



## Identificación de una triparedoxina peroxidasa citoplasmática en *Leishmania braziliensis*

### Resumen

Los sistemas de defensa anti-oxidante utilizados por el parásito intracelular *Leishmania braziliensis* durante el proceso de infección permiten eliminar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno a expensas de equivalentes reductores derivados de la tripanotona, evitando daños celulares del patógeno. Con el objetivo de identificar potenciales blancos moleculares para el desarrollo de fármacos contra este parásito, se realizó la detección de la enzima triparedoxina peroxidasa citoplasmática de *L. braziliensis* (LbTXNPxII), la cual es esencial para disminuir concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno en el contexto de infección. Para esto se generaron anticuerpos policlonales en modelo aviar, partiendo de la clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII (37kDa) en el sistema heterólogo *Escherichia coli*. La proteína purificada se utilizó como antígeno para la producción de anticuerpos IgY, cuya implementación en estudios *in situ* permitió detectar y localizar la enzima LbTXNPxII endógena (22kDa) en el citoplasma de promastigotes fijados y verificar su interacción molecular con la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa, enzima involucrada en la síntesis del NAD. De este modo, se reporta el desarrollo de una herramienta bioquímica para la identificación y estudio de la enzima LbTXNPxII y su participación en vías del metabolismo energético y de defensa anti-oxidante.

**Palabras clave:** anticuerpos policlonales IgY; interacción proteína-proteína; *Leishmania braziliensis*; localización celular; Triparedoxina peroxidasa.

## Identification of a cytoplasmic tryparedoxin peroxidase from *Leishmania braziliensis*

### Abstract

The antioxidant defense systems used by the intracellular parasite *Leishmania braziliensis* during the infection process make it possible to eliminate reactive oxygen and nitrogen species at the expense of reducing equivalents derived from trypanothione, avoiding cellular damage of the pathogen. In order to identify potential molecular targets for the development of drugs against this parasite, the cytoplasmic tryparedoxin peroxidase of *L. braziliensis* (LbTXNPxII), which is essential to reduce toxic concentrations of hydrogen peroxide in the context of infection, was carried out. In this regard, polyclonal antibodies were generated in an avian model, starting from the cloning, expression, and purification of the recombinant protein 6xHis-SUMO-LbTXNPxII (37kDa) in the heterologous system of *Escherichia coli*. The purified protein was used as an antigen for the production of IgY antibodies, whose implementation in *in situ* experiments allowed the detection and localization of the endogenous LbTXNPxII enzyme (22kDa) in the cytoplasm of fixed promastigotes, as well as the verification of its molecular interaction with nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of NAD. Thus, the development of a biochemical tool for the identification and study of the LbTXNPxII enzyme and its participation in energy metabolism and antioxidant defense pathways is reported.

**Keywords:** IgY polyclonal antibodies; *Leishmania braziliensis*; protein-protein interaction; subcellular localization; Tryparedoxin peroxidase

## Identificação de uma triparedoxina peroxidase citoplasmática de *Leishmania braziliensis*

### Resumo

Os sistemas de defesa antioxidante utilizados pelo parasita intracelular *Leishmania braziliensis* durante o processo de infecção, permitem a eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em detrimento de equivalentes reductores derivados de tripanotona, evitando o dano celular do patógeno. Com o objetivo de identificar potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas contra esse parasita, foi detectada a enzima citoplasmática triparedoxina peroxidase de *L. braziliensis* (LbTXNPxII), essencial para reduzir as concentrações tóxicas de peróxido de hidrogênio no contexto de infecção. Para isso, anticorpos policlonais foram gerados em modelo aviário, a partir da clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII (37kDa) no sistema heterólogo de *Escherichia coli*. A proteína purificada foi utilizada como antígeno para a produção de anticorpos IgY, cuja implementação em experimentos *in situ* permitiu a detecção e localização da enzima LbTXNPxII endógena (22kDa) no citoplasma de promastigotas fixos e verificar sua interação molecular com nicotinamida/nicotinato mononucleotídeo adenililtransferase, enzima envolvida na síntese de NAD. Assim, é relatado o desenvolvimento de uma ferramenta bioquímica para a identificação e estudo da enzima LbTXNPxII e sua participação no metabolismo energético e nas vias de defesa antioxidante.

**Palavras-chave:** Anticorpos policlonais IgY; interação proteína-proteína; *Leishmania braziliensis*; localização celular; Triparedoxina peroxidase



## Introducción

Los organismos tripanosomátidos del género *Leishmania* corresponden al agente causal de la Leishmaniasis, enfermedad parasitaria de gran incidencia a nivel mundial. Colombia, debido a sus características biogeográficas, resulta fuertemente afectado por estos parásitos intracelulares, encontrándose 9 de las 21 especies asociadas a la enfermedad [1]. Existen tres formas clínicas principales de esta parasitemia según la especie del parásito involucrado, factores genéticos y la respuesta inmune del hospedero [2]. Dentro de estas formas se destacan lesiones cutáneas que afectan la piel de manera local o difusa provocadas principalmente por *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*; lesiones desfigurantes o mucocutáneas causadas por *L. braziliensis* y *L. panamensis*; o viscerales, afectando el hígado, bazo y/o médula ósea producidas por *L. donovani* y *L. infantum* [3], [4].

Estos microorganismos se caracterizan por presentar un ciclo de vida complejo denominado digénico en el cual alterna entre un hospedero invertebrado, con función de vector, y uno vertebrado como residente final. El ciclo comienza cuando el insecto díptero hematófago transmite la forma promastigote al hospedero vertebrado durante la picadura, ingiriendo sangre e inyectando el parásito. Al ingresar al torrente sanguíneo, los protozoarios en estado promastigote son engullidos por macrófagos y células dendríticas del sistema inmune, donde se transforman en amastigotes y se multiplican por fisión binaria (reproducción asexual) dentro del compartimento fagolisosómico hasta la ruptura de las células, aumentando así la propagación e infección [5]. Dentro del vector los amastigotes migran al intestino medio donde se promueve su diferenciación en promastigotes que se ubican finalmente en las glándulas salivales del insecto para ser transmitidos nuevamente [3].

Numerosos acercamientos terapéuticos a esta enfermedad se han desarrollado en todo el mundo; sin embargo, hasta el momento ninguno ha exhibido alta eficiencia, por el contrario, se resalta la presencia de numerosos efectos secundarios tales como mialgia, artralgia, cefalea, fiebre, convulsiones, anorexia, náuseas, nefrotoxicidad y ototoxicidad, entre muchas otras [6]. Adicionalmente, en ocasiones se combinan medicamentos para combatir esta enfermedad, resultando en costos excesivos y aparición de cepas resistentes [4], [7].

Durante la etapa de infección, cuando el promastigote es fagocitado por los macrófagos, la célula hospedera genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (RNI) con el fin de establecer condiciones desfavorables para el desarrollo de la infección, estos compuestos resultan tóxicos para los parásitos, cuya capacidad para combatirlos determina el éxito y la persistencia de la enfermedad [8], [9]. Para evitar el daño celular provocado por estas moléculas, los tripanosomátidos poseen peroxidases con un característico puente disulfuro; estas enzimas usan equivalentes reductores derivados de la tripanotona, una forma inusual de glutatión que se encuentra exclusivamente en estos protozoos [10]. En la cascada TR-TXN-TXNPx la transferencia de electrones ocurre entre la tripanotona reductasa (TR), una flavoproteína perteneciente a la familia de las oxidorreductasas dependientes de NADPH y la triparedoxina (TXN) para la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) por la triparedoxina peroxidasa (TXNPx), siendo la enzima terminal en este sistema antioxidante [11], [13].

La triparedoxina peroxidasa (TXNPx) pertenece a la familia de las 2Cys peroxidoxinas que poseen dos cisteínas (Cys) distintivas en la posición 52 y 173; estas enzimas exhiben características conservadas en todos los reinos con al menos 30% de identidad de secuencia y pueden agruparse de acuerdo con su compartimentación en el citosol o las mitocondrias [9], [14]. La TXNPx es indispensable para la supervivencia del parásito puesto que se encarga de la detoxificación primaria de  $H_2O_2$ , una amplia gama de hidroperóxidos orgánicos y, en algunos casos, ONOO<sup>-</sup>, un componente esencial del principal sistema de captación enzimática para ROS y RNI en tripanosomátidos [15]. La acción combinada de la TXNPx con enzimas antioxidantes es crucial para el mantenimiento de una baja concentración de  $H_2O_2$ , regulando el estrés oxidativo y nitrosativo a través del desplazamiento

de equivalentes reductores desde el NADPH hacia hidroperóxidos y peroxinitritos [12].

