huisgen, reacciones del tipo “click chemistry”, con el fin de lograr la detección, el enriquecimiento y la identificación de los sulfénicos proteicos involucrados [30]. Esta aproximación fue utilizada en células HeLa para identificar proteínas candidatas a sufrir la oxidación de cisteínas a ácidos sulfénicos. El método implica el marcado con DAz-2 en células vivas, el lisado de las mismas y la conjugación de biotina a la sonda, el

enriquecimiento en las proteínas marcadas y el análisis por Western blot. El resultado fue la identificación de 193 proteínas, de las cuales 14 ya se sabía que se modificaban a ácido sulfénico. Algunos de los roles de las proteínas identificadas incluyen transducción de señales, reparación del ADN, síntesis de proteínas, homeostasis redox y transporte nuclear, lo que sugiere que esta modificación oxidativa está involucrada en una amplia variedad de procesos a nivel celular [99]. Por otro lado, se han desarrollado conectores escindibles que permiten deshacerse de la biotina conjugada, facilitando el análisis a nivel proteómico [100,101] y permitiendo una mejor identificación de las cisteínas que se oxidan en las proteínas. Esto se vió reflejado en un trabajo reciente de Liebler, D. C., en el cual identificaron ~1000 sitios de formación de sulfénico en más de 700 proteínas [102].

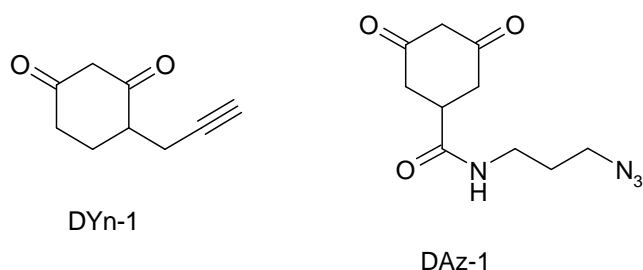


Figura 2.11. Análogos de dimedona funcionalizados con grupos azida (serie DAz) y alquino (serie DYN). Se muestra uno representativo de cada serie.

Finalmente, en el 2014 se reportó otra sonda de ácido sulfénico. Se trata de un biciclo[6.1.0]nonino conjugado a biotina (BCN-Bio1) (Figura 2.12) que parece reaccionar con el ácido sulfénico por un mecanismo de cicloadición concertado, diferente de la adición nucleofílica propuesta para las sondas de dimedona. El producto de la reacción es un alquenil sulfóxido estable. La reactividad de esta sonda se estudió en primer lugar en pequeñas moléculas de ácido sulfénico utilizadas como modelo, constatándose el atrapamiento específico y efectivo, a velocidades mayores que las de las sondas basadas en dimedona. Para el estudio de la reactividad con ácidos sulfénicos proteicos se recurrió nuevamente a la variante de la AhpC mutada en la cisteína resolutive. El monitoreo de la reacción de BCN-Bio1 con AhpC-SOH se hizo por espectrometría de masa ESI-TOF, evidenciándose un pico correspondiente a la formación del alquenil sulfóxido esperado. De la misma manera se estudió reactividad con AhpC-SH y con otras formas oxidadas de la proteína, entre ellas AhpC-SO₂H, AhpC-SNO y AhpC-S-S-Cys. En estos casos no se observaron aductos, lo cual es un indicativo de la selectividad de la sonda. La constante de segundo orden reportada por estos investigadores para la reacción de BCN-Bio1 con AhpC-SOH es $16.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [103], más de trescientas veces más grande que para la reacción de AhpC-SOH con DCP-Bio1 ($0.05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [97]. Se cree que la gran reactividad de esta sonda se debe a la estructura tensionada del anillo de ocho miembros. Otra ventaja de BCN-Bio1 es que se requiere una menor concentración de la misma para lograr la detección. Por ejemplo, se requieren entre 1-5 mM de sonda basada en dimedona para atrapar eficientemente

AhpC-SOH, mientras que en el caso de BCN-Bio1 se requieren $\sim 100 \mu\text{M}$. En cuanto a la permeabilidad celular y a la eficiencia de marcado *in vivo*, experimentos con BCN-Bio1 y DCP-Bio1 en iguales condiciones mostraron que la permeabilidad de ambas sondas es similar, pero que el marcado con BCN-Bio1 es mayor. La mayor velocidad de reacción de esta sonda también se constató en células en cultivo. En suma, todas estas características hacen a este cicloalquino una sonda muy prometedora para la detección de ácido sulfénico tanto en proteínas puras, como en lisados y células vivas [103].

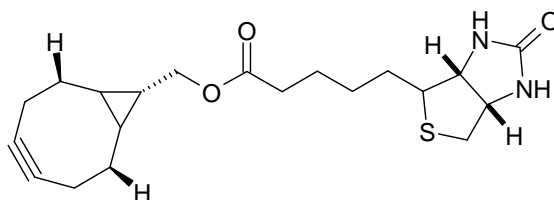


Figura 2.12. Estructura de la sonda derivada de cicloalquino, BCN-Bio1.

2.5 Ácido sulfénico en HSA

2.5.1 Formación de HSA-SOH

Una de las primeras evidencias de la formación de ácido sulfénico en HSA (HSA-SOH) se obtuvo cuando se demostró que el tior de la albúmina sérica bovina (BSA) se oxidaba luego de incubación con xantina oxidasa e hipoxantina. Los experimentos revelaron que por la estequiometría de la oxidación lo que se formaba era un ácido sulfénico y no un enlace disulfuro, que la modificación era reversible por arsenito y que la co-incubación con catalasa inhibía la oxidación del tior. Todo esto indicaba que el peróxido de hidrógeno generado indirectamente por el sistema xantina oxidasa/hipoxantina oxidaba el tior a ácido sulfénico. Además, con el paso del tiempo, la modificación se volvía irreversible indicando la sobreoxidación a ácido sulfínico y sulfónico [87,104]. Su formación también se propuso luego del tratamiento de HSA con óxido nítrico en condiciones anaerobias, cuando se observó que por cada 1 mol de SH consumido en la reacción, se formaba 1 mol de N_2O , diferente a la relación 2:1 esperada para la formación de un enlace disulfuro [105].

La confirmación de que el ácido sulfénico se forma en la HSA, más exactamente a nivel de la Cys34, surgió del análisis por espectrometría de masa de HSA oxidada con peróxido de hidrógeno y tratada con dimedona, seguido de tripsinización. En el caso de la muestra expuesta al oxidante se observó un péptido con un aumento de masa correspondiente a la reacción de la dimedona con HSA-SOH. En la muestra de HSA reducida, utilizada como control, la masa de dicho péptido era consistente con la del derivado carboximetilado, lo cual se esperaba dado que la muestra había sido previamente alquilada con ácido iodoacético para evitar reacciones con cisteínas de

otros péptidos. El consiguiente análisis de los espectros de masa en tándem (MS/MS) confirmaron la naturaleza del péptido en estudio así como la posición de la modificación en la Cys34 [91].

La reacción con NBD-Cl también se utilizó para tratar de detectar al HSA-SOH. Espectrofotométricamente esto no fue posible dado que este compuesto reacciona preferentemente con la Tyr411. Además el NBD-Cl se une a la HSA de manera no covalente siendo difícil discriminar entre esta señal y la correspondiente al producto de la reacción de NBD-Cl con el ácido sulfénico [106,107]. Sin embargo esto no implica que no se pueda usar NBD-Cl para hacer la detección de HSA-SOH por espectrometría de masa [108].

En nuestro grupo se ha logrado caracterizar al HSA-SOH desde el punto de vista de su estabilidad y reactividad, utilizando TNB. La estrategia consiste en exponer al HSA-SH a oxidantes para formar HSA-SOH y luego mezclarlo con TNB. Este reacciona con HSA-SOH formando el disulfuro mixto HSA-STNB, lo que conduce a la disminución de la absorbancia a 412 nm. De esta manera se logró cuantificar el HSA-SOH formado como consecuencia de la exposición al oxidante, así como también determinar las constantes de reacción con distintas moléculas de interés. A diferencia de la mayor parte de los ácidos sulfénicos, el de la HSA se encuentra relativamente estabilizado por el entorno proteico. La ausencia de otros tioles en las proximidades es fundamental porque no le da la posibilidad de formar disulfuros intramoleculares. Además, las restricciones estéricas existentes como resultado del posicionamiento del azufre de la Cys34 previene la reacción del ácido sulfénico con el tiol o sulfénico de una segunda molécula de HSA [106].

2.5.2 Reactividad de HSA-SOH

En cuanto a su reactividad, la determinación de constantes cinéticas de reacción con moléculas de interés biológico y analítico permitió definir tres posibles destinos para el HSA-SOH formado (Figura 2.13). En primer lugar, puede sobreoxidarse y dar ácido sulfínico (HSA-SO₂H). Un posible oxidante es el peróxido de hidrógeno, siendo la constante de reacción de 0.4 M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.4, 37 °C). Sin embargo en el contexto de la sangre es probable que esta reacción sea muy minoritaria dado que el peróxido de hidrógeno que pueda encontrarse allí, reaccionará principalmente con la Prx2 del glóbulo rojo. En segundo lugar, puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular formando disulfuros mixtos (HSA-SSR). Las constantes de estas reacciones fueron determinadas para algunos tioles de bajo peso molecular presentes en plasma como cisteína, homocisteína, cisteinilglicina y glutatión. Puede observarse que estas constantes varían dependiendo del tiol (Tabla 2.2). Por último, HSA-SOH puede decaer espontáneamente con una constante de primer orden de 1.7 x 10⁻³ s⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) a un producto aún no caracterizado (HSA-SX), probablemente una sulfenamida (HSA-SNHR) [106]. Tomando en cuenta la concentración de tioles de bajo peso molecular en

plasma (12-20 μM) y las constantes cinéticas determinadas, se infiere que el HSA-SOH formado *in vivo* probablemente reaccione con otro tiol de bajo peso molecular o decaiga de manera espontánea. La vida media estimada de HSA-SOH en plasma es de 4-5 min [12], lo que dificulta su detección *in vivo*. Esto tiene que ser tenido en cuenta a la hora de desarrollar una estrategia experimental para detectar la formación de HSA-SOH en plasma. Sin embargo, la utilización de TNB en muestras complejas como el plasma no se recomienda ya que es un tiol y puede reaccionar con disulfuros, dificultando la detección y cuantificación del HSA-SOH.

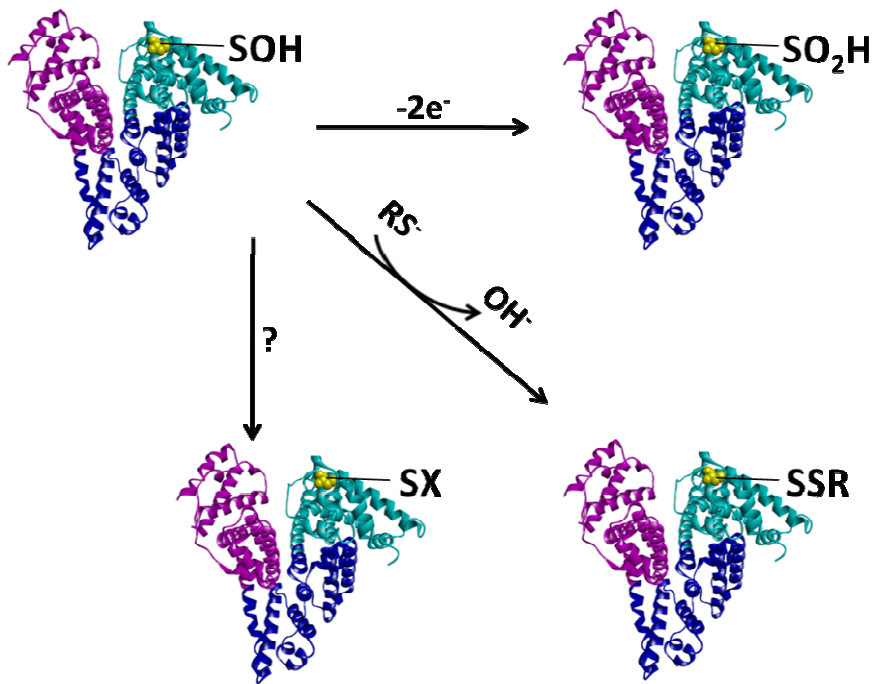


Figura 2.13. Posibles destinos para el HSA-SOH formado. HSA-SOH puede sobreoxidarse por mecanismos de oxidación de dos electrones para dar HSA-SO₂H, reaccionar con tioles de bajo peso molecular para dar HSA-SSR, o decaer espontáneamente a un producto al que llamamos HSA-SX.

Tabla 2.2. Reactividad de HSA-SOH a pH 7.4. Adaptada de [28].