La importancia bioquímica de la TXNPx ha impulsado diversos estudios acerca de su inhibición como estrategia contra la Leishmaniasis. Entre estos estudios se incluyen aproximaciones *in silico* basados en la construcción de modelos 3D de la enzima de *L. braziliensis* y su posterior acople molecular con inhibidores de tipo flavonoide como quercitina y taxifolina, los cuales afectan a nivel bioinformático a la enzima [16]. En términos experimentales, la estructura de la TXNPx de *L. major* se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X, permitiendo comprender las características estructurales de la enzima y los mecanismos moleculares de reducción del  $H_2O_2$ . Inclusive, estos estudios revelaron la existencia de epítopes antigénicos que permiten proponer la potencial implementación vacunal de la TXNPx [17].

Por otra parte, estudios genéticos han demostrado la importancia del sistema TR-TXN-TXNPx para el desarrollo y virulencia de estos parásitos [8], convirtiendo a las proteínas involucradas en posibles y potenciales objetivos moleculares para el desarrollo de fármacos de control parasitario. Por esta razón, el objetivo principal del presente trabajo se enfocó en la detección de la enzima triparedoxina peroxidasa citosólica de *L. braziliensis* (LbTXNPxII) y sus posibles interacciones moleculares con rutas metabólicas de síntesis de NAD<sup>+</sup>. Tal propósito requirió la clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII para producir anticuerpos policlonales aviares usados en la inmunodetección de la LbTXNPxII.

## Materiales y métodos

### Construcción del vector recombinante pET SUMO-LbTXNPxII

Apartir del ADN genómico de *L. braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904) previamente obtenido mediante el método de la proteinasa K y utilizando oligonucleótidos directo (5'-TGTCTGCGGTGACGCCAAAATG-3') y reverso (5'-TACTGCTTGTGAAGTAGCCCTCAA-3') (Integrated DNA Technologies), se amplificó la secuencia que codifica la triparedoxina peroxidasa (ID: 5414074) [18] empleando la enzima Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*) producida y purificada "in house" y el termociclador Veriti 96-Well [19]. La región codificante amplificada se clonó en el vector de expresión bacteriano pET SUMO (Thermo Fisher) según especificaciones del manual [20]; los plásmidos extraídos mediante lisis alcalina de clones positivos se evaluaron mediante PCR [21] y corte con enzimas de restricción BamHI y EcoRV (Fermentas) [22].

### Producción de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII en el sistema heterólogo *E. coli*

Células BL21 (DE3) (Invitrogen) se transformaron mediante choque térmico con el plásmido recombinante pET SUMO-LbTXNPxII [23]. Se permitió su crecimiento en medio Luria Broth (LB) (VWR Life Science) suplementado con kanamicina 50 µg/mL (Merck) a 37 °C en agitación constante (140 rpm) hasta alcanzar O.D.600 nm de 0,6 en incubadora con agitación (LabTech); la expresión se indujo con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich) a concentración final de 1,0 mM. Luego de 4 h el cultivo se centrifugó (Thermo Heraeus Megafuge 16R) a 7000 rpm durante 10 min, el pellet se resuspendió en buffer de lisis pET (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, tritón X-100 0,5% e imidazol 10 mM) [20], lisozima (Invitrogen) a concentración final de 1 µg/mL e inhibidor de proteasas (1:400) (Sigma P8340), permitiendo interacción de 1 h a 4 °C en agitación. Finalmente,

las células se sonicaron (3 min con amplitud 50% y pulsos de 15 s) (Sonic VibraCell) y las fases se separaron por centrifugación (12000 rpm, 20 min).

La expresión de la proteína recombinante se evaluó mediante electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) utilizando el sistema MGX-402 (CBS Scientific). Se trató una alícuota de las muestras (totales, solubles e insolubles) resuspendiéndolas con buffer carga 6X (tris HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol 30%, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 33% y azul de bromofenol 0,4 mg/mL) en relación 1:5 y desnaturizándolas a 92 °C por 10 min. Se utilizaron geles de poliacrilamida discontinuos de gel separador al 12% (acrilamida 30% Merck: 29 g acrilamida + 1 g bisacrilamida [Promega]) y gel concentrador al 4% (acrilamida 30%: 29 g acrilamida + 1 g bisacrilamida). Las muestras se separaron a 100 V constantemente, siendo visualizadas con azul de Coomassie G250: tiñendo el gel por 45 min y luego decolorando en solución de ácido acético (99%) y 2-propanol (99%) en proporción 1:1. Con el fin de realizar la identificación de la proteína expresada mediante *Western blot*, y aprovechando la etiqueta 6xHis provista por el vector, las muestras provenientes del cultivo celular se separaron por SDS-PAGE y se electrotransferieron hacia membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific) en buffer de transferencia (tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 10%, pH 8,3) a 200 mA durante 2 h en el sistema EBX-700 (CBS Scientific) [24]. La membrana se bloqueó con TBS-T leche 5% (tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1%) durante 2 h. Seguidamente, se adicionó el anticuerpo primario  $\alpha$ 6xHis-mouse (1:5000) (Abcam) preparado en TBS-T, permitiendo su interacción con la membrana por 2 h, luego se agregó el anticuerpo secundario  $\alpha$ mouse-fosfatasa alcalina (1:10000) (Invitrogen) preparado en TBS-T durante 1 h y, finalmente, se reveló con 16,5  $\mu$ L NBT (S380C Promega) y 16,5  $\mu$ L NBCIP (S381C Promega) en 5 mL de buffer sustrato fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM y  $MgCl_2$  1 mM), la reacción se detuvo con  $H_2O$ . En cada paso la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T [25]. Se utilizó marcador de peso molecular (Thermo Scientific 26610) y tanto geles como membranas se foto-documentaron con el sistema Gel Doc XR (BioRad).

## Purificación de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) y desde cuerpos de inclusión

La proteína 6xHis-SUMO-LbTXNPxII expresada posee una etiqueta de histidinas (6xHis) en su extremo N-terminal que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando metales inmovilizados (IMAC), los cuales son capaces de unirse específicamente a esta etiqueta [26]. Se utilizó resina de níquel y ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) con soporte de agarosa (Quiagen) de la cual se tomaron 100  $\mu$ L por cada 1 mL de fracción soluble a purificar. La resina se equilibró con buffer de lisis pET (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 0,5% e imidazol 10 mM). Luego, se permitió la interacción de esta con la fracción soluble durante 1 h a 4 °C en agitación constante; posteriormente, se cargó una columna de cromatografía recogiendo por gravedad las diferentes fracciones. En primer lugar, se recogieron “las proteínas no unidas”; seguido, se realizaron lavados con 6 volúmenes de buffer de lisis pET suplementado con imidazol (Sigma Aldrich) en concentraciones crecientes (35, 75 y 150 mM). Finalmente, la proteína recombinante unida a la resina se eluyó aumentando la concentración de imidazol a 300 mM [27]. Los eluidos recolectados se cuantificaron por el método de Bradford (0,1 mg/mL Coomassie G-250 en ácido ortofosfórico 8,5%) con albumina de suero bovino (BSA) (Merck) como patrón; se preparó una curva de calibración con seis patrones en concentraciones de 0 a 1 mg/mL. De cada patrón se tomaron 20  $\mu$ L y se mezclaron con 980  $\mu$ L de reactivo de Bradford, las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente en oscuridad, luego se registraron medidas espectrofotométricas a

595 nm (JenWay 7315) [28]; adicionalmente, el proceso y la pureza de las muestras se corroboraron mediante SDS-PAGE 12% y *Western blot*.

Los cuerpos de inclusión, contenidos en la fracción insoluble de la lisis, se purificaron por SDS-PAGE preparativo al 12%. Inicialmente se homogenizaron las fracciones insolubles con buffer de lavado 1 (tris-HCl 100 mM pH 7,0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, Urea 2 M y Triton X-100 al 2 %), luego se centrifugó (Jouan GR2022) a 12000 rpm durante 30 min, repitiendo este proceso 3 veces. Nuevamente el pellet se homogenizó con buffer de lavado 2 (tris-HCl 100 mM pH 7,0, EDTA 5 mM y DTT 5 mM) y se centrifugó; finalmente se repitió el proceso con el buffer de extracción (tris-HCl 50 mM pH 7,0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM y guanidina-HCl 8 M) centrifugando esta vez a 14000 rpm durante 1 h. El sobrenadante se recuperó y dializó a 4 °C durante 16 h en buffer tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM, empleando una membrana de 10 kDa (MWCO, Molecular Weight Cut-Off). Mediante centrifugación a 12000 rpm por 20 min se recuperó la proteína dializada, la cual se desnaturizó (90 °C) y analizó en un gel preparativo (SDS-PAGE 20x20 cm) utilizando marcador preteñido (Opti-Protein Marker, ABM) para realizar el corte de la banda desde el gel según el peso molecular esperado para la proteína recombinante (37 kDa). La banda de gel retirada se maceró y se sometió a elución con agua MilliQ a 37 °C en agitación constante durante 12 h. La muestra se centrifugó a 5000 rpm por 10 min, recuperando el sobrenadante. Los eluidos recolectados se cuantificaron por el método de Bradford y el proceso se monitorizó por SDS-PAGE 12% y *Western blot*.