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

^a Constantes determinadas a 25 °C

^b Constantes determinadas a 37 °C

Al igual que para HSA-SH, se evaluó el efecto de la lipidación sobre la reactividad de HSA-SOH. La lipidación se hizo con ácido esteárico en proporción 5:1 y nuevamente se observó un aumento en la reactividad. Por ejemplo, la constante de reacción con cisteína para el HSA-SOH formado en la proteína deslipidada es $21.6 M^{-1} s^{-1}$ mientras que para la lipidada es $69 M^{-1} s^{-1}$. En el mismo sentido, las constantes con glutación son 2.9 y $9 M^{-1} s^{-1}$. Cabe destacar también que no se observaron cambios en la constante de decaimiento espontáneo en presencia de ácidos grasos [4].

Los hallazgos sobre el aumento en la reactividad de HSA-SH y HSA-SOH cuando la proteína se encuentra complejada a ácidos grasos, podrían tener relevancia fisiológica, no solo porque es la forma en la que se encuentra la proteína en plasma, sino porque en ciertas condiciones, el número de ácidos grasos unidos aumenta. Algunas de estas condiciones son diabetes mellitus, ejercicio intenso y estimulación adrenérgica. Como ya se comentó, en estas situaciones se observa también un aumento de las formas oxidadas de la HSA y una disminución de la reducida. Esto

indica que tal vez el aumento en el número de ácidos grasos unidos en dichas condiciones de estrés oxidativo, funciona como mecanismo de protección, aumentando la capacidad antioxidante de la HSA. Además, el hecho de que la reactividad de HSA-SOH con tioles de bajo peso molecular aumente en presencia de ácidos grasos podría impactar sobre el destino final de un HSA-SOH formado *in vivo*, de modo que aumentaría la proporción de disulfuros mixtos en relación a oxoformas como los ácidos sulfínico y sulfónico. Es decir, la proporción de intermediarios reversibles aumentaría respecto a las formas oxidadas irreversibles, potenciando la capacidad antioxidante de la HSA [28].

La formación de HSA-SOH *in vitro*, producto de la oxidación por dos electrones de HSA-SH ya ha sido evidenciada. Es nuestra hipótesis que la HSA es un importante blanco de especies reactivas en plasma, y que por lo tanto la formación de dicho intermediario sulfénico también se produce *in vivo*. Es por esto que en el presente trabajo se propone poner a punto técnicas para lograr la detección de HSA-SOH *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Poner a punto técnicas para la detección de ácido sulfénico en albúmina de plasma fresco.

3.2 Objetivos específicos

1. Poner a punto la técnica de detección de ácido sulfénico utilizando la sonda de análogo de dimedona derivatizada con biotina, DCP-Bio1.
2. Poner a punto la técnica de detección de ácido sulfénico utilizando la sonda de cicloalquino derivatizado con biotina, BCN-Bio1.

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1 Materiales

La HSA se obtuvo de Sigma (fracción V), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de J. T. Baker Co., y la sonda 3-(2,4-dioxociclohexil)propil-biotina 1 (DCP-Bio1) de Kerofast. La sonda biciclo[6.1.0]nonino-biotina 1 (BCN-Bio1) fue cedida por Cristina M. Furdui (Wake Forest School of Medicine). El kit para la detección de biotina (FluoReporter® Biotin Quantitation Assay Kit for Biotinylated Proteins) y la $N\alpha$ (3-maleimidilpropionil)biocitina (NEM-biocitina) fueron adquiridos en Life Technologies. El kit de ácido bicinconínico (Bicinchoninic acid Kit for protein determination) fue adquirido en Sigma-Aldrich. Las resinas Q-Sepharose Fast Flow, las columnas PD-10 (Sephadex G-25) y los microcolumnas de gel filtración (PD SpinTrap G-25) fueron adquiridos en GE Healthcare. Excepto que se especifique lo contrario, el resto de los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Applichem.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible o un Shimadzu modelo UV-1603. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo). Para el análisis por espectrometría de masa se utilizó un equipo MALDI TOF/TOF 4800 (AB-Sciex) y un equipo ESI QTRAP 4500 (AB-Sciex) acoplado a un HPLC 1200 Infinity Series (Agilent).

4.2 Soluciones

El peróxido de hidrógeno se preparó en agua nanopura y su concentración se determinó mediante absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [109]. Para la medida de tioles se preparó una solución madre de DTNB 20 mM en etanol, a partir de la cual se preparó una solución de DTNB 0.2 mM en amortiguador pirofosfato de sodio 0.1 M, pH 9. Cada vial de DCP-Bio1 (5 mg, $PM = 396.5 \text{ g/mol}$) se disolvió agregando DMSO necesario para una concentración de 250 mM. El BCN-Bio1 (0.05 M, $PM = 376.18 \text{ g/mol}$) se preparó en DMSO. La solución de estearato de sodio (100 mM) se preparó en metanol y se solubilizó calentando en plancha ($\sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$) con agitación.

Los experimentos se realizaron en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM, salvo que se indique lo contrario.

Solución de catalasa. Se preparó una solución madre (2 g/L) en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM. La cinética de la catalasa no sigue los patrones normales de una enzima debido a que posee un K_M muy elevado y que además se inactiva a altas concentraciones de sustrato. Esto hace que no sea posible trabajar en condiciones de V_{max} , y que por lo tanto exista una dependencia lineal entre la

concentración de peróxido de hidrógeno de trabajo y la velocidad. Es por esto que las unidades de enzima deben definirse para una concentración de sustrato dada, por lo que se recomienda usar la constante de velocidad de pseudoprimer orden [110]. En este trabajo se determinó dicha constante para peróxido de hidrógeno (10 mM) y catalasa (2×10^{-4} g/L). Se siguió la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno por absorbancia a 240 nm durante 1 min, obteniendo un valor de velocidad inicial de $1.08 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$, y una constante de pseudoprimer orden para la solución madre de 11.64 s^{-1} .

Síntesis y purificación de TNB. Se partió de una solución de DTNB 5 mM en amortiguador Tris 20 mM pH 7.5, preparada en el día, y se alcalinizó hasta su completa disolución, en agitación. Para reducir el DTNB y formar TNB, se adicionó 2-mercaptoetanol en un exceso de 30 veces respecto al DTNB total y se incubó durante 30 minutos, en agitación a temperatura ambiente [106]. Para eliminar el 2-mercaptoetanol remanente se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada con amortiguador Tris 20 mM, pH 7.5. La columna se lavó con ~50 mL de dicho amortiguador y luego con ~50 mL de agua destilada. El TNB se eluyó con HCl 50 mM, recolectando las muestras en hielo. El almacenamiento a pH ácido permite la disminución de la reactividad del tiol ya que se encontrará protonado. Luego se midió la concentración del TNB sintetizado por absorbancia a 412 nm. Dicha medida se realizó en amortiguador Tris 20 mM pH 7.5, resultando en una concentración de TNB de 3 mM. Para confirmar la ausencia de DTNB se adicionó un exceso de glutatión (1 mM final) respecto a la concentración de TNB (0.03 mM). No se observó aumento en la absorbancia a 412 nm por lo que se descartó la presencia de DTNB contaminante. Se almacenó alicuotada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 Soluciones de HSA

Deslipidación. Con el objetivo de eliminar ácidos grasos y otros posibles componentes hidrofóbicos que pudiesen estar presentes en la HSA, se realizó en primer lugar la deslipidación de la misma mediante el método del carbón activado [111]. Para ello se disolvieron 4 g de HSA en 40 mL de agua destilada y se acidificó con HCl ~5 M hasta pH 3. Posteriormente se agregaron 2 g de carbón activado y se incubó con agitación a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora. Para eliminar el carbón activado se realizaron dos etapas de centrifugación, a 25400 y 37000 g, ambas durante 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante obtenido se filtró por membranas de 0.8 y $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ simultáneamente y se llevó a pH 7.4 mediante el agregado de NaOH ~5 M. La concentración se determinó por absorbancia a 279 nm ($\epsilon = 0.531 \text{ (g/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, PM = 66438 Da) [1], resultando en una concentración final de 1.34 mM. Esta HSA fue el punto de partida en todos los ensayos.

Reducción. Ya que en preparaciones comerciales el tiol de la HSA se encuentra parcialmente oxidado, principalmente formando disulfuros mixtos, es necesario reducirlo antes de trabajar con él. Con este objetivo se incubó HSA con 2-mercaptoetanol 10 mM durante 20 min a temperatura ambiente, en agitación, y se eliminó el exceso de reductor por gel filtración en columnas PD-10. La concentración de las muestras obtenidas de esta manera fue de ~0.9 mM, y la relación HSA-SH/HSA en el rango de 0.60-0.67. La concentración de tioles se midió utilizando DTNB. Esta solución de HSA se denominó HSA reducida.

Cuantificación de tioles. Se utilizó el método de Ellman [112] en el cual se mide por absorbancia a 412 nm el TNB ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) formado a partir de la reacción del tiol con DTNB. Dicha reacción se llevó a cabo incubando HSA reducida (~25 μM) con DTNB 0.2 mM en amortiguador pirofosfato de sodio 100 mM, pH 9, durante 5 minutos en oscuridad. Dado que a pH alcalino el DTNB puede hidrolizarse generando TNB, se realizó un control sin proteína.

Oxidación. Se incubó HSA reducida (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno 4 mM durante 4 min a 37 °C, de manera de obtener fracciones enriquecidas en HSA-SOH. Pasados los 4 minutos se adicionó la cantidad de catalasa necesaria para consumir el 90% del peróxido de hidrógeno en 10 segundos. En varias ocasiones la oxidación se llevó a cabo en presencia de sonda (DCP-Bio1 o BCN-Bio1) buscando aumentar el rendimiento de la reacción del HSA-SOH con las mismas. Para la puesta a punto de los experimentos con BCN-Bio1 se realizó la oxidación con concentraciones menores de HSA reducida (0.1 y 0.3 mM), manteniéndose el resto de las condiciones de reacción. Esta solución de HSA enriquecida en HSA-SOH se denominó HSA oxidada.

Lipidación. Se incubó HSA deslipidada 1.34 mM con estearato de sodio en proporción 5:1 (estearato de sodio:HSA) durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Simultáneamente se redujeron los tioles con 2-mercaptoetanol (10 mM). Finalmente se gel filtró en PD-10, y se determinó la concentración de proteína y de tioles.

4.4 Soluciones de AhpE

Determinación de la concentración de AhpE, reducción y medida de tioles. La enzima alquilhidroperóxido reductasa E de *Mycobacterium tuberculosis* fue obtenida de manera recombinante tras su expresión en *Escherichia coli*, y fue cedida por Madia Trujillo y Marcelo Reyes de Facultad de Medicina, UdelaR. Para determinar su concentración se midió absorbancia a 280 nm ($\epsilon = 23959 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [113]. Ya que la proteína recombinante obtenida de *E. coli* no está totalmente reducida, es necesario reducirla inmediatamente antes de trabajar con ella. Para ello se la incubó con ditioneitol (DTT) 1 mM, 30 minutos a 4 °C. El exceso de reductor fue eliminado pasando las muestras dos veces por microcolumnas de gel filtración. La concentración

de tioles se determinó mediante la reacción con 4,4-ditiodipiridina (DTDPy) que genera 4-tiopiridona, la cual se cuantifica por absorbancia a 324 nm ($\epsilon = 21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), obteniéndose una relación AhpE-SH/AhpE ~ 0.9 .

4.5 Cuantificación de proteínas por el ensayo del ácido bicinonónico (BCA)

La curva de calibración se hizo con HSA deslipidada (0-13 $\mu\text{g/mL}$) y se midió absorbancia a 562 nm luego de 30 minutos de incubación a 60 °C con el reactivo BCA. Las muestras problema y la curva de calibración se trataron de la misma manera y en simultáneo. Finalmente se graficó absorbancia en función de [HSA] y se ajustó a una función del tipo $y = ax + b$, que se utilizó para calcular la concentración de las muestras de acuerdo a las medidas de absorbancia obtenidas en el experimento.

4.6 Reacción de HSA-SH con NEM-biocitina

Se incubó HSA reducida (0.87 mM, HSA-SH/HSA = 0.7) con NEM-biocitina siete veces en exceso respecto a la concentración de tioles y se incubó por 1 hora en agitación, a temperatura ambiente. El exceso de NEM-biocitina se eliminó por gel filtración en PD-10. Se determinó la concentración total de proteína por absorbancia a 279 nm, y se midieron los tioles remanentes utilizando DTNB.

4.7 Reacción de HSA-SOH con DCP-Bio1

Se ensayaron diferentes concentraciones de DCP-Bio1 (10-37.5 mM). La sonda se adicionó a la HSA antes o después de la oxidación con peróxido de hidrógeno. Luego, en ambos casos se incubó por 2 h a 37 °C, pH 7.4. Para facilitar la reacción y la posterior detección se evaluaron tratamientos con dodecil sulfato de sodio (SDS) durante la reacción (1%) y luego de la reacción (1 y 2 %), seguidos de ultrafiltración en centricones con corte de 10 kDa para eliminar el SDS y la sonda que se pudiera haber desprendido. En todos los casos se incluyó un control de HSA reducida y el exceso de sonda se eliminó pasando las muestras dos veces por microcolumnas de gel filtración. Al finalizar, se determinó la concentración total de proteína por absorbancia a 279 nm y/o por el ensayo de BCA.

La cinética de reacción entre HSA-SOH y DCP-Bio1 se estudió siguiendo el decaimiento de HSA-SOH en presencia de TNB y sonda. Para ello, se incubó HSA oxidada con DCP-Bio1 40 mM a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas a tiempos crecientes, se mezclaron con TNB 70 μM y se registró la velocidad inicial de consumo de TNB por absorbancia a 412 nm, la cual es indicativa de la concentración de HSA-SOH. Se realizó también un control en ausencia de sonda pero en presencia de DMSO de modo de mantener las condiciones de reacción.

4.8 Reacción de HSA-SOH con BCN-Bio1

Se incubó HSA deslipidada o lipidada (0.3 mM) con BCN-Bio1 (0.3 mM), y HSA deslipidada (0.1 mM) con BCN-Bio1 (1 mM). La oxidación de la HSA se realizó en presencia de sonda y luego se incubó por 1 h a 37 °C. El exceso de sonda se removió pasando las muestras dos veces por microcolumnas de gel filtración. En todos los casos se incluyó un control de HSA reducida. Al final del tratamiento se determinó la concentración total de proteína por absorbancia a 279 nm y/o por el ensayo de BCA.

4.9 Reacción de AhpE-SOH con DCP-Bio1

Se oxidó AhpE (previamente reducida) con peróxido de hidrógeno en relación 1:1 respecto a la concentración de tioles, en presencia de DCP-Bio1 20 mM. Se incubó 30 minutos a 25 °C y se removió el exceso de sonda pasando las muestras dos veces por microcolumnas de gel filtración. Luego se determinó la concentración total de proteína por absorbancia a 280 nm y/o por el ensayo de BCA. Al igual que para la HSA se realizó un control con AhpE reducida, no expuesta a peróxido de hidrógeno.

4.10 Detección de marca de biotina con FluoReporter® Biotin Quantitation Assay Kit for Biotinylated Proteins

El ensayo se basa en la utilización del reactivo Biotective Green, el cual consiste en avidina marcada con un fluoróforo y con un *quencher* que ocupa los sitios de unión a biotina, apagando la fluorescencia por FRET [114]. Así, en presencia de biotina, el *quencher* es desplazado, se elimina el FRET y el fluoróforo fluoresce. Se realizó una curva de calibración para concentraciones de biocitina entre 0-0.8 µM. La biocitina es un análogo de biotina, provisto por el kit, que consiste en una molécula de biotina conjugada a una lisina. Las medidas de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}/\lambda_{em} = 519 \text{ nm}$) se hicieron luego de 5 minutos de incubación con Biotective Green, a temperatura ambiente, en oscuridad. Tanto la curva de calibración como las muestras fueron tratadas de la misma manera. Se realizó el gráfico de intensidad de fluorescencia vs. [Biocitina], correspondiente a la curva de calibración, y los datos se ajustaron a un polinomio de segundo grado ($y=ax^2+bx+c$) sobre el cual se intrapolaron las intensidades de fluorescencia obtenidas para las muestras de interés. Con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección, según sugiere el manual del fabricante, se sometieron algunas muestras al tratamiento con proteasa (tipo XIV de *Streptomyces griseus*). Para ello, se mezclaron 50 µL de muestra con 1 µL de proteasa (2 U/mL final) y se incubó toda la noche a 37 °C.

4.11 Análisis por espectrometría de masa “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)” de HSA tripsinizada

Las muestras de HSA reducida y oxidada tratadas con BCN-Bio1 se analizaron por espectrometría de masa. En primer lugar se tripsinizaron las muestras con tripsina de páncreas bovino (Sigma) en proporción 100:1 (HSA:tripsina), incubando toda la noche a 37 °C. Las muestras digeridas fueron llevadas a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur donde fueron analizadas por Madelón Portela. Previo al análisis se pasó cada muestra por un ziptip con el fin de concentrarlas y limpiarlas de sales. Los ziptips se activaron con acetonitrilo (ACN):H₂O 50%:50% y se equilibraron con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%. Luego se lavaron con TFA 0.1% y se hizo la elución de la muestra con la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 60% ACN:0.1% TFA. Las muestras se cargaron en la placa y se analizaron en el espectrómetro de masa.

4.12 Análisis por espectrometría de masa “Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)” de AhpE (proteína entera)

El experimento se realizó en Facultad de Medicina con la ayuda de Mauricio Mastrogiovani. Se analizaron muestras de AhpE reducida y oxidada, tratadas con DCP-Bio1. Las muestras se inyectaron en una columna C4 (GraceVydac 214MS5115) acoplada al espectrómetro de masa (HPLC-MS). La elución se realizó mezclando la solución A (0.1 % ácido fórmico en agua) con un gradiente de 5 a 50 % de solución B (0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo) en 8 minutos a un flujo de 100 μ L/min. Los espectros de masa se obtuvieron en modo positivo y en un rango de m/z de 500 – 1500. Para el análisis de los datos se hizo la deconvolución con el programa PeakView v2.2, lo que permitió obtener los espectros de masa (Intensidad vs. Masa).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Detección de la marca de biotina con el FluoReporter Biotin Quantitation Assay kit

En este trabajo, con el objetivo de poner a punto técnicas tendientes a la detección de HSA-SOH *in vivo*, se evaluaron dos sondas de ácido sulfénico: DCP-Bio1 y BCN-Bio1. Ambas ya fueron utilizadas con éxito para atrapar el ácido sulfénico formado en otras proteínas [97,103]. Estas sondas tienen la particularidad de estar derivatizadas con biotina, lo que facilita la detección. En este sentido, se utilizó un kit que permite detectar y cuantificar la marca de biotina. Para ello se realizó una curva de calibración de Intensidad de fluorescencia vs. [Biotina] que se ajustó a un polinomio de segundo grado (Figura 5.1), según las indicaciones del fabricante. Así, con los parámetros determinados para el ajuste se obtiene la concentración de biocitina, o biotina, correspondiente a cada intensidad de fluorescencia. Cabe aclarar que la biocitina es una molécula que se compone de biotina y L-lisina. A los efectos de nuestro sistema de detección el uso de biocitina o biotina es indistinto, por lo que las trataremos como análogos. A continuación se muestra una curva de calibración representativa (Figura 5.1).

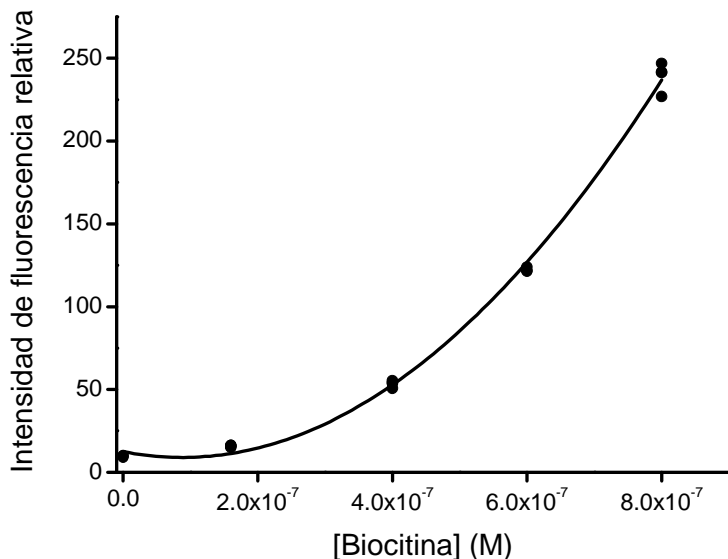


Figura 5.1. Curva de calibración para el ensayo. Se mezclaron concentraciones crecientes de biocitina con el reactivo Biotective Green. La concentración de este fue la misma para todos los puntos de la curva. Las mezclas se incubaron durante 5 min en oscuridad, a temperatura ambiente y se midió intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}/\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$). El gráfico se ajustó a un polinomio de grado dos, del tipo $y = ax^2 + bx + c$.

5.2 Reacción de HSA reducida con NEM-biotina

En primer lugar fue necesario corroborar que el sistema de detección funcionaba correctamente. Para ello se utilizó NEM-biotina. El NEM alquila los tioles y la marca de biocitina puede ser detectada y cuantificada con el kit (Figura 5.2). Se

midieron los tioles antes y después de la alquilación obteniéndose un descenso en la relación HSA-SH/HSA de 0.70 a 0.05, sugerente de que la fracción de tioles alquilados respecto al total ($\text{HSA-SH}_{\text{alquilado}}/\text{HSA-SH}$) era de 0.93 lo cual indica que la sonda funcionó correctamente. Al medir biocitina por fluorescencia se obtuvo un cociente de 0.30 biocitinas/HSA, el cual representa 0.46 biocitinas/ $\text{HSA-SH}_{\text{alquilado}}$ (Tabla 5.1). Es decir, se detectaron casi la mitad de los tioles alquilados. Como se trataba simplemente de un primer abordaje y no era la reacción que deseábamos poner a punto, no se continuó trabajando en mejorarla y se concluyó que el sistema de detección funciona.

Se realizó asimismo un control que consistió en HSA reducida sin tratar con NEM-biocitina. La señal de fluorescencia obtenida fue equivalente al primer punto de la curva de calibración, aquél en el cual la concentración de biocitina es cero. Esto indica que la HSA comercial utilizada en los experimentos está libre de trazas de biotina o biocitina que puedan interferir en la detección.

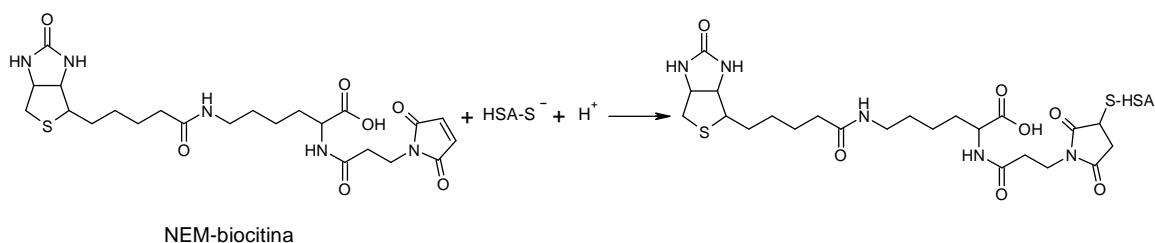


Figura 5.2. Reacción entre HSA-SH y NEM-biocitina.

Tabla 5.1. Se trató HSA reducida ($\text{HSA-SH}/\text{HSA} = 0.7$) con NEM-biocitina (7 veces en exceso respecto a la concentración de HSA-SH). Se incubó durante 1 h, en agitación, a temperatura ambiente y se removió el exceso de NEM-biocitina por gel filtración en PD-10. Se determinó el contenido de proteína, tioles y biocitina. El error corresponde al error estándar de dos medidas de una misma muestra.

Muestra	Biocitina/HSA	Biocitina/ $\text{HSA-SH}_{\text{alquilado}}$
HSANEM-biocitina	$(29.51 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	$(46.11 \pm 0.03) \times 10^{-2}$

5.3 Reacción de HSA oxidada con DCP-Bio1

Como ya se comentó, la 1,3-ciclohexadiona de DCP-Bio1 es un nucleófilo que reacciona con el ácido sulfénico, que actúa como electrófilo. Esto es una ventaja, dada la escasez de otros grupos de igual carácter en las proteínas (Figura 5.3). Con el fin de poner a punto la técnica para la detección de HSA-SOH utilizando DCP-Bio1, se ensayaron distintas concentraciones de sonda. La oxidación de la HSA se llevó a cabo en condiciones donde la formación de HSA-SOH está optimizada (4 mM H_2O_2 , 4 min, 37 °C) [106]. Como control se utilizó HSA reducida. Aunque esta HSA no está

completamente reducida, se espera que las formas oxidadas irreversibles como HSA-SO₂H y HSA-SO₃H presentes en la solución, no reaccionen con la sonda según reportado [95].