## Producción de anticuerpos policlonales $\alpha$ 6xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY en modelo aviar

La proteína 6xHis-SUMO-LbTXNPxII purificada se utilizó para la inmunización de gallinas Hy-Line Brown de 35 semanas en el centro de investigaciones avícolas de la Facultad de medicina veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, bajo las condiciones de mantenimiento estándar para el trabajo animal. Monitorizando, de igual manera, un individuo control que se inoculó con PBS 1X (buffer fosfato salino). Las condiciones de inmunización utilizadas han sido reportadas en la literatura y estandarizadas en el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica – LIBBIQ [29]. La primera inoculación se realizó homogenizando con vortex a velocidad 8 (Vortex Genie 2, VWR Scientific) la proteína antígeno (150  $\mu$ g) con adyuvante completo de Freund en relación 1:1, esto por vía intramuscular (día 0) y, luego, se realizaron tres posteriores refuerzos: el primero post-15 d y los siguientes con intervalos de 8 d, inoculando el antígeno con adyuvante incompleto (relación 1:1) [30] (Tabla 1). En cada caso se inocularon 300  $\mu$ L de homogenizado. Igualmente, desde el día cero se recolectaron los huevos y muestras de sangre periférica para analizar sueros preinmunes e inmunes posteriores a cada inoculación [31].

**Tabla 1.** Esquema de inmunización de gallinas para la obtención de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína LbTXNPxII.

Día	$\alpha$ 6xHis-SUMO-LbTXNPxII				Control			
	0	15	23	30	0	15	23	30
Adyuvante de Freund*	C	I	I	I	C	I	I	I
Antígeno ( $\mu$ g)	150	150	150	150	-	-	-	-
PBS 1x ( $\mu$ L)	-	-	-	-	150	150	150	150

\*C: Completo / I: Incompleto.

Para obtener los anticuerpos policlonales del suero de cada muestra se permitió la coagulación de la sangre durante 30 min a 37 °C y, luego, mediante centrifugación (Thermo Heraeus Megafuge 16R) (12000 rpm durante 20 min a 4 °C) se separó el suero, almacenándolo con glicerol (JT Baker) (20% v/v) a -80 °C (REVCO). Con el fin de determinar el nivel

de reconocimiento de los anticuerpos presentes en los sueros se realizó *Western blot*, teniendo en cuenta la concentración de anticuerpo producido ( $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*) para realizar diluciones en TBST-T y, adicionalmente, la concentración de antígeno (6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*) a reconocer. Como anticuerpo secundario se utilizó  $\alpha$ chicken producido en burro (Gallus Inmunitech inc.).

Con el fin de purificar los  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY presentes en suero, se utilizó el método de afinidad a antígeno; para esto, la proteína recombinante antigénica purificada (250  $\mu$ g) se separó mediante SDS-PAGE, transfiriéndola posteriormente a una membrana de PDVF (Millipore) (200 mA por 2 h). La banda con la proteína de interés se visualizó con rojo Ponceau S (Sigma Aldrich) y se cortó (37 kDa), realizando un pre-eluído con glicina 100 mM pH 2,5 por 10 min en agitación constante. Seguidamente, la membrana se lavó con TBS-T 2% durante 10 min y se bloqueó con TBS-T 2% leche 5% por 1 h, retirando el exceso de leche mediante 3 lavados de 10 min con TBS-T 2%. Posteriormente, la banda de membrana se cortó en cuadros de 2x2 mm y se incubó toda la noche (O/N) en agitación constante con 500  $\mu$ L de sueros sanguíneos. Los anticuerpos no unidos o suero remanente se retiraron mediante pipeteo y se conservaron a -20 °C en congelador convencional. Se realizaron lavados con TBS-T 2% que se monitorizaron por espectrofotometría hasta alcanzar una absorbancia a 280 nm menor a 0,1. Finalmente, para eluir los anticuerpos se adicionaron 150  $\mu$ L de glicina 100 mM pH 2,5 permitiendo interacción con la membrana durante 10 min aplicando vortex a velocidad 8 (Vortex Genie 2, VWR Scientific); los eluidos se neutralizaron con 15  $\mu$ L de tris HCl 2 M pH 8,5 y se almacenaron a -20 °C, siendo cuantificados espectrofotométricamente (JenWay 7315) a 280 nm.

Por otro lado, con el fin de extraer los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY presentes en yema de huevo, se procedió a realizar la precipitación de estos con concentraciones crecientes de polietilenglicol (PEG) 6000 (Sigma Aldrich) [32]. En primera instancia, las yemas se separaron cuidadosamente y se solubilizaron en dos volúmenes de buffer PBS 1X pH 7,4, una alícuota de 1 mL de cada huevo se utilizó para una evaluación preliminar de todas las muestras. Se realizaron precipitaciones consecutivas utilizando porcentajes crecientes de PEG6000 (3,5, 8,5 y 12%) con el fin de obtener las inmunoglobulinas enriquecidas. En la primera precipitación se conservó la fase intermedia (eliminando lípidos); en la segunda, el sobrenadante; y en la tercera, el pellet (resuspendido en 1mL de PBS 1X). Para todos los casos las muestras se dejaron en agitación sobre hielo en plataforma de agitación (LabNet) durante 10 min y se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min. El precipitado obtenido a un porcentaje de saturación del 12% se resuspendió en 400  $\mu$ L de PBS 1X, se cuantificó espectrofotométricamente en celda de cuarzo a 280 nm (JenWay 7315) y se tituló mediante ensayo de ELISA indirecto para determinar contenido de IgY. El proceso de purificación se monitorizó por SDS-PAGE 10% [33], [34].

## Evaluación y caracterización de anticuerpos policlonales $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY

Los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* purificados a partir de suero se evaluaron mediante ensayos de *Western blot* teniendo en cuenta concentraciones del anticuerpo producido (realizando diluciones en TBST-T) y, adicionalmente, la concentración de antígeno (6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*) a reconocer.

Por otro lado, con respecto a los  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* extraídos de yema de huevo, se realizó su titulación mediante ELISA indirecto en placas de 96 pozos en lector de placas (BioTek ELx8000). Para esto el antígeno (6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*) se preparó en buffer carbonato (carbonato/bicarbonato) pH 9,6 a una concentración de 10  $\mu$ g/mL, sembrando 100  $\mu$ L/pozo, esto se incubó durante 1 h a 37 °C (LabTech) y O/N a 4 °C en nevera (cubriendo la placa con papel vinipel y aluminio). Al día siguiente se realizó el bloqueo adicionando 200  $\mu$ L de leche descremada 5% *p/v* en PBS 1X durante 2 h a 37 °C; seguido se permitió interacción con

el anticuerpo primario  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* en una dilución 1:500 durante 2 h a 37 °C y, posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L del anticuerpo secundario  $\alpha$ IgY-HRP (Sigma) en una dilución 1:8000 preparado en PBS 1X, incubando durante 2 h a 37 °C. El revelado de la placa se realizó con 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS - Sigma) y peróxido de hidrógeno en buffer citrato-fosfato 100 mM pH 5,0 incubando durante 1 h a 37 °C, siendo detenida la reacción con 20  $\mu$ L de SDS 1%. Entre cada paso la placa se lavó por aspersion abundante con PBS 1X por lo menos 3 veces. Finalmente, se registró la absorbancia a 405 nm.

**Tabla 2.** Controles utilizados para la titulación de los IgY contra la *LbTXNPxII* extraídos de yema mediante ELISA indirecto.

No	Tipo de control	Ag	Ab-1 <sup>no</sup>	Ab-2 <sup>no</sup>
1	Negativo	BSA	$\alpha$ 6xHis-SUMO- <i>LbTXNPxII</i>	$\alpha$ IgY-HRP
2	Negativo	6xHis-SUMO- <i>LbTXNPxII</i>	$\alpha$ 6xHis-SUMO- <i>LbTXNPxII</i>	PBS 1X
3	Negativo	6xHis-SUMO- <i>LbTXNPxII</i>	PBS 1X	$\alpha$ IgY-HRP
4	Negativo	6xHis-SUMO- <i>LbTXNPxII</i>	PBS 1X	PBS 1X
5	Negativo	PBS 1X	PBS 1X	PBS 1X
6	Positivo	$\alpha$ IgY-HRP (1:4000)	PBS 1X	$\alpha$ IgY-HRP

## Inmunodetección de la proteína *LbTXNPxII* endógena

Con el propósito de reconocer la proteína *LbTXNPxII* endógena a partir de extractos celulares, aproximadamente  $7,5 \times 10^8$  promastigotes de *L. braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904) se colectaron mediante centrifugación a 6500 rpm por 10 min a 4 °C, realizando 2 lavados con 10 mL de PBS 1X pH 7,4 y siendo estos resuspendidos finalmente en 500  $\mu$ L de buffer de lisis (PBS 0.1X, coctel de inhibidores de proteasas (1:250) (Sigma P8340), Tritón X-100 0.1%), incubando, a su vez, durante 40 min a 4 °C en agitación constante. Seguido, las fracciones se separaron por centrifugación (Thermo Heraeus Megafuge 16R) durante 20 min a 12000 rpm y 4 °C. A la fracción soluble se le adicionó buffer de carga 6X (1:5) para SDS-PAGE y a la insoluble 200  $\mu$ L de buffer de carga 1X, siendo desnaturalizadas a 90 °C. Adicionalmente, otra muestra de parásitos se lisó directamente con buffer de carga 1X (células totales) en relación  $1 \times 10^5$  células/ $\mu$ L. Las muestras se analizaron mediante SDPS-PAGE 12% y *Western blot* (anticuerpo primario  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* purificado).