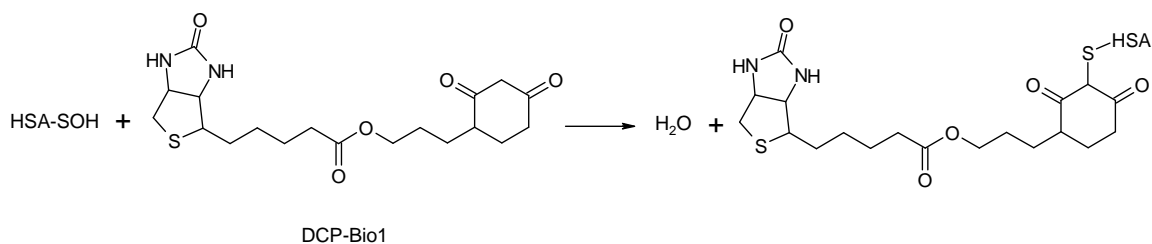


Figura 5.3. Reacción entre HSA-SOH y DCP-Bio1.

En primer lugar se realizó un control positivo en el que se midió la fluorescencia de una concentración conocida de DCP-Bio1, obteniéndose una relación biotina/DCP-Bio1 de 1.04, tal y como se esperaba ya que cada molécula de sonda contiene una molécula de biotina (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Se midió fluorescencia para determinar el contenido de biotina de DCP-Bio1 de concentración conocida. El error corresponde al error estándar de cuatro medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/DCP-Bio1
DCP-Bio1	1.04 ± 0.02

Luego se realizó el primer ensayo con DCP-Bio1 y HSA para el cual se utilizaron concentraciones de 10 y 0.5 mM, respectivamente. En estas condiciones se obtuvo una relación biotina/HSA para la muestra oxidada de 0.039 (Tabla 5.3). Para el control de HSA reducida se obtuvo una relación similar (0.040, Tabla 5.3). El hecho de que se observe fluorescencia en la muestra control sugiere que la sonda se une en forma inespecífica a la proteína, lo que podría verse favorecido por los varios sitios de unión a ligandos que esta presenta. Por otro lado, el cociente obtenido con la HSA oxidada fue prácticamente igual, lo que sugiere que la sonda, en estas condiciones, no reaccionó con el HSA-SOH.

Buscando mejorar la detección por el Biotective Green, según se sugiere en el kit, se procedió a digerir con proteasa las muestras ya tratadas con la sonda (Tabla 5.3). El aumento de la relación biotina/HSA observado fue pequeño, mostrando que en estas condiciones el problema principal no radica en la falta de accesibilidad del Biotective Green al sitio de la modificación, sino en la reacción misma entre HSA-SOH y DCP-Bio1.

El siguiente paso consistió en tratar de corroborar si la sonda efectivamente se une de manera inespecífica y no covalente a la HSA. Para ello se incubaron con SDS las

muestras tratadas con DCP-Bio1, sin digerir con proteasa (Tabla 5.3), seguido ultrafiltración para eliminar el SDS y otros componentes de bajo peso molecular. La relación biotina/HSA para HSA reducida y oxidada tratadas con SDS continuó siendo muy similar. Es probable que el remanente de señal observado se deba a que en las condiciones utilizadas no se logra remover todo lo que estaba unido no covalentemente o a que exista modificación covalente de algún residuo con la sonda, que no podría ser eliminado con SDS.

Tabla 5.3. Se incubó HSA oxidada (H_2O_2 4 mM, 4 min, 37 °C) y reducida (0.5 mM) con DCP-Bio 1 (10 mM, 2 h, 37 °C). Luego se gel filtraron y se trataron o no, con proteasa (2 U/mL, toda la noche, 37 °C). Alternativamente, se trataron con SDS (1%, 20 min, 37 °C) seguido de ultrafiltración. Se determinó el contenido de proteína y de biotina. El error corresponde al error estándar de dos medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/HSA
HSARED	$(4.04 \pm 0.05) \times 10^{-2}$
HSAox	$(3.85 \pm 0.05) \times 10^{-2}$
HSARED, proteasa	$(4.58 \pm 0.02) \times 10^{-2}$
HSAox, proteasa	$(4.70 \pm 0.04) \times 10^{-2}$
HSARED, SDS	$(3.41 \pm 0.02) \times 10^{-2}$
HSAox, SDS	$(3.39 \pm 0.08) \times 10^{-2}$

Cuando se repitió el experimento con una concentración mayor de sonda, se produjo un pequeño aumento en la relación biotina/HSA, pero igual en ambas muestras (Tabla 5.4). Se realizó un nuevo intento con SDS, esta vez más concentrado (2%), sin registrarse mejoras importantes en la detección (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Se incubó HSA oxidada (H_2O_2 4 mM, 4 min, 37 °C) y reducida (0.5 mM) con DCP-Bio 1 (37.5 mM, 2 h, 37 °C). Luego se gel filtraron y se trataron o no, con SDS (2%, 20 min, 37 °C) seguido de ultrafiltración. Se determinó el contenido de proteína y de biotina. El error corresponde al error estándar de dos medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/HSA
HSARED	$(5.07 \pm 0.11) \times 10^{-2}$
HSAox	$(4.91 \pm 0.04) \times 10^{-2}$
HSARED, SDS	$(5.54 \pm 0.03) \times 10^{-2}$
HSAox, SDS	$(5.31 \pm 0.03) \times 10^{-2}$

Con el objetivo de favorecer la reacción entre DCP-Bio1 y el HSA-SOH, se realizó la incubación de HSA (oxidada y reducida) con DCP-Bio1 en presencia de SDS de modo de aumentar la accesibilidad de la Cys34, y favorecer así la reacción de la sonda con el HSA-SOH formado en la muestra oxidada. Si bien se constató un aumento leve en la cantidad de HSA-SOH detectado por molécula de HSA, dicha relación continuó siendo pequeña e igual para HSA reducida y oxidada (Tabla 5.5). Una posible desventaja de

esta aproximación es que la disminución de restricciones estéricas de la Cys34, producto de la desnaturalización de la HSA, podría eventualmente conducir a la formación de tiosulfatos o disulfuros intermoleculares, por la reacción de un HSA-SOH con otro HSA-SOH o con un HSA-SH, respectivamente. Estos sulfénicos dejarían de estar disponibles para reaccionar con DCP-Bio1, lo que llevaría a subestimar la cantidad de HSA-SOH formado durante la oxidación.

Tabla 5.5. Se incubó HSA oxidada (H_2O_2 4 mM, 4 min, 37 °C) y reducida (0.5 mM) con SDS (1%) y DCP-Bio 1 (29 mM, 2 h, 37 °C) en simultáneo. Se ultrafiltraron las muestras y se determinó el contenido de proteína y de biotina. El error corresponde al error estándar de dos medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/HSA
HSAre _d , SDS	$(6.49 \pm 0.04) \times 10^{-2}$
HSAox, SDS	$(6.39 \pm 0.07) \times 10^{-2}$

Por último se decidió realizar la oxidación de la HSA en presencia de sonda buscando eliminar el tiempo en que el HSA-SOH recién formado permanece en solución sin sonda (Tabla 5.6). Se observó un aumento en la relación biotina/HSA, evidenciándose una pequeña diferencia entre la muestra oxidada y el control, a favor de la oxidada, que se perdió luego del tratamiento con proteasa.

Tabla 5.6. Se mezcló HSA reducida (0.5 mM) con DCP-Bio1 (30 mM) y se trató o no con H_2O_2 (4 mM, 4 min, 37 °C). Ambas muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. Luego se gel filtraron y se trataron o no con proteasa (2 U/mL, toda la noche, 37 °C). Se determinó el contenido de proteína y de biotina. Para las muestras sin tratar con proteasa, el error corresponde al error estándar de cuatro medidas de una misma muestra. Para las tratadas con proteasa, al error estándar de seis medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/HSA
HSAre _d	$(8.27 \pm 0.07) \times 10^{-2}$
HSAox	$(9.47 \pm 0.04) \times 10^{-2}$
HSAre _d , proteasa	$(16.9 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
HSAox, proteasa	$(14.9 \pm 0.3) \times 10^{-2}$

Los resultados negativos obtenidos respecto a la incorporación de sonda a muestras de HSA oxidada pueden explicarse de la siguiente manera. Como se mencionó antes, una vez formado el HSA-SOH decae en forma espontánea con una constante de primer orden de $5.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C) [28]. Por lo tanto, si la sonda reacciona muy lento es posible que no logre competir con dicho decaimiento. Para verificar esta hipótesis se decidió en primer lugar, estudiar la reacción entre HSA-SOH y DCP-Bio1 desde el punto de vista cinético, tratando de obtener un estimado de la constante para dicha reacción. Para esto, se estudió el decaimiento del sulfénico en ausencia y presencia de sonda, utilizando un protocolo ya puesto a punto en el laboratorio pero en volúmenes más pequeños para economizar el gasto de sonda.

Cuando el experimento se hizo en ausencia de sonda se obtuvo una caída exponencial en la velocidad de decaimiento de HSA-SOH a partir de la cual se estimó una constante de $7.6 \times 10^{-4} \pm 3.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4 y 25 °C), que es del orden de lo reportado ($(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4, 25 °C [28]) pero que posee un error asociado muy grande. Si bien el diseño experimental sobre el cual se planificó este experimento es robusto y ya está puesto a punto, el uso de volúmenes pequeños dificultó la manipulación. Esto probablemente haya introducido error en las lecturas, que resultaron ruidosas lo cual se refleja en el error asociado a la constante. En caso de que DCP-Bio1 efectivamente reaccionara con HSA-SOH, es de esperar que en presencia de la sonda, la constante de decaimiento de HSA-SOH aumente, ya que el HSA-SOH estaría siendo consumido además de por el decaimiento espontáneo, por la reacción con la sonda. Sin embargo, cuando se realizó el mismo experimento en presencia de DCP-Bio1 no se observaron diferencias con el control sin sonda. Se estimó que la constante de segundo orden de la reacción entre DCP-Bio1 y HSA-SOH es menor que $2.8 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ teniendo en cuenta que la concentración de sonda utilizada en el ensayo fue de 40 mM y si se considera como mínimo un 20 % de diferencia entre las velocidades de ambas reacciones. En suma, la reacción de DCP-Bio1 y HSA-SOH sería más lenta que el decaimiento, lo que podría explicar por qué no se logró la detección de HSA-SOH con esta sonda.

Para tener un control positivo se decidió utilizar otra proteína en lugar de la HSA. La elegida fue la alquil-hidroperóxido reductasa E de *M. tuberculosis* (AhpE), obtenida de manera recombinante de *E. coli*. Se trata de una integrante de la familia de las peroxirredoxinas, que posee una única cisteína la cual al oxidarse forma un derivado ácido sulfénico relativamente estable, por lo que idealmente se obtendría 1 AhpE-SOH/AhpE [113,115]. El esquema de trabajo consistió en tratar AhpE previamente reducida con un exceso de DCP-Bio1 y oxidar o no con H₂O₂. Cabe destacar que el protocolo de oxidación estaba optimizado por el grupo de Madia Trujillo. En una primera instancia los resultados fueron similares para las muestras oxidada y reducida, indicando tal vez pegado inespecífico sobre la misma (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Se mezcló AhpE reducida con DCP-Bio1 (20 mM) y se trató o no con H₂O₂ (1:1 AhpE-SH:H₂O₂). Ambas muestras se incubaron 30 min a 25 °C y se gel filtraron. Se determinó el contenido de proteína y de biotina. El experimento se realizó por duplicado. El error corresponde al error estándar del promedio de dos experimentos independientes.

Muestra	Biotina/AhpE
AhpEred	$(67 \pm 8) \times 10^{-2}$
AhpEox	$(62 \pm 10) \times 10^{-2}$

Durante la realización de los ensayos se observó que la absorbancia determinada a 280 nm con el fin de cuantificar la concentración de proteína luego del tratamiento con la sonda y gel filtración, era demasiado elevada para la concentración

de proteína esperada. Algo similar pero en menor medida se observó para la HSA tratada con DCP-Bio1. Para corroborar esta hipótesis se realizó el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) para muestras de HSA y AhpE tratadas con DCP-Bio1 de modo de obtener una segunda lectura de sus respectivas concentraciones. A continuación se muestra la curva de calibración (Figura 5.4).

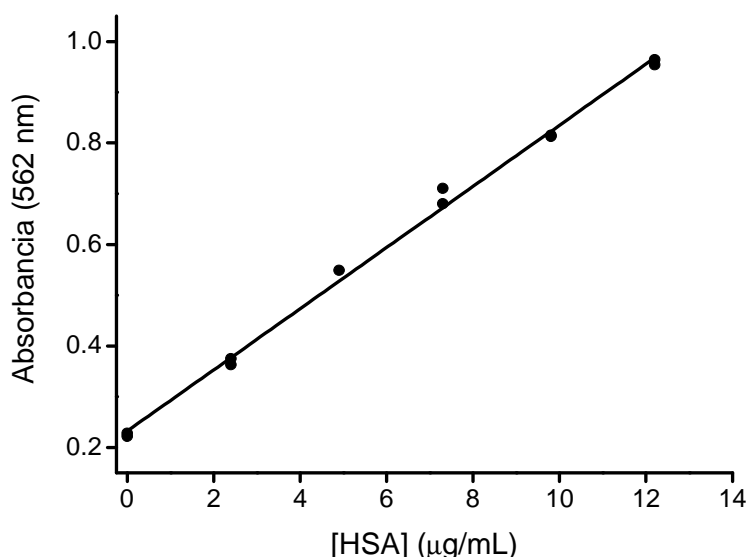


Figura 5.4. Curva de calibración del ensayo de BCA. Se mezcló HSA deslipidada en concentraciones crecientes, con el reactivo BCA. La concentración de éste fue la misma para todos los puntos de la curva. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 60 °C y se midió absorbancia a 562 nm. El gráfico se ajustó a una recta.

Tabla 5.8. Concentración de proteína de las distintas muestras determinada por absorbancia a 280 y 279 nm para la AhpE y HSA, respectivamente, así como por el método de BCA, y la relación entre ambas. Para la AhpE el experimento se realizó para una de las muestras del promedio que se muestra en la Tabla 5.7. Para la HSA el experimento se realizó con las muestras de la Tabla 5.5.

Muestra	[Proteína] (µM)		Abs/BCA
	Absorbancia	BCA	
AhpEred	51.5	22.5	2.29
AhpEox	55.2	17.9	3.08
HSAred	420	177	2.37
HSAox	482	247	1.94

Al comparar las concentraciones proteicas obtenidas para las cuatro muestras por ambos métodos, se puede observar que en todos los casos la concentración determinada por absorbancia a 280 y 279 nm es mayor que la determinada por el ensayo de BCA (Tabla 5.8). Es probable que la elevada concentración de DCP-Bio1 utilizada en los ensayos genere turbidez en la solución, afectando de esta manera la medida de absorbancia a 280 y 279 nm. Esta sobreestimación parece ser bastante constante si se comparan las muestras de AhpE (reducida y oxidada) entre sí y por otro lado las de HSA (reducida y oxidada) entre sí, y repercute directamente en las relaciones biotina/AhpE y biotina/HSA. Si se tiene en cuenta la concentración

determinada por el método de BCA se puede observar cómo cambian dichas relaciones (Tabla 5.9). En el caso de la AhpE, las relaciones son mayores a 1, lo cual no era de esperar teniendo en cuenta que esta proteína posee una única cisteína y que por lo tanto no puede formar más de 1 AhpE-SOH/AhpE. Este exceso de marca se puede interpretar como pegado inespecífico de la sonda a la proteína o que no se eliminó completamente el exceso de sonda previo a la medida de fluorescencia. De ser así, el remanente de DCP-Bio1 libre en solución reaccionaría con el reactivo Biotective Green, de la misma manera que lo hace AhpE-S-DCP-Bio1, sobreestimando la cantidad de este último en la solución. Precisamente restando lo obtenido para la muestra reducida vemos que se detectó un 55 % del AhpE-SOH que se puede formar. En cuanto a la HSA, si bien se observa un aumento considerable de la relación biotina/HSA, continúa sin haber diferencias entre HSA oxidada y el control.

Tabla 5.9. Relaciones biotina/proteína calculadas con la concentración obtenida por absorbancia a 280 y 279 nm o por el método de BCA.

Muestra	biotina/proteína	
	Abs	BCA
AhpEred	0.59	1.35
AhpEox	0.52	1.90
HSARED	0.082	0.20
HSAox	0.095	0.18

Buscando confirmar los nuevos resultados obtenidos por fluorescencia para la AhpE se decidió realizar un experimento de espectrometría de masa de la proteína oxidada tratada con DCP-Bio1 en las mismas condiciones. También se realizó un control de AhpE reducida. En el espectro de masa de la AhpE reducida (Figura 5.5, A) se observó un pico predominante correspondiente a AhpE-SH (observado: 19316 Da, esperado: 19319 Da) [115]. Se observó también un pico minoritario correspondiente a AhpE-SH + 395 Da (19711 Da) que podría corresponder al producto de la reacción de AhpE-SOH y DCP-Bio1, AhpE-S-DCP-Bio1. En dicha reacción se produce la pérdida del oxígeno del AhpE-SOH, así como de dos átomos de hidrógeno, uno del AhpE-SOH y otro de la sonda. De esta manera, la masa de AhpE-S-DCP-Bio1 corresponde a la masa de la AhpE-SH (19316 Da) + DCP-Bio1 (396.5 Da) - 2H (2 Da). El tiol de esta proteína es muy sensible a la oxidación, y pudo haberse oxidado a AhpE-SOH a partir del oxígeno del ambiente durante el tratamiento. El AhpE-SOH generado reaccionaría con DCP-Bio1, explicando la presencia de dicho pico en el espectro de masa de la AhpE control. Por otro lado, se visualizó un pico correspondiente a AhpE-SH + 178 Da (19494 Da) que también se observó en el espectro de la proteína reducida sin tratar con sonda (datos no mostrados). Esta señal puede corresponder a AhpE-SH con una formilmetionina (177 Da), si se considera que la proteína fue expresada en *E. coli* y que es probable que la eliminación de la formilmetionina inicial no haya sido completa. Se observaron también dos picos, correspondientes a AhpE-SH + 25 Da (19341 Da) y AhpE-SH + 45 Da

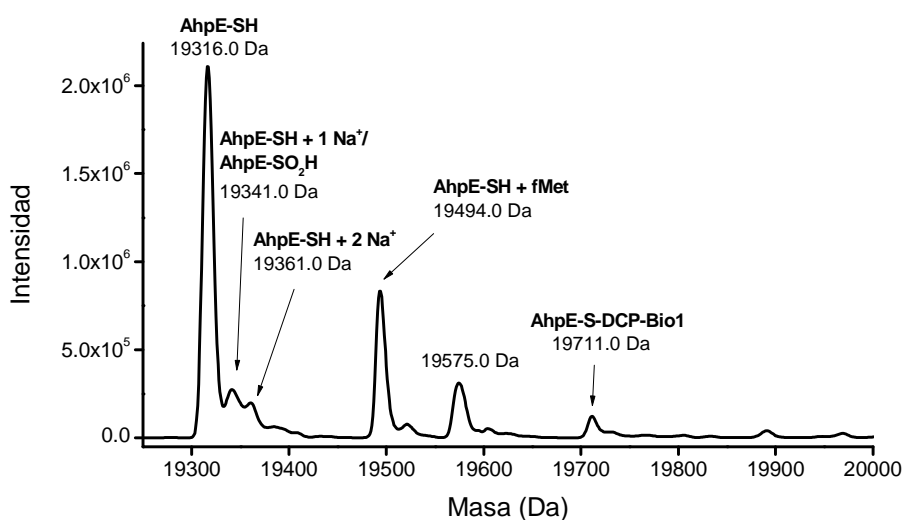
(19361 Da) que podrían indicar la presencia de AhpE-SH con uno y dos átomos de sodio (+ 23 Da), respectivamente. A su vez, es posible que el pico a 19341 Da incluya también AhpE-SO₂H, pues se incrementa en la oxidada. Finalmente, se observa la presencia de un pico de masa 19575 Da, que representa un incremento de 259 Da respecto a AhpE-SH, de identidad desconocida.

Para la AhpE oxidada (Figura 5.5, B) también se observaron los picos correspondientes a AhpE-SH (19317 Da) y AhpE-SH + 177 Da (19494 Da). Como era de esperar, el pico de AhpE-SH + 393 Da (19710 Da) correspondiente a AhpE-S-DCP-Bio1 se observó con mayor intensidad respecto a lo visto en la muestra reducida. Finalmente, se observó un pico para AhpE-SH + 27 Da (19344 Da) que podría corresponder a la especie más un sodio junto con AhpE-SO₂H. Como ya se comentó, dicho pico se vio aumentado, lo que se correlaciona con un aumento de la sobreoxidación en presencia de peróxido de hidrógeno. Además, se observó un pico correspondiente a la masa de la proteína con formilmetionina más la sonda (19889 Da). Esto indica que esta forma de la proteína también es susceptible a la oxidación y a la posterior reacción con la sonda. En ambas muestras, reducida y oxidada, se observó la presencia de un pico de masa 19575 y 19576 Da, respectivamente. Este pico parece oxidarse para dar el producto de masa 19605 Da (19575 + 29 Da). Este último, a su vez, parecería reaccionar con DCP-Bio1 dando un pico a 19970 Da (19605 + 365 Da). Cabe destacar que no se observó evidencia de la formación de productos que incorporan dos sondas.

Tanto por fluorescencia como por espectrometría de masa se observó para la AhpE oxidada y tratada con DCP-Bio1, un aumento en la fracción de AhpE-S-DCP-Bio1, correspondiente a la reacción de AhpE-SOH con la sonda.

En suma, los resultados indican que la sonda DCP-Bio1 efectivamente funcionó con la AhpE en las condiciones de reacción elegidas y el sistema de detección también lo hizo. En cuanto a la reacción de DCP-Bio1 y HSA-SOH, como ya se comentó, parecería ser más lenta que el decaimiento espontáneo del mismo, y por lo tanto no logra competir.

A



B

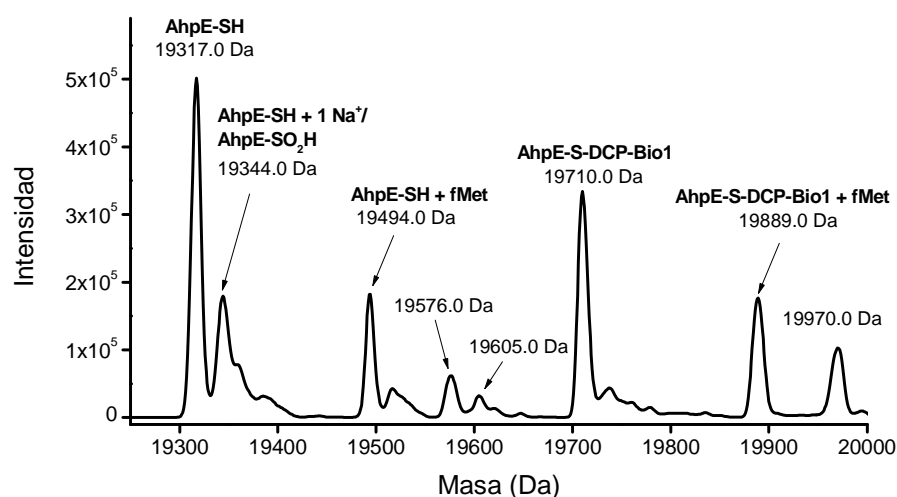


Figura 5.5. Análisis por espectrometría de masa de proteína entera, de AhpE tratada con DCP-Bio1. Se trató AhpE reducida con DCP-Bio1 20 mM y se oxidó o no con H₂O₂. Las muestras se incubaron durante 1 h a 25 °C. Se eliminó el exceso de sonda y se pasó la muestra por un HPLC con columna de fase reversa. Luego se analizaron las muestras por espectrometría de masa ESI. (A) AhpE reducida. (B) AhpE oxidada.

5.4 Reacción de HSA oxidada con BCN-Bio1

Dado que DCP-Bio1 no funcionó como sonda de HSA-SOH, se decidió evaluar otra sonda denominada BCN-Bio1 (Figura 5.6). Como ya se comentó, este cicloalquino biotinilado en principio presenta una mayor reactividad y permite utilizar el mismo sistema de detección de la marca de biotina por fluorescencia. Para la puesta a punto se ensayaron distintas concentraciones de BCN-Bio1, para muestras de HSA reducida y oxidada, haciendo en todos los casos la oxidación en presencia de sonda.

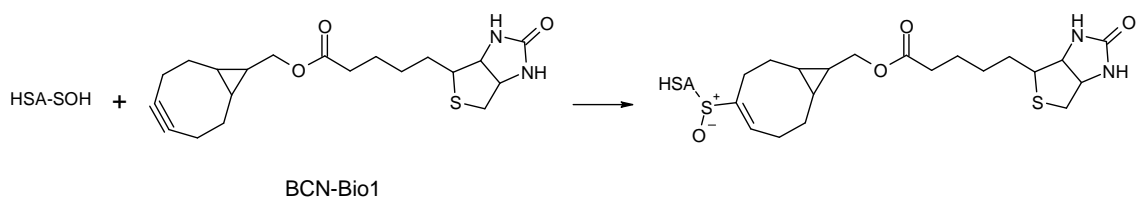


Figura 5.6. Reacción entre HSA-SOH y BCN-Bio1.

En primer lugar, se realizó un control positivo de sonda de concentración conocida (BCN-Bio1), sin tratar con HSA (Tabla 5.10). La relación biotina/BCN-Bio1 obtenida fue de 1.07, tal y como se esperaba ya que por cada molécula de sonda hay una molécula de biotina.