Otra manera de aprovechar los anticuerpos policlonales IgY específicos contra la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*, producidos en el modelo aviar en la inmunodetección de la proteína endógena, es por medio de inmunofluorescencia; para ello, promastigotes de *L. braziliensis* provenientes de 1 mL de cultivo confluyente se centrifugaron (5000 rpm por 5 min a 4 °C) y lavaron 3 veces con volúmenes con 1 mL de PBS 1X (homogenizando suavemente), siendo finalmente resuspendidos en 300  $\mu$ L. Cerca de  $2 \times 10^6$  parásitos se aplicaron sobre laminas tratadas con poli-L-lisina fijados con paraformaldehído 4% preparado en PBS 1X (1 h a 4 °C). Posteriormente, se adicionó glicina fría 100 mM durante 15 min y se permeabilizó con acetona fría durante 10 min a 4 °C. El montaje se bloqueó empleando BSA 1% en PBS 1X durante 1 h, luego se permitió interacción con el anticuerpo primario  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* purificado (1 h a temperatura ambiente), diluido 1:1000 en solución de bloqueo. El anticuerpo secundario  $\alpha$ IgY acoplado a Alexa 488 (1:1000 en solución de bloqueo) (Invitrogen) se aplicó sobre las láminas durante 1 h en oscuridad. La marcación del ADN se realizó con DAPI (1  $\mu$ g/ml en PBS 1X) (Thermo Scientific) durante 5 min. Entre cada paso las láminas se lavaron una vez con PBS 1X durante 10 min. Finalmente, las láminas se cubrieron con medio de montaje (Fluoromont-G

– Invitrogen) y se visualizaron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.

## Co-inmunoprecipitación de la proteína LbNMNAT utilizando $\alpha$ 6xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY en extractos proteicos solubles de promastigotes

Se utilizaron 400  $\mu$ L de resina tiofílica (Pierce® Thiophilic Adsorbent – Thermo Scientific) previamente equilibrada (3 lavados de 300  $\mu$ L durante 10 min sobre hielo en plataforma de agitación [LabNet]) en buffer IP 2X (tris-HCL 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y glicerol 5% v/v) y distribuida en dos tubos de 1,5 mL con 200  $\mu$ L de resina cada uno. Se realizó el proceso de aclarado, permitiendo interacción de 2 mg de fracción protéica soluble de promastigotes de *L. braziliensis* en relación 1:1 con buffer IP 2X, con 200  $\mu$ L de resina durante 3 h sobre hielo en plataforma de agitación y en presencia de inhibidor de proteasas (Sigma P8340). Posteriormente, se centrifugó (Thermo Heraeus Megafuge 16R) a 2000 rpm durante 3 min a 4 °C, retirando el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL y adicionando 4 mg del anticuerpo  $\alpha$ 6xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY. Esta mezcla se incubó toda la noche sobre hielo en plataforma de agitación; siendo agregada finalmente a los 200  $\mu$ L de resina restante. La mezcla se incubó durante 2 h sobre hielo en plataforma de agitación, conservando el sobrenadante como fracción de “proteínas no unidas”. Se realizaron 3 lavados con 500  $\mu$ L de buffer IP 2X de 10 min sobre hielo en plataforma de agitación, conservando el sobrenadante para posterior análisis. Finalmente, las muestras inmunoprecipitadas se resuspendieron en 200  $\mu$ L de buffer de carga para SDS-PAGE 1X, se incubaron a 96 °C durante 10 min y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min, el sobrenadante se conservó como “proteínas unidas”. El proceso se monitorizó mediante SDS-PAGE 10% con tinción de plata y *Western blot*, utilizando los anticuerpos primarios  $\alpha$ 6xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY generados y  $\alpha$ 6xHis-LbNMNAT-IgG [35], [36].

## Procedimientos bioinformáticos

Se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLC Main Workbench (versión 7), utilizando secuencias de ortólogos depositadas en NCBI para la TXNPx en los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. La predicción de la localización subcelular del candidato LbTXNPxII se adelantó mediante los servidores Euk-mPLoc 2.0, SignalIP 5.0 y DeepLoc-1.0. Por su parte, la construcción del modelo estructural del candidato se completó utilizando el método de “*Threading*” con el servidor I-TASSER [37]. El modelo se refinó con el servidor 3Drefine [38], mientras que su visualización se realizó con el programa (UCSF Chimera) [39]. En relación con la predicción de estructuras cuaternarias para el candidato, se emplearon las herramientas SWISS-MODEL [40] y GalaxyHomomer [41].

## Resultados

### Análisis *in silico* del candidato a triparedoxina peroxidasa de *L. braziliensis* (LbTXNPxII)

El alineamiento múltiple realizado a partir de secuencias de ortólogos para la TXNPx en la familia Trypanosomatidae (géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*) indicó que esta proteína es altamente conservada en dicho grupo de organismos (Figura 1). A excepción de los ortólogos de los parásitos *T. conorhini* y *T. rangeli*, el tamaño de la proteína es de 199 aa. Teniendo en cuenta la función fundamental que esta cumple en la neutralización de compuestos prooxidantes, los cuales pueden ser producidos de manera endógena por la cadena respiratoria o exógena como respuesta del hospedero a la infección, dos isoenzimas han sido identificadas en organismos como *L. donovani* y *L. infantum* ubicadas en citoplasma y

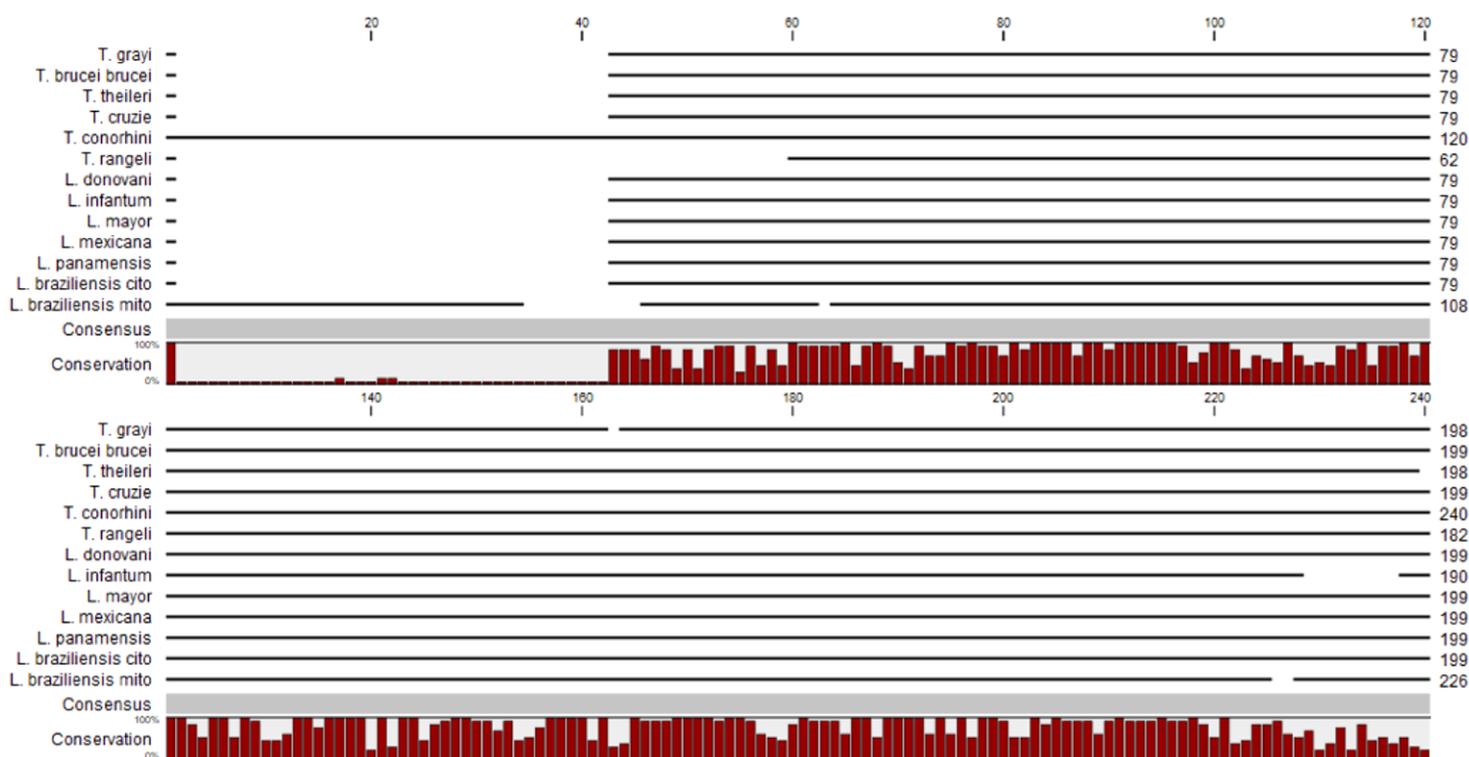
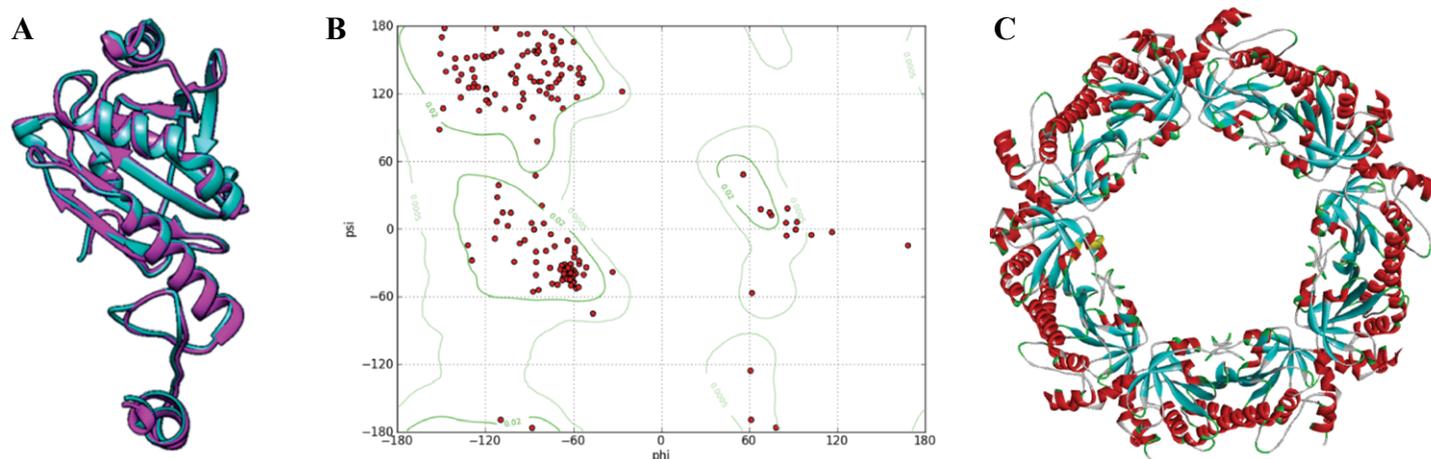


Figura 1. Alineamiento múltiple de los ortólogos TXNPx en la familia Trypanosomatidae (Imagen obtenida con el programa CLC Main Workbench).



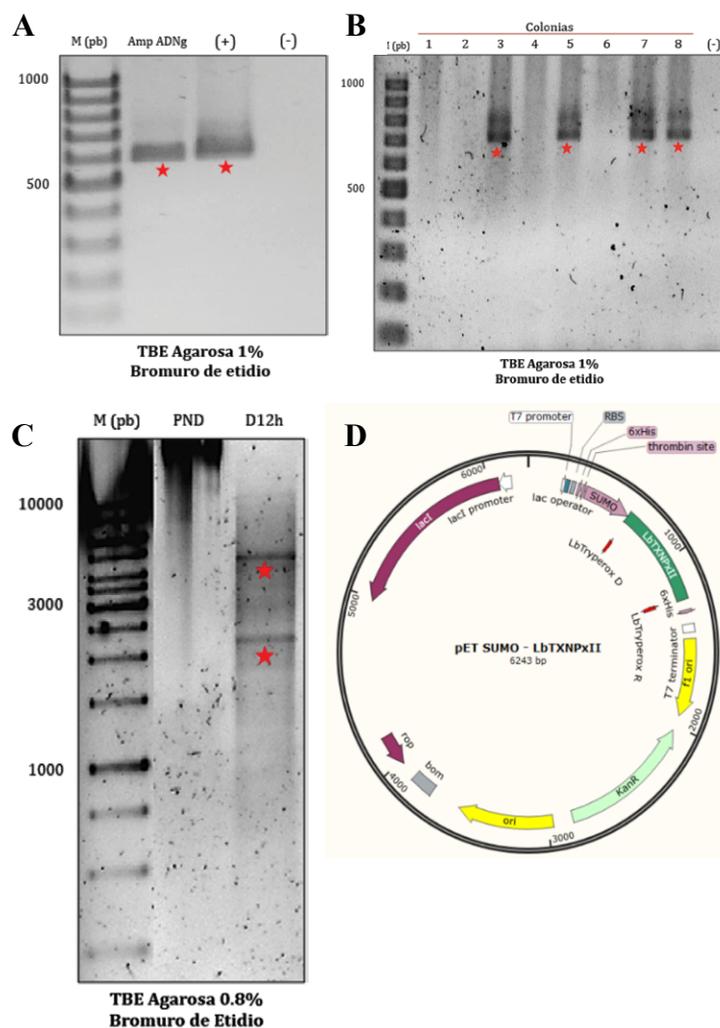
**Figura 2.** Análisis bioinformático del candidato *LbTXNPxII*. **A.** Superposición estructural (RMSD= 0.425Å) de la TXNPx cristalizada de *L. mayor* en magenta (PDB 4K1F) con la predicción realizada en el servidor I-TASSER y refinada en el servidor 3Drefine, para el candidato *LbTXNPxII* en azul (UCSF Chimera). **B.** Validación del modelo obtenido para el candidato *LbTXNPxII* mediante gráfico de Ramachandran (Imagen obtenida con el programa Ramachandran Plot [48]). **C.** Predicción de oligomerización del candidato *LbTXNPxII*, estructura compuesta por la unión de 5 homodímeros (Swiss-Model y GalaxyHomomer) [37], [39], [46], [47].

mitocondria [42]. Para el caso de *L. braziliensis*, de Morais *et al*, en el 2013 identificaron la proteína mitocondrial designada como *LbTXNPx* [8]. Continuando con la caracterización de estas enzimas y utilizando servidores como Euk-mPLoc 2.0, SignalP 5.0 y DeepLoc-1.0, se encontró a nivel *in silico* un nuevo candidato con posible localización citoplasmática denominado *LbTXNPxII* [43], [45].

Por otro lado, con respecto al análisis *in silico* del candidato encontrado, el servidor I-TASSER se utilizó para realizar la predicción tridimensional de la estructura de la proteína *LbTXNPxII* (Figura 2 A.), este emplea el método de “Threading” partiendo de una estructura cristalizada seleccionada mediante homología [37], [39], [46], [47]. Al valorar dicho modelo mediante el gráfico de Ramachandran, se obtuvo el 94,4% de los aminoácidos que componen la proteína en la región favorecida, luego de que el modelo se refinó mediante el servidor 3Drefine [48] (Figura 2.B.). Por último, partiendo de análisis de oligomerización realizados en *L. mayor*, donde se predice una posible formación de homodécmeros *in vivo* para llevar a cabo su función, se utilizaron los servidores SWISS-MODEL y GalaxyHomomer a fin de realizar este análisis para el candidato *LbTXNPxII*, obteniendo la posible formación de un pentámero de homodímeros, conformando finalmente, una estructura cuaternaria de homodécmeros (Figura 2. C.) [41], [49], [50].