Tabla 5.10. Se midió fluorescencia para determinar el contenido de biotina de BCN-Bio1 de concentración conocida. El error corresponde al error estándar de cuatro medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/BCN-Bio1
BCN-Bio1	1.07 ± 0.02

Luego, para el primer experimento con HSA, se utilizó una proporción 1:1 (HSA:BCN-Bio1), según sugería la literatura [103]. Además, se decidió trabajar con HSA lipídada para favorecer la reacción de HSA-SOH y la sonda. Como se comentó antes, al lipidar a la HSA, esta sufre un pequeño cambio conformacional que lleva a que se produzca un aumento en la exposición al solvente de la Cys34, una disminución del impedimento estérico y un aumento de la reactividad de HSA-SH y de HSA-SOH [4]. Sin embargo, nuevamente se obtuvieron relaciones biotina/HSA pequeñas e iguales para la muestra oxidada y el control (Tabla 5.11). Dado que la lipidación no mejoró la detección de HSA-SOH, se decidió continuar trabajando con HSA deslipídada por ser más sencillo.

Tabla 5.11. Se mezcló HSA reducida y lipídada (0.3 mM) con BCN-Bio1 (0.3 mM) y se trató o no con H₂O₂ (4 mM, 4 min, 37 °C). Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C y se gel filtraron. Se determinó el contenido de proteína y de biotina. El error corresponde al error estándar de cuatro medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/HSA
HSAred, lip	(2.20 ± 0.02) × 10 ⁻²
HSAox, lip	(2.06 ± 0.02) × 10 ⁻²

Dado que la HSA posee una gran variedad y cantidad de sitios de unión a ligandos, se decidió verificar que la sonda no se estuviera uniendo preferentemente a dichos sitios, en lugar de reaccionar con HSA-SOH dificultando la detección. Recordar que la relación utilizada fue 1:1 (HSA:BCN-Bio1). Para ello se realizó el experimento

con una concentración de sonda 10 veces mayor que la de HSA, buscando cubrir dichos sitios y que además quedara sonda disponible para reaccionar con HSA-SOH (Tabla 5.12). Sin embargo tampoco se observó un aumento significativo en la detección, ni diferencias entre ambas muestras, indicando que no es la unión a dichos sitios lo que dificulta la detección de HSA-SOH.

Tabla 5.12. Se mezcló HSA reducida (0.1 mM) con BCN-Bio1 (1mM) y se trató o no con H₂O₂ (4 mM, 4 min, 37 °C). Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C y se gel filtraron. Se determinó el contenido de proteína y de biotina. El error corresponde al error estándar de cuatro medidas de una misma muestra.

Muestra	Biotina/HSA
HSARed	$(2.89 \pm 0.10) \times 10^{-2}$
HSAox	$(2.84 \pm 0.11) \times 10^{-2}$

Finalmente se decidió realizar un último intento, nuevamente con una relación 1:1 (HSA:BCN-Bio1) pero esta vez con HSA deslipidada. También se incluyo o no, el tratamiento de las muestras con proteasa (Tabla 5.13). De la tabla se puede observar que para las muestras sin tratar con dicha enzima, las relaciones biotina/HSA son pequeñas e igual para el control y la muestra oxidada, tal y como sucedía en los experimentos anteriores. Por otro lado, para las muestras tratadas con proteasa no solo se observó un aumento en la relación biotina/HSA, sino que además se observó una diferencia apreciable entre el control de HSA reducida y HSA oxidada. Considerando que la señal para la reducida es debida a pegado inespecífico, y que es equivalente a lo que se pega inespecíficamente en la oxidada, se puede cuantificar el ácido sulfénico como la resta de lo detectado para la oxidada y la reducida. En ese caso, el cociente biotina/HSA promedio es de 0.16 que se corresponde con lo determinado previamente por nuestro grupo (0.18 ± 0.02 HSA-SOH/HSA) mediante el estudio de la reacción entre HSA-SOH y TNB [106]. En cuanto a la diferencia entre las muestras con y sin tratar con proteasa, lo que sucede probablemente es que la digestión aumenta la accesibilidad de los sitios biotinilados, disminuyendo el impedimento estérico y favoreciendo así la interacción de la biotina con la avidina del Biotective Green.

Tabla 5.13. Se mezcló HSA reducida (0.3 mM) con BCN-Bio1 (0.3 mM) y se trató o no con H₂O₂ (4 mM, 4 min, 37 °C). Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C y se gel filtraron. Luego se incubó o no con proteasa (2 U/mL, toda la noche, 37 °C). Se determinó el contenido de proteína y de biotina. El error corresponde al error estándar de medidas de dos experimentos independientes.

Muestra	Biotina/HSA
HSARed	$(4.05 \pm 0.27) \times 10^{-2}$
HSAox	$(3.82 \pm 0.19) \times 10^{-2}$
HSARed, proteasa	$(19.7 \pm 0.5) \times 10^{-2}$
HSAox, proteasa	$(36.3 \pm 1.6) \times 10^{-2}$

Más allá de que no se percibieron irregularidades a la hora de medir la concentración de proteína por absorbancia a 279 nm de muestras de HSA tratadas con BCN-Bio1, se realizó el ensayo de BCA para HSA reducida y oxidada sin tratar con proteasa. A partir de las concentraciones determinadas por el método de BCA se observó que si bien hay sobreestimación, esta es menor que la que se observa para muestras tratadas con DCP-Bio1, y que es de hecho constante para la HSA reducida y oxidada (Tabla 5.14). De esta manera se confirmó que la determinación de la concentración de proteína por absorbancia a 279 nm de las muestras de HSA reducida y oxidada tratadas con BCN-Bio1, es válida.

Tabla 5.14. Concentraciones de HSA determinadas por absorbancia a 279 nm y por el método de BCA, y la relación entre ambas.

Muestra	[Proteína] (μM)		
	Abs ₂₇₉	BCA	Abs ₂₇₉ /BCA
HSARED	141	128	1.10
HSAOX	148	136	1.09

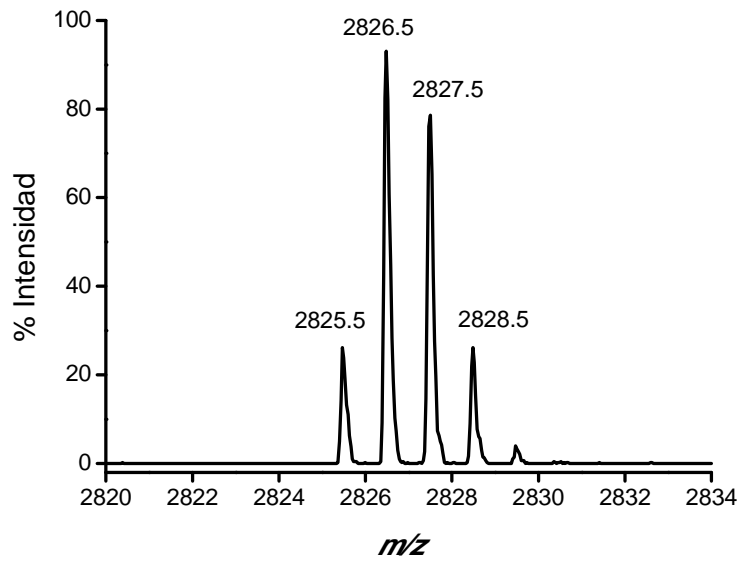
Hasta el momento se había conseguido detectar la formación de HSA-SOH utilizando BCN-Bio1 y proteasa, con detección por fluorescencia (Tabla 5.13). Para confirmar dichos resultados se realizó un análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF de muestras de HSA reducida y oxidada, tratadas con BCN-Bio1, y posteriormente tripsinizadas. En la muestra oxidada se observó un péptido con m/z 2825.5, que corresponde al péptido de la Cys34 monocargado (m/z 2433.3) + 392.2 Da, lo cual es consistente con la adición de un átomo de oxígeno (16 Da) y una molécula de BCN-Bio1 (376.18 Da) (Figura 5.7, A). Cuando se fragmentó dicho péptido y se obtuvo el espectro de masa en tándem (MS/MS) se identificaron varios iones b e y que confirmaron que se trataba del péptido de la Cys34 modificado. Los iones b_{14} en adelante e y_8 en adelante se encontraron modificados (+ 392 Da), tal como se esperaba. Particularmente el y_7 (m/z 871.8), el último y que no presenta la modificación, y el y_8 (m/z 1367.2), el primero que sí la presenta, muestran que el aumento de + 392 Da corresponde a la reacción de HSA-SOH en la posición de la Cys34 con una molécula de BCN-Bio1. El pico mayoritario en el MS/MS tiene un m/z de 2399.8 (m/z 2825.5 - 424.6 Da) y coincide con una fragmentación a la altura del enlace C-S de la Cys34 y con la consecuente pérdida de SOH + BCN-Bio1 (49 Da + 376.18 Da) (Figura 5.7, B). Algo similar se observó en un trabajo de nuestro grupo en el que se estudió la formación de HSA-SO₂H por ESI, detectándose la presencia del b_{14} - 65 Da, es decir, con pérdida de SO₂H [106].

En cuanto al MS de la muestra reducida, no se observó el pico correspondiente al péptido de la Cys34 modificado (+ 392 Da), lo que muestra que, como era de esperar, no hay HSA-SOH en la muestra reducida. Tampoco se observó la modificación de dicho péptido + 376 Da que pudiera marcar la reacción inespecífica de HSA-SH con

una molécula de BCN-Bio1. La señal evidenciada por fluorescencia para esta muestra puede adjudicarse entonces, a pegado inespecífico no covalente en algún sitio de la molécula, que se suelte una vez tripsinizada la proteína. También puede haber modificación covalente de algún otro residuo de la proteína. La posición de esa posible modificación no fue analizada en este trabajo, pero se puede asegurar que no es en la Cys34 ya que de ser así debería haberse visto el péptido modificado (+ 392 o + 376 Da) en el espectro de masa.

En suma, la utilización de BCN-Bio1 como sonda de HSA-SOH fue exitosa. No solo se evidenció la formación del mismo por fluorescencia, sino también por espectrometría de masa. Esto sumado a las características de la sonda descritas en la introducción, hacen a esta sonda una herramienta prometedora para la detección de HSA-SOH en muestras de plasma fresco.

A



B

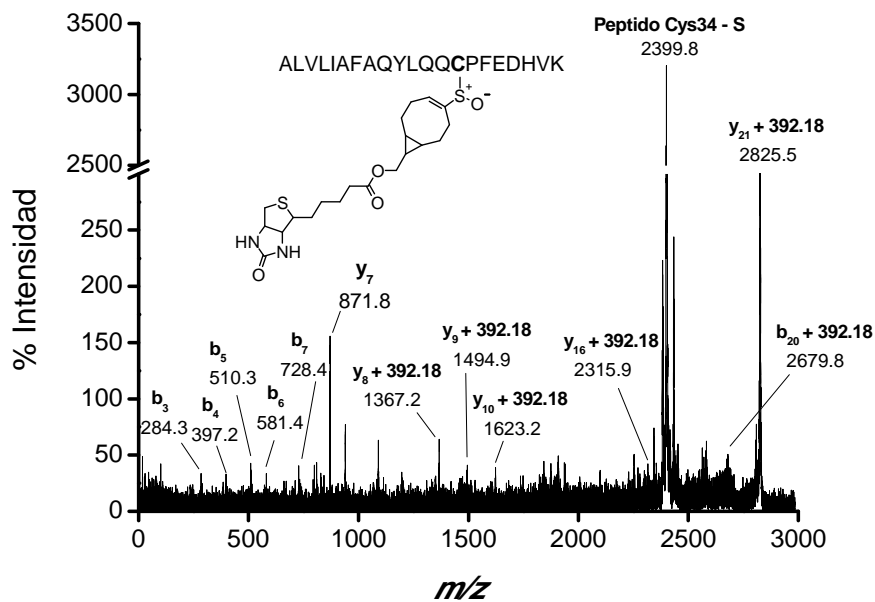


Figura 5.7. Análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF de HSA oxidada tratada con BCN-Bio1. Se trató HSA reducida (0.3 mM) con BCN-Bio1 (0.3 mM) y se oxidó con H_2O_2 en las condiciones usuales. La mezcla se incubó 1 h a 37 °C y se removió el exceso de sonda. Luego se incubó con tripsina (100:1) toda la noche a 37 °C. Se realizó un control con HSA reducida. (A) Se detectó el péptido monocargado que contiene a la Cys34 modificada con una molécula de BCN-Bio1 y un átomo de oxígeno (m/z 2433.26 + 392.2 Da). (B) MS/MS del péptido de m/z 2825.5 mostrando iones b e y .

6. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

Este trabajo se enfocó en la puesta a punto de las técnicas tendientes a la detección de ácido sulfénico en albúmina comercial para su futura aplicación en muestras de plasma fresco. La estrategia incluyó la utilización de sondas biotiniladas específicas para ácido sulfénico y posterior detección de la marca de biotina por fluorescencia. Se incluyó también el análisis de las muestras tratadas con la sonda por espectrometría de masa.

La utilización de DCP-Bio1, sonda derivada de la dimedona, en la detección de HSA-SOH, no fue exitosa probablemente como consecuencia de la lenta velocidad de reacción entre ambos, que no le permite competir con el decaimiento espontáneo del sulfénico. Sin embargo se logró validar el método de trabajo utilizando la peroxidasa de una cisteína, AhpE, y constatando la detección de AhpE-S-DCP-Bio1 mediante fluorescencia y espectrometría de masa de proteína entera.

La detección de HSA-SOH se logró utilizando la sonda derivada de un cicloalquino, BCN-Bio1. El rendimiento de la reacción obtenido por fluorescencia fue de 0.17 HSA-SOH/HSA, consistente con resultados previos de nuestro grupo utilizando TNB (0.18 ± 0.2 HSA-SOH/HSA). El análisis por espectrometría de masa de la proteína oxidada tratada con la sonda y tripsinizada, permitió confirmar que BCN-Bio1 efectivamente reacciona con HSA-SOH, formando el aducto esperado. Además el hecho de que BCN-Bio1 no reaccione con HSA-SH simplifica el análisis y es un buen indicador de la especificidad de esta sonda. Por último demostramos que esta sonda no interfiere con la absorbancia a 279 nm de la proteína.

En suma, los resultados obtenidos con BCN-Bio1 para la HSA comercial son alentadores y hacen de este cicloalquino biotinilado, una herramienta prometedora para la detección de HSA-SOH en muestras de plasma fresco. Dicho análisis se retomará durante mi posgrado.

7. REFERENCIAS

- [1] T. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, 1995.
- [2] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Eng.* 12 (1999) 439–446. doi:10.1093/protein/12.6.439.
- [3] P. Ascenzi, M. Fasano, Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin, *Biophys. Chem.* 148 (2010) 16–22. doi:10.1016/j.bpc.2010.03.001.
- [4] M.J. Torres, L. Turell, H. Botti, L. Antmann, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, et al., Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids, *Arch. Biochem. Biophys.* 521 (2012) 102–110. doi:10.1016/j.abb.2012.03.011.
- [5] P.E. Ballmer, M.A. McNurlan, E. Milne, S.D. Heys, V. Buchan, A.G. Calder, et al., Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes, *Am. J. Physiol.* 259 (1990) E797–803.
- [6] J.E. Schnitzer, P. Oh, Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 6072–6082.
- [7] Y. Iwao, M. Anraku, K. Yamasaki, U. Kragh-Hansen, K. Kawai, T. Maruyama, et al., Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta.* 1764 (2006) 743–749. doi:10.1016/j.bbapap.2006.01.011.
- [8] R. Bito, S. Hino, A. Baba, M. Tanaka, H. Watabe, H. Kawabata, Degradation of oxidative stress-induced denatured albumin in rat liver endothelial cells, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 289 (2005) C531–542. doi:10.1152/ajpcell.00431.2004.
- [9] J.E. Schnitzer, A. Sung, R. Horvat, J. Bravo, Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 24544–24553.
- [10] J.A.F. Tresguerres, *Fisiología humana*, McGraw-Hill Interamericana, 2005.
- [11] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J. Mol. Biol.* 353 (2005) 38–52. doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075.
- [12] L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 244–253. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050.
- [13] M. Taverna, A.-L. Marie, J.-P. Mira, B. Guidet, Specific antioxidant properties of human serum albumin, *Ann Intensive Care.* 3 (2013) 4. doi:10.1186/2110-5820-3-4.

- [14] C.M. Mendez, C.J. McClain, L.S. Marsano, Albumin Therapy in Clinical Practice, *Nutr Clin Pract.* 20 (2005) 314–320. doi:10.1177/0115426505020003314.
- [15] G.R. Haynes, R.J. Navickis, M.M. Wilkes, Albumin administration--what is the evidence of clinical benefit? A systematic review of randomized controlled trials, *Eur J Anaesthesiol.* 20 (2003) 771–793.
- [16] A.M. Merlot, S. Sahni, D.J.R. Lane, A.M. Fordham, N. Pantarat, D.E. Hibbs, et al., Potentiating the cellular targeting and anti-tumor activity of Dp44mT via binding to human serum albumin: two saturable mechanisms of Dp44mT uptake by cells, *Oncotarget.* (2015).
- [17] E. Nicolì, M.I. Syga, M. Bosetti, V.P. Shastri, Enhanced Gene Silencing through Human Serum Albumin-Mediated Delivery of Polyethylenimine-siRNA Polyplexes, *PLoS ONE.* 10 (2015) e0122581. doi:10.1371/journal.pone.0122581.
- [18] M. Dadparvar, S. Wagner, S. Wien, J. Kufleitner, F. Worek, H. von Briesen, et al., HI 6 human serum albumin nanoparticles--development and transport over an in vitro blood-brain barrier model, *Toxicol. Lett.* 206 (2011) 60–66. doi:10.1016/j.toxlet.2011.06.027.
- [19] M. Langiu, M. Dadparvar, J. Kreuter, M.O. Ruonala, Human serum albumin-based nanoparticle-mediated in vitro gene delivery, *PLoS ONE.* 9 (2014) e107603. doi:10.1371/journal.pone.0107603.
- [20] N. Sepehri, H. Rouhani, A.R. Ghanbarpour, M. Gharghabi, F. Tavassolian, M. Amini, et al., Human serum albumin conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN38) for cancer treatment, *Biomed Res Int.* 2014 (2014) 963507. doi:10.1155/2014/963507.
- [21] Z. Chen, Y. He, B. Shi, D. Yang, Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1830 (2013) 5515–5525. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.037.
- [22] Y. He, T. Ning, T. Xie, Q. Qiu, L. Zhang, Y. Sun, et al., Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (2011) 19078–19083. doi:10.1073/pnas.1109736108.
- [23] K. Ikegaya, M. Hirose, T. Ohmura, K. Nokihara, Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1986–1991.
- [24] H. Watanabe, K. Yamasaki, U. Kragh-Hansen, S. Tanase, K. Harada, A. Suenaga, et al., In vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1775–1781.
- [25] K. Kobayashi, Summary of recombinant human serum albumin development, *Biologicals.* 34 (2006) 55–59. doi:10.1016/j.biologicals.2005.08.021.
- [26] A. Kasahara, K. Kita, E. Tomita, J. Toyota, Y. Imai, H. Kumada, Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis: a multicenter clinical study, *J. Gastroenterol.* 43 (2008) 464–472. doi:10.1007/s00535-008-2178-5.

- [27] K. Ohnishi, A. Kawaguchi, S. Nakajima, H. Mori, T. Ueshima, A comparative pharmacokinetic study of recombinant human serum albumin with plasma-derived human serum albumin in patients with liver cirrhosis, *J Clin Pharmacol.* 48 (2008) 203–208. doi:10.1177/0091270007310549.
- [28] Turell, L, Ácido sulfénico en albúmina sérica humana. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Química, PEDECIBA Química, Universidad de la República, (2012).
- [29] Lombide, R, Expresión de albúmina sérica humana recombinante en *Pichia pastoris*. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, (2014).
- [30] V. Gupta, K.S. Carroll, Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime, *Biochim Biophys Acta.* 1840 (2014) 847–875. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.040.
- [31] G. Roos, J. Messens, Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 314–326. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031.
- [32] Banerjee, R., *Redox biochemistry*, Wiley Interscience, 2008.
- [33] H.J. Forman, J.M. Fukuto, M. Torres, Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287 (2004) C246–256. doi:10.1152/ajpcell.00516.2003.
- [34] Y. Wang, J. Yang, J. Yi, Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 649–657. doi:10.1089/ars.2011.4313.
- [35] A. Bindoli, J.M. Fukuto, H.J. Forman, Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 1549–1564. doi:10.1089/ars.2008.2063.
- [36] R. Wani, A. Nagata, B.W. Murray, Protein redox chemistry: post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology, *Front Pharmacol.* 5 (2014). doi:10.3389/fphar.2014.00224.
- [37] A. Miseta, P. Csutora, Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms, *Mol Biol Evol.* 17 (2000) 1232–1239.
- [38] B. Halliwell, *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*, in: eLS, John Wiley & Sons, Ltd, 2001. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/abstract> (accessed May 12, 2015).
- [39] C.C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 278–286. doi:10.1038/nchembio.85.
- [40] J.M. Hansen, Y.-M. Go, D.P. Jones, Nuclear and Mitochondrial Compartmentation of Oxidative Stress and Redox Signaling, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 46 (2006) 215–234. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141122.
- [41] M.J. Davies, The oxidative environment and protein damage, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 1703 (2005) 93–109. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.007.

- [42] J.L. Kice, Mechanisms and Reactivity in Reactions of Organic Oxyacids of Sulfur and their Anhydrides, in: V.G. and D. Bethell (Ed.), *Advances in Physical Organic Chemistry*, Academic Press, 1981: pp. 65–181.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065316008601288> (accessed May 12, 2015).
- [43] K.G. Reddie, K.S. Carroll, Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation, *Curr Opin Chem Biol.* 12 (2008) 746–754. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.028.
- [44] K. Oettl, G. Marsche, Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease, *Meth. Enzymol.* 474 (2010) 181–195. doi:10.1016/S0076-6879(10)74011-8.
- [45] L. Turell, H. Botti, S. Carballal, R. Radi, B. Alvarez, Sulfenic acid—a key intermediate in albumin thiol oxidation, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 3384–3392. doi:10.1016/j.jchromb.2009.03.035.
- [46] L. Turell, H. Botti, L. Bonilla, M.J. Torres, F. Schopfer, B.A. Freeman, et al., HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 944 (2014) 144–151. doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.019.
- [47] A.J. Stewart, C.A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth, P.J. Sadler, Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin, *FEBS J.* 272 (2005) 353–362. doi:10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x.
- [48] B. Alvarez, G. Ferrer-Sueta, B.A. Freeman, R. Radi, Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 842–848.
- [49] T.K. Harris, G.J. Turner, Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites, *IUBMB Life.* 53 (2002) 85–98. doi:10.1080/15216540211468.
- [50] C.C. Winterbourn, D. Metodiewa, Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 322–328.
- [51] B. Manta, M. Hugo, C. Ortiz, G. Ferrer-Sueta, M. Trujillo, A. Denicola, The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2, *Arch. Biochem. Biophys.* 484 (2009) 146–154. doi:10.1016/j.abb.2008.11.017.
- [52] H. Fraenkel-Conrat, The Reaction of Tobacco Mosaic Virus with Iodine, *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 373–382.
- [53] A. Zeida, R. Babbush, M.C.G. Lebrero, M. Trujillo, R. Radi, D.A. Estrin, Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the SN2 paradigm, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 741–746. doi:10.1021/tx200540z.
- [54] L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne, Protein sulfenic acids in redox signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 325–347. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121735.
- [55] N.J. Kettenhofen, M.J. Wood, Formation, reactivity, and detection of protein sulfenic acids, *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) 1633–1646. doi:10.1021/tx100237w.

- [56] P. Nagy, M.T. Ashby, Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the oxidation of cysteine by hypohalous acid to give cysteine sulfenic acid, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 14082–14091. doi:10.1021/ja0737218.
- [57] A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, T.-C. Meng, J.A. Hinks, N.K. Tonks, et al., Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate, *Nature*. 423 (2003) 769–773. doi:10.1038/nature01680.
- [58] L.A. Defelipe, E. Lanzarotti, D. Gauto, M.A. Marti, A.G. Turjanski, Protein topology determines cysteine oxidation fate: the case of sulfenyl amide formation among protein families, *PLoS Comput. Biol.* 11 (2015) e1004051. doi:10.1371/journal.pcbi.1004051.
- [59] A. Claiborne, H. Miller, D. Parsonage, R.P. Ross, Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation., *FASEB J.* 7 (1993) 1483–1490.
- [60] B. Biteau, J. Labarre, M.B. Toledano, ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin, *Nature*. 425 (2003) 980–984. doi:10.1038/nature02075.
- [61] A. Claiborne, J.I. Yeh, T.C. Mallett, J. Luba, E.J. Crane, V. Charrier, et al., Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation, *Biochemistry*. 38 (1999) 15407–15416.
- [62] J.M. Denu, K.G. Tanner, Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation, *Biochemistry*. 37 (1998) 5633–5642. doi:10.1021/bi973035t.
- [63] J.J. Tanner, Z.D. Parsons, A.H. Cummings, H. Zhou, K.S. Gates, Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 77–97. doi:10.1089/ars.2010.3611.
- [64] G. Ferrer-Sueta, B. Manta, H. Botti, R. Radi, M. Trujillo, A. Denicola, Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 434–450. doi:10.1021/tx100413v.
- [65] M. Fuangthong, J.D. Helmann, The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 6690–6695. doi:10.1073/pnas.102483199.
- [66] C.E. Paulsen, T.H. Truong, F.J. Garcia, A. Homann, V. Gupta, S.E. Leonard, et al., Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 57–64. doi:10.1038/nchembio.736.
- [67] T.H. Truong, K.S. Carroll, Redox regulation of epidermal growth factor receptor signaling through cysteine oxidation, *Biochemistry*. 51 (2012) 9954–9965. doi:10.1021/bi301441e.
- [68] M. Zheng, F. Aslund, G. Storz, Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science*. 279 (1998) 1718–1721.