## Producción de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII en el sistema heterólogo *E. coli*

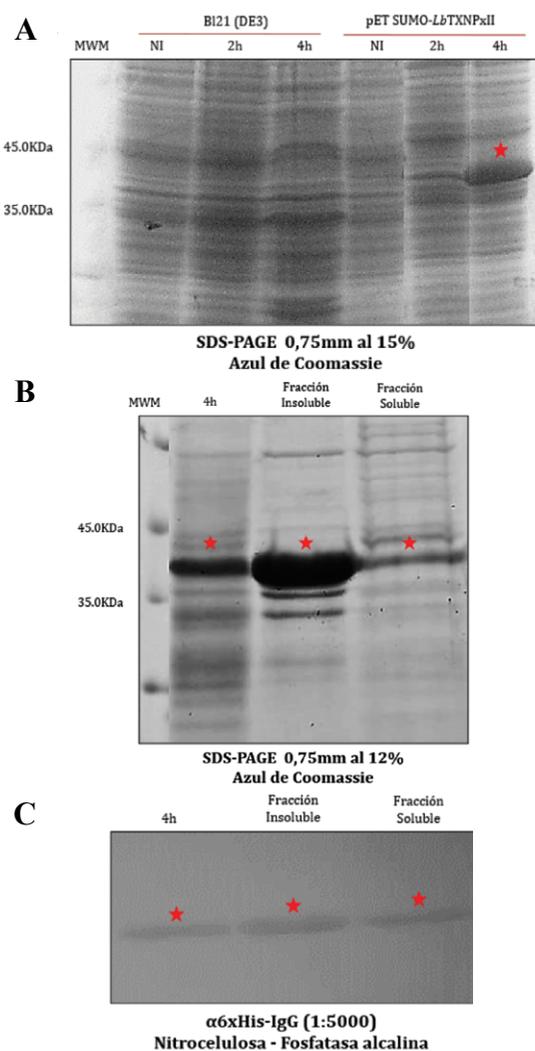
La secuencia *LbTXNPxII* de 600 pb se amplificó a partir de ADN genómico mediante PCR con Taq polimerasa (Figura 3. A.). Posteriormente, el producto amplificado se clonó en el vector de expresión bacteriano pET-SUMO. Al tratarse de un vector tipo -TA-, la direccionalidad del inserto se corroboró realizando PCR con un oligonucleótido directo ubicado en la región SUMO corriente arriba del sitio de clonación múltiple, junto con el oligonucleótido reverso diseñado para la amplificación del candidato, esperando así un aumento en el tamaño del amplificado de 100 pb; es decir, una banda de alrededor de 700 pb (Figura 3 B.). Finalmente, utilizando el servidor NEBcutter2.0 se seleccionaron las enzimas de restricción (BamHI y EcoRV) para corroborar la identidad del plásmido recombinante mediante un perfil diferencial en comparación con el plásmido vacío (Figura 3 C.) [22]. El mapa del vector recombinante construido se indica en la Figura 3. D.



**Figura 3.** Construcción del vector recombinante pET SUMO- *LbTXNPxII*. **A.** Amplificación de la secuencia de interés de 600pb a partir de ADN genómico. **B.** Evaluación de las colonias obtenidas tras la transformación, de las cuales 4 resultaron direccionadas en el vector (700pb). **C.** Evaluación del perfil de digestión del plásmido, obteniendo una banda de ~ 4201pb y otra en ~ 2042pb, corroborando así la presencia del inserto e identidad del plásmido recombinante. **D.** Representación del vector recombinante pET SUMO- *LbTXNPxII* construido (Imagen obtenida con el programa SnapGene).

La TXNPx es una enzima clave para la resistencia de los parásitos al estrés oxidativo, desempeñando un importante papel antioxidante. Adicionalmente, posee una alta divergencia a nivel de ortólogos en otros grupos animales, para el caso de las posibles especies hospederas como animales salvajes, domésticos o hasta los propios seres humanos, estas enzimas poseen un homólogo distante que se desvía a otra clase [14]. Por lo tanto, estudiar el candidato desde la aproximación de proteínas recombinantes resulta ser enriquecedor para entender función y localización en *L. braziliensis* en aras de caracterizar la bioquímica y rutas metabólicas de estos organismos.

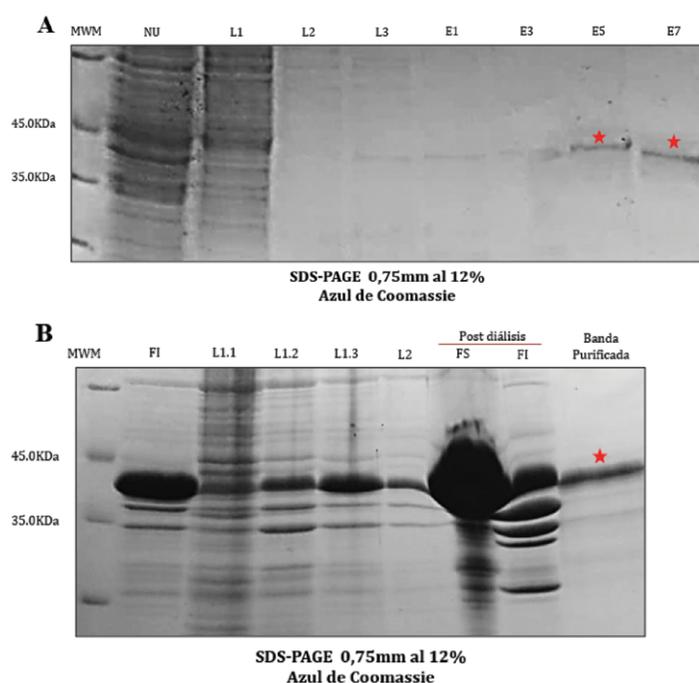
Tras la corroboración de la identidad del plásmido pET SUMO-*LbTXNPxII*, este se utilizó para la transformación de la cepa de expresión BL21(DE3) [51]. Posterior a la inducción con IPTG se encontró que a partir de las 2 h se observa en el SDS-PAGE una evidente expresión de la proteína en el peso esperado (37 kDa) (Figura 4 A.); sin embargo, teniendo en cuenta que a las 4 h se observa una mayor cantidad, este tiempo se implementó para realizar el fraccionamiento celular (Figura 4. B.). Finalmente, al realizar la detección de la 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* mediante *Western blot*, se obtuvo señal tanto en la fracción soluble como insoluble del sistema de expresión (Figura 4 C.).



**Figura 4.** Expresión de la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* en la cepa *E. coli* BL21(DE3). **A.** Evaluación de horas de inducción (NI: No inducidas, Horas de inducción monitorizadas 2 h y 4 h), teniendo como control negativo células BL21(DE3) no transformadas. La cantidad de muestra cargada se normalizó con base en la OD de las células al momento de su recolección. **B.** Fraccionamiento celular a partir de la muestra de 4 h de inducción. **C.** Corroboración de la identidad de la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* sobreexpresada en proteínas totales y fracciones celulares mediante *Western blot*.

## Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) y SDS-PAGE preparativo

Aprovechando la etiqueta 6xHis conferida por el vector, la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* se purificó empleando resina de Níquel (Ni), obteniendo la mayor cantidad de proteína purificada en los eluidos 5 – 7, 0,786 mg a partir de 300 mL de inducción (Figura 5 A.). Por otro lado, aprovechando la cantidad abundante de la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* en la fracción insoluble, se procedió a realizar su purificación a partir de cuerpos de inclusión utilizando SDS-PAGE preparativo, encontrando que, posterior al paso de diálisis, la proteína permanecía tanto en fracción soluble como insoluble, por lo que se decidió utilizar ambas fracciones para la separación preparativa (Figura 5 B.). Finalmente, se obtuvieron 1,22 mg de proteína eluida desde un pellet de 2,1 g de cuerpos de inclusión.

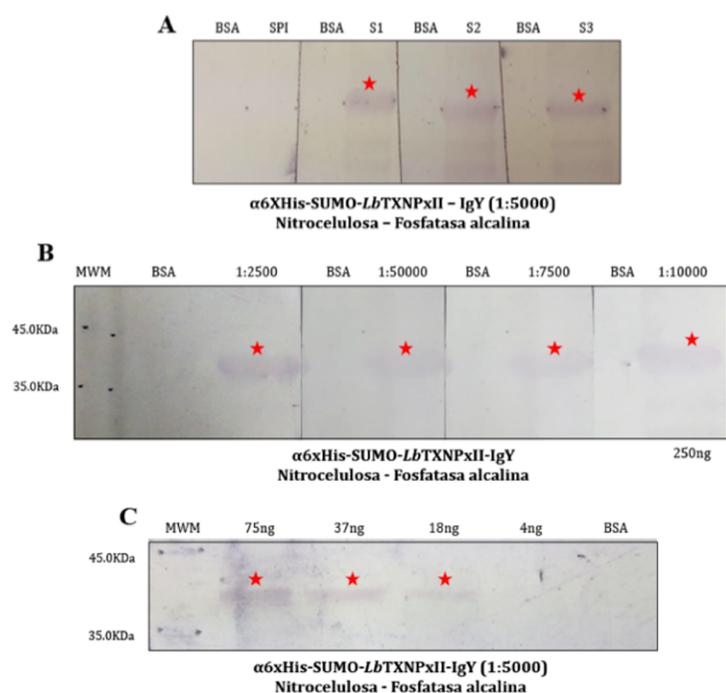


**Figura 5.** Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* (37kDa). **A.** Purificación a partir de la fracción soluble empleando cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) (NU: No unidas, Lx: Número del lavado, Ex: Número del eluido). **B.** Purificación a partir de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) empleando SDS-PAGE preparativo (FI: Fracción insoluble, FS: Fracción soluble, Lx: Número del lavado).