- [69] L.-H. Ma, C.L. Takanishi, M.J. Wood, Molecular mechanism of oxidative stress perception by the Orp1 protein, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 31429–31436. doi:10.1074/jbc.M705953200.
- [70] D.S. Rehder, C.R. Borges, Cysteine sulfenic acid as an intermediate in disulfide bond formation and nonenzymatic protein folding, *Biochemistry.* 49 (2010) 7748–7755. doi:10.1021/bi1008694.
- [71] D. Ramadan, P.C. Rancy, R.P. Nagarkar, J.P. Schneider, C. Thorpe, Arsenic(III) species inhibit oxidative protein folding in vitro, *Biochemistry.* 48 (2009) 424–432. doi:10.1021/bi801988x.
- [72] J.I. Yeh, A. Claiborne, W.G. Hol, Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution, *Biochemistry.* 35 (1996) 9951–9957. doi:10.1021/bi961037s.
- [73] E.J. Crane, J. Vervoort, A. Claiborne, ¹³C NMR analysis of the cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase, *Biochemistry.* 36 (1997) 8611–8618. doi:10.1021/bi9707990.
- [74] C.B. Poor, P.R. Chen, E. Duguid, P.A. Rice, C. He, Crystal structures of the reduced, sulfenic acid, and mixed disulfide forms of SarZ, a redox active global regulator in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23517–23524. doi:10.1074/jbc.M109.015826.
- [75] S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsselear, G. Branlant, A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35908–35913. doi:10.1074/jbc.M006137200.
- [76] K. Kaiserova, S. Srivastava, J.D. Hoetker, S.O. Awe, X.-L. Tang, J. Cai, et al., Redox activation of aldose reductase in the ischemic heart, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 15110–15120. doi:10.1074/jbc.M600837200.
- [77] C.L. Takanishi, L.-H. Ma, M.J. Wood, A Genetically Encoded Probe for Cysteine Sulfenic Acid Protein Modification in Vivo[†], *Biochemistry.* 46 (2007) 14725–14732. doi:10.1021/bi701625s.
- [78] C.L. Takanishi, M.J. Wood, A Genetically Encoded Probe for the Identification of Proteins that Form Sulfenic Acid in Response to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 2715–2724. doi:10.1021/pr1009542.
- [79] C.M. Furdui, L.B. Poole, Chemical approaches to detect and analyze protein sulfenic acids, *Mass Spectrom Rev.* 33 (2014) 126–146. doi:10.1002/mas.21384.
- [80] L.B. Poole, A. Claiborne, The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine-sulfenic acid, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12330–12338.
- [81] L.B. Poole, H.R. Ellis, Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase, *Meth. Enzymol.* 348 (2002) 122–136.

- [82] L.B. Poole, K.J. Nelson, Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation, *Curr Opin Chem Biol.* 12 (2008) 18–24. doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.021.
- [83] H.R. Ellis, L.B. Poole, Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*, *Biochemistry.* 36 (1997) 13349–13356. doi:10.1021/bi9713658.
- [84] A.A. Aboderin, E. Boedefeld, Reaction of chicken egg white lysozyme with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. II. Sites of modification, *Biochim. Biophys. Acta.* 420 (1976) 177–186.
- [85] D.J. Birkett, N.C. Price, G.K. Radda, A.G. Salmon, The reactivity of SH groups with a fluorogenic reagent, *FEBS Lett.* 6 (1970) 346–348.
- [86] H.R. Ellis, L.B. Poole, Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase, *Biochemistry.* 36 (1997) 15013–15018. doi:10.1021/bi972191x.
- [87] R. Radi, K.M. Bush, T.P. Cosgrove, B.A. Freeman, Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma, *Arch. Biochem. Biophys.* 286 (1991) 117–125.
- [88] A.T. Saurin, H. Neubert, J.P. Brennan, P. Eaton, Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 17982–17987. doi:10.1073/pnas.0404762101.
- [89] L.V. Benitez, W.S. Allison, The Inactivation of the Acyl Phosphatase Activity Catalyzed by the Sulfenic Acid Form of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase by Dimedone and Olefins, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 6234–6243.
- [90] W.S. Willett, S.D. Copley, Identification and localization of a stable sulfenic acid in peroxide-treated tetrachlorohydroquinone dehalogenase using electrospray mass spectrometry, *Chem. Biol.* 3 (1996) 851–857.
- [91] S. Carballal, R. Radi, M.C. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman, B. Alvarez, Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite, *Biochemistry.* 42 (2003) 9906–9914. doi:10.1021/bi027434m.
- [92] M.E. Conway, L.B. Poole, S.M. Hutson, Roles for cysteine residues in the regulatory CXXC motif of human mitochondrial branched chain aminotransferase enzyme, *Biochemistry.* 43 (2004) 7356–7364. doi:10.1021/bi0498050.
- [93] Y.H. Seo, K.S. Carroll, Profiling protein thiol oxidation in tumor cells using sulfenic acid-specific antibodies, *PNAS.* 106 (2009) 16163–16168. doi:10.1073/pnas.0903015106.
- [94] L.B. Poole, B.-B. Zeng, S.A. Knaggs, M. Yakubu, S.B. King, Synthesis of chemical probes to map sulfenic acid modifications on proteins, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 1624–1628. doi:10.1021/bc050257s.
- [95] L.B. Poole, C. Klomsiri, S.A. Knaggs, C.M. Furdai, K.J. Nelson, M.J. Thomas, et al., Fluorescent and affinity-based tools to detect cysteine sulfenic acid formation in proteins, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 2004–2017. doi:10.1021/bc700257a.

- [96] R.L. Charles, E. Schröder, G. May, P. Free, P.R.J. Gaffney, R. Wait, et al., Protein sulfenation as a redox sensor: proteomics studies using a novel biotinylated dimedone analogue, *Mol. Cell Proteomics*. 6 (2007) 1473–1484. doi:10.1074/mcp.M700065-MCP200.
- [97] C. Klomsiri, K.J. Nelson, E. Bechtold, L. Soito, L.C. Johnson, W.T. Lowther, et al., Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins, *Meth. Enzymol.* 473 (2010) 77–94. doi:10.1016/S0076-6879(10)73003-2.
- [98] K.J. Nelson, C. Klomsiri, S.G. Codreanu, L. Soito, D.C. Liebler, L.C. Rogers, et al., Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection methods to visualize and identify labeled proteins, *Meth. Enzymol.* 473 (2010) 95–115. doi:10.1016/S0076-6879(10)73004-4.
- [99] S.E. Leonard, K.G. Reddie, K.S. Carroll, Mining the Thiol Proteome for Sulfenic Acid Modifications Reveals New Targets for Oxidation in Cells, *ACS Chem. Biol.* 4 (2009) 783–799. doi:10.1021/cb900105q.
- [100] A.H. Fauq, R. Kache, M.A. Khan, I.E. Vega, Synthesis of Acid-Cleavable Light Isotope-Coded Affinity Tags (ICAT-L) for Potential Use in Proteomic Expression Profiling Analysis, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 248–254. doi:10.1021/bc0503059.
- [101] J. Szychowski, A. Mahdavi, J.J.L. Hodas, J.D. Bagert, J.T. Ngo, P. Landgraf, et al., Cleavable Biotin Probes for Labeling of Biomolecules via Azide–Alkyne Cycloaddition, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 18351–18360. doi:10.1021/ja1083909.
- [102] J. Yang, V. Gupta, K.S. Carroll, D.C. Liebler, Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells, *Nat Commun.* 5 (2014) 4776. doi:10.1038/ncomms5776.
- [103] T.H. Poole, J.A. Reisz, W. Zhao, L.B. Poole, C.M. Furdui, S.B. King, Strained cycloalkynes as new protein sulfenic acid traps, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 6167–6170. doi:10.1021/ja500364r.
- [104] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman, Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide., *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4244–4250.
- [105] E.G. DeMaster, B.J. Quast, B. Redfern, H.T. Nagasawa, Reaction of Nitric Oxide with the Free Sulfhydryl Group of Human Serum Albumin Yields a Sulfenic Acid and Nitrous Oxide, *Biochemistry.* 34 (1995) 11494–11499. doi:10.1021/bi00036a023.
- [106] L. Turell, H. Botti, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, J.M. Souza, R. Durán, et al., Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin, *Biochemistry.* 47 (2008) 358–367. doi:10.1021/bi701520y.
- [107] B. Alvarez, S. Carballal, L. Turell, R. Radi, Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin, *Meth. Enzymol.* 473 (2010) 117–136. doi:10.1016/S0076-6879(10)73005-6.
- [108] N.A. Kratochwil, A.I. Ivanov, M. Patriarca, J.A. Parkinson, A.M. Gouldsworthy, P. del Socorro Murdoch, et al., Surprising Reactions of Iodo Pt(IV) and Pt(II) Complexes with

- Human Albumin: Detection of Cys34 Sulfenic Acid, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 8193–8203. doi:10.1021/ja990768n.
- [109] Claiborne, A., *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Catalase activity, in: CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1985.
- [110] H. Aebi, [13] Catalase in vitro, in: L. Packer (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1984: pp. 121–126.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163> (accessed June 15, 2015).
- [111] R.F. Chen, Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Charcoal Treatment, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 173–181.
- [112] C.K. Riener, G. Kada, H.J. Gruber, Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine, *Anal Bioanal Chem.* 373 (2002) 266–276. doi:10.1007/s00216-002-1347-2.
- [113] A.M. Reyes, M. Hugo, A. Trostchansky, L. Capece, R. Radi, M. Trujillo, Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 464–473. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023.
- [114] Molecular Probes. FluoReporter Biotin Quantitation Assay Kit *for biotinylated proteins*. Product Information, (2005).
- [115] M. Hugo, L. Turell, B. Manta, H. Botti, G. Monteiro, L.E.S. Netto, et al., Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics, *Biochemistry.* 48 (2009) 9416–9426. doi:10.1021/bi901221s.

8. AGRADECIMIENTOS

A Beatriz por abrirme las puertas del laboratorio, por confiar en mí y por la paciencia que me tuvo desde el primer día. A Lucía por la dedicación y disposición constante a la hora de despejar dudas, discutir resultados y planificar nuevos experimentos, siempre mirando el lado positivo de todos los resultados, de los “felices” y de los “no tan felices”. Gracias a ambas por transmitirme su pasión, por permitirme progresar y por todo lo que me han enseñado en estos dos años.

A los integrantes de los laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica, los que siguen y los que se fueron: Mara, Joaco, Flor. A, Ernest, Mati. M, Wilson, Mati. D, Lau, Dayana, Camila, Leonor, Lía, Rodrigo, Ana, Ceci, Nico, Stephanie, Silvina, Mayala, Lourdes y Bruno. Gracias a todos por hacer del laboratorio un lugar cálido y divertido, de trabajo y aprendizaje. Quiero agradecer especialmente a Gerardo por presentarme la oportunidad de entrar en el laboratorio y por darme la confianza necesaria para emprender esta etapa.

A Madia Trujillo, Marcelo Reyes y Mauricio Mastrogiovani por la ayuda brindada en la instancia de la AhpE que fue crucial en este trabajo. También a Rosario Durán y Madelón Portela que nos permitieron participar del análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF.

A mi familia: mi Madre y mi Padre, mis abuelos Mamina y Papo, y mis hermanos, Pipi y Guz, que me acompañaron durante toda mi vida, apoyándome en cada etapa. Muy especialmente Rodri que ha bancado todas y cada una de mis locuras estudiantiles y con quien he crecido tanto. A todos ellos, de verdad, gracias, gracias y más gracias!!

A mis amigos de la carrera, muchos de ellos ya amigos de la vida. Lau, Mauri, Guille, Nané, Dani, Peti, Santi, por nombrar algunos. En particular a Lau en quien encontré mi compañera perfecta de estudio y con quien tuve la suerte de compartir, y de seguir compartiendo, días enteros de estudio, mates y salidas.

Finalmente, gracias a la ANII por la Beca de Iniciación a la Investigación otorgada en el marco de este trabajo y a la CSIC por financiar los proyectos (I+D y grupos) en los cuales se enmarcó este trabajo.