## Producción, evaluación y caracterización de anticuerpos policlonales aviares $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY

Gallinas de la raza Hy-Line Brown de 35 semanas se utilizaron para la producción de anticuerpos policlonales contra el candidato 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*. Durante el esquema de inmunización se recolectaron cuatro sueros, uno preinmune (SPI) y tres post-inoculación, los cuales muestran una clara señal en la detección de la proteína recombinante purificada (Figura 6 A.). Por otro lado, utilizando el suero 1 (S1) se procedió a realizar la caracterización de los anticuerpos, encontrando que son capaces de reconocer 250 ng de la proteína 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII* en una dilución de hasta 1 en 10000 (Figura 6 B.). Adicionalmente, detectando la cantidad mínima

de antígeno reconocido en una dilución de 1 en 5000 se encontró que estos anticuerpos son capaces de reconocer hasta 18 ng bajo estas condiciones (Figura 6.C).

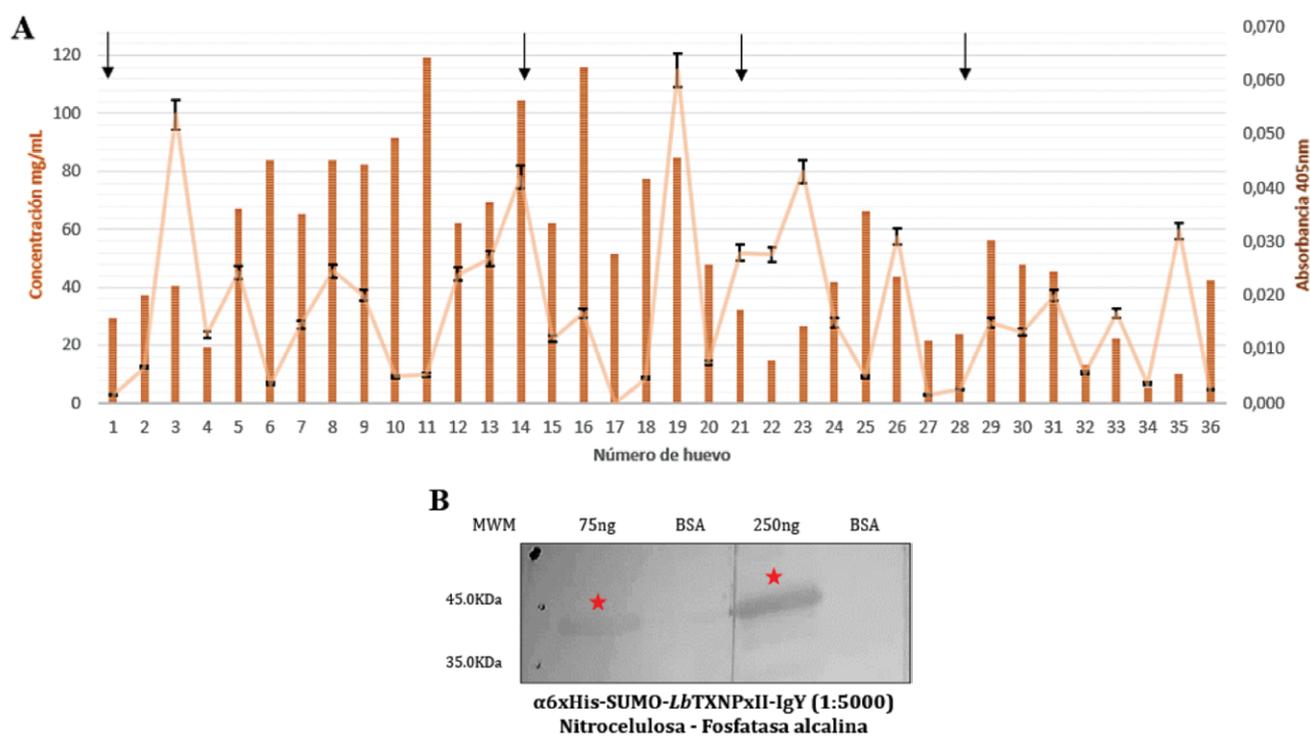


**Figura 6.** Evaluación de anticuerpos policlonales  $\alpha 6\text{XHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY}$ , presentes en sueros sanguíneos. **A.** Reconocimiento del antígeno (250 ng) por parte de los sueros  $\alpha 6\text{XHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY}$ . (BSA: Albumina de suero bovino 250 ng, SPI: Suero pre inmune, SX: Número del suero evaluado del 1-3). **B.** Caracterización de los anticuerpos en suero, dilución de trabajo sobre 250 ng de antígeno. **C.** Caracterización de los anticuerpos en suero, cantidad mínima de antígeno reconocida.

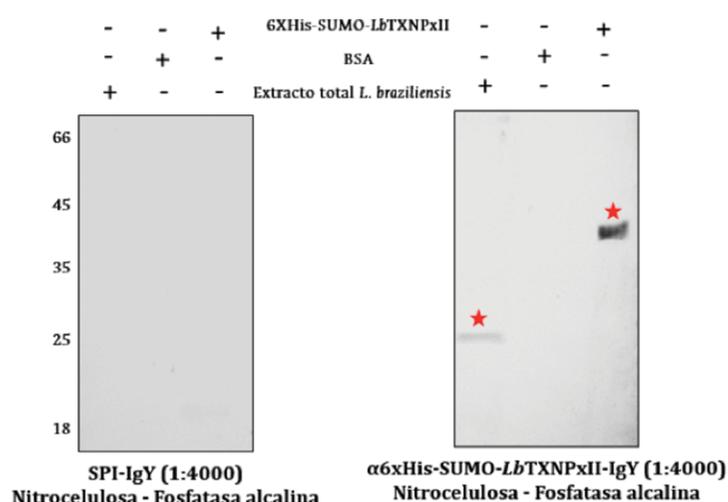
El modelo aviar permite la obtención de los anticuerpos policlonales de interés tanto a partir de sangrías del animal como de los huevos que este produce. Durante el esquema de inmunización realizado se recolectaron 36 huevos. Posterior a su procesamiento, las muestras se analizaron por espectrofotometría (280 nm) con el propósito de estimar la concentración aproximada (mg/mL) de proteínas totales presentes en cada una. Seguidamente, se realizó la titulación de estas mediante ELISA indirecto, en el cual se determinaron las muestras con mayor cantidad de anticuerpos específicos contra la  $6\text{xHis-SUMO-LbTXNPxII}$ , seleccionadas para la completa purificación. Es evidente que las muestras que presentan mayor concentración de proteínas totales no necesariamente son las que poseen mayor cantidad de los anticuerpos de interés; adicionalmente, existe una clara respuesta del sistema ante la inoculación, observándose los picos más altos (Abs 405 nm) posterior a esta (Figura 7. A). Finalmente, los anticuerpos  $\alpha 6\text{xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY}$  purificados a partir de la yema de los huevos se evaluaron mediante *Western blot*, obteniendo señales claras y específicas en el reconocimiento de la proteína recombinante (Figura 7 B).

### Inmunodetección de la proteína LbTXNPxII endógena (23kDa) en extractos del parásito.

La implementación de los anticuerpos  $\alpha 6\text{xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY}$  purificados anteriormente en ensayos de *Western blot* sobre extractos totales de *L. braziliensis* permitió detectar la proteína *LbTXNPxII* endógena con un peso molecular aproximado de 23 kDa, utilizando como control positivo del ensayo la proteína recombinante  $6\text{xHis-SUMO-LbTXNPxII}$  producida y purificada (37 kDa) (Figura 8). La inmunodetección de la proteína endógena resultó específica, dado que la implementación del suero preinmune en el ensayo de *Western blot* no generó señales sobre la membrana del ensayo. Adicionalmente, al cargar BSA como control negativo de detección, no hubo reconocimiento de la misma.

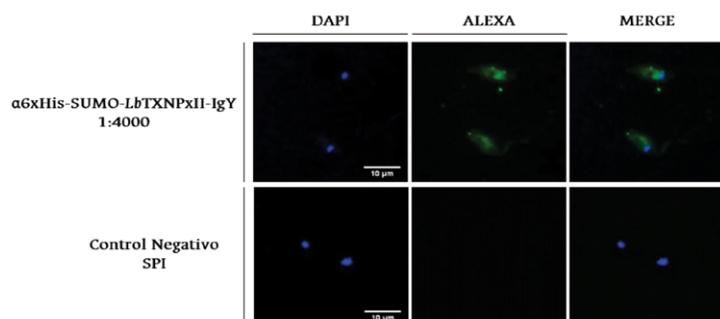


**Figura 7.** Producción de anticuerpos policlonales  $\alpha 6\text{xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY}$  en huevos. **A.** Titulación mediante ELISA indirecto de los anticuerpos presentes en yema de huevos recogidos durante el esquema de inmunización (las flechas negras indican días de inoculación). Los datos de absorbancia a 405 nm indican el promedio y la desviación estándar (n= 3). **B.** Evaluación de los anticuerpos  $\alpha 6\text{xHis-SUMO-LbTXNPxII-IgY}$  provenientes de yema de huevo mediante *Western blot*.



**Figura 8.** Inmunodetección de la proteína *LbTXNPxII* endógena sobre extractos proteicos totales de *L. braziliensis*. Se analizaron extractos proteicos totales del estadio infectivo (promastigote) del parásito implementando el suero preinmune (SPI) o los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY purificados sobre extractos proteicos de promastigotes, BSA y la proteína recombinante  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*.

Por otro lado, empleando técnicas de inmunofluorescencia indirecta sobre promastigotes de *L. braziliensis* y con el uso de los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY producidos y caracterizados se encontró que el candidato exhibe un patrón de distribución citoplasmático en la fase móvil del parásito, como sugirió el modelo *in silico* anteriormente presentado acerca de la localización subcelular de la proteína (Figura 9).

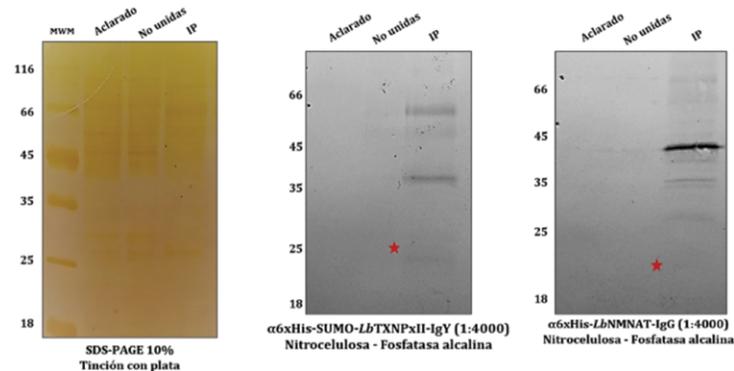


**Figura 9.** Inmunolocalización celular de la *LbTXNPxII* endógena sobre promastigotes. Análisis de inmunofluorescencia sobre parásitos de *L. braziliensis* fijados con paraformaldehído. SPI: Suero preinmune.

Análisis realizados por Joya *et al.* en el 2019 por Co-IP/MS-MS sugirieron una posible interacción entre la triparedoxina peroxidasa (TXNPxII) y la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT), enzima clave en el metabolismo del dinucleótido de nicotinamida y adenina NAD en *L. braziliensis*. Para corroborar dicha interacción, los anticuerpos policlonales  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY generados se utilizaron en la inmunoprecipitación e inmunodetección cruzada de estas enzimas, observándose para cada caso la detección de estas (Figura 10), confirmando esta conexión molecular.

## Discusión

Considerando la importancia de los sistemas de defensa anti-oxidante para la supervivencia de *Leishmania* dentro del macrófago del hospedero, se detectó la triparedoxina peroxidasa citoplasmática de *L. braziliensis*



**Figura 10.** Co-inmunoprecipitación de la *LbNMNAT* utilizando los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*-IgY y realizando detecciones inmunológicas de los inmunoprecipitados tanto con estos anticuerpos como con  $\alpha$ 6xHis-*LbNMNAT*-IgG en extractos proteicos solubles totales de promastigotes de *L. braziliensis*.

(*LbTXNPxII*), la cual participa en la neutralización de ROS y RNI a expensas de equivalentes reductores derivados de la tripanotona. Adicionalmente, se exploró su interacción molecular con enzimas propias de la síntesis de NAD, como la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (*LbNMNAT*).

La caracterización *in silico* del candidato *LbTXNPxII* concluyó que, en general, corresponde a una enzima altamente conservada entre ortólogos, con un tamaño constante de 199 aa (Figura 1) y predominantemente expresada en el estado amastigote como respuesta a la reproducción asexual que se da durante este estadio dentro del compartimento fagolisosómico [52]. Así mismo, el promastigote representa un buen modelo de estudio puesto que se expone a estrés oxidativo tanto en el intestino del vector como durante la interacción con los macrófagos tras la transmisión al hospedero mamífero (15); motivo este por el cual la *LbTXNPxII* endógena de 23 kDa con distribución citosólica es inmunodetectada también en dicho estado.

La inmunodetección reportada en este trabajo requirió la construcción de un vector de expresión apropiado para el sistema heterólogo *E. coli* BL21 (DE3), el cual resultó en la producción abundante de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-*LbTXNPxII*. Este sistema representa una fuente biológica para obtener insumos útiles en la producción de herramientas inmunológicas como anticuerpos policlonales en diversos sistemas animales. En este sentido, la proteína en mención se aprovechó como antígeno para la producción aviar de IgYs (Figuras 6 y 7), destacándose su aplicación en la detección de la proteína citoplasmática *LbTXNPxII* del parásito (Figuras 8 y 9). Adicionalmente, esta herramienta podrá utilizarse en otros estudios de inmunodetección en el estado amastigote, constituyendo un reactivo útil puesto que no se dispone de anticuerpos comerciales para estos fines en *Leishmania*.

Las enzimas triparedoxina peroxidadas, como la detectada en el presente estudio, poseen cisteínas (Cys) conservadas en las posiciones 52 y 173, involucradas con el mecanismo de acción, la estabilidad de la conformación nativa y la formación de oligómeros propiamente homodécámeros [13]. Adicionalmente, Barr y Gedamu en 2001 determinaron que las peroxirredoxinas de *L. chagasi* pueden existir como multímeros de alto peso molecular *in vivo*, fenómeno observado también en ortólogos de *L. donovani* y *T. cruzi* [52]. Estas evidencias concuerdan con la predicción de estructura cuaternaria realizada para la enzima *LbTXNPxII* (Figura 2 C).

Para la contención de diversas especies reactivas en el proceso de infección, el parásito depende de isoenzimas mitocondriales y citoplasmáticas de la TXNPx, las cuales, a su vez, dependen del NADPH para catalizar sus reacciones. Estudios previos han reportado en *L. braziliensis* la interacción molecular entre proteínas propias de los sistemas antioxidantes con aquellas involucradas en la síntesis del NAD, como la NMNAT [12]. Dicha evidencia se confirmó en el presente estudio (Figura 10), en el

cual se hace patente la importancia de profundizar el estudio acerca de la relación existente entre vías metabólicas y de regulación bajo situaciones de estrés REDOX. Aunque se desconoce si el aumento en los niveles de estrés oxidativo podría estimular la síntesis de NAD y subsecuentemente de NAD(P), su estudio será necesario para identificar posibles objetivos moleculares para el desarrollo de fármacos contra el parásito.

## Conclusiones

En respuesta a la importancia del sistema TR-TXN-TXNPx para la neutralización de ROS y RNI relacionada con supervivencia y capacidad de infección, así como para el desarrollo y virulencia de parásitos Tripanosomátidos, se detectó la triparredoxina peroxidasa citoplasmática de *L. braziliensis* (LbTXNPxII), una enzima de 23 kDa altamente conservada. Para ello se produjo y purificó la proteína recombinante 6xHis-SUMO-LbTXNPxII utilizada como antígeno para la producción de anticuerpos policlonales aviares que facilitaron su caracterización en el estadio infectivo del parásito (promastigote) y, adicionalmente, permitió la corroboración de la interacción LbTXNPxII- LbNMNAT conectando el metabolismo REDOX con la síntesis de NAD.

## Agradecimientos

Al proyecto “Desarrollo y evaluación de un sistema productivo de proteínas recombinantes y herramientas inmunológicas, acorde a las necesidades actuales del país”, código 40542 Convocatoria nacional sesquicentenario – Proyectos de Importancia Institucional y a la beca Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias de la convocatoria 812 del 2018 y al proyecto de la DIB “Convocatoria para el fortalecimiento de alianzas interdisciplinarias” código 42176 del 2018.

## Referencias

- [1] Juan David Ramírez González y Grupo de Investigaciones Microbiológicas-UR (GIMUR), *Colombia, el país con más especies de parásitos de Leishmania*. 2017.
- [2] M. B. Rogers, J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler, y J. C. Mottram, “Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*”, *Genome Res.*, vol. 21, n.º 12, pp. 2129-2142, 2011. DOI: 10.1101/gr.122945.111. Epub 2011 Oct 28.
- [3] P. Kaye y P. Scott, “Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface”, *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, n.º 8, pp. 604-615, 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2608.
- [4] F. Frézard, R. Monte-Neto, y P. G. Reis, “Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasites”, *Biophys. Rev.*, vol. 6, n.º 1, pp. 119-132, 2014. DOI: 10.1007/s12551-013-0134-y.
- [5] J. Sunter y K. Gull, “Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding”, *Open Biol.*, vol. 7, n.º 9, p. 170165, 2017.
- [6] L. Monzote, “Current Treatment of Leishmaniasis: A Review”, *Open Antimicrob. Agents J.*, vol. 1, pp. 9-19, 2009. DOI: 10.1098/rsob.170165.
- [7] M. Lipoldová y P. Demant, “Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis”, *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, n.º 4, pp. 294-305, 2006. DOI: 10.1038/nrg1832.
- [8] M. A. B. de Morais, T. de A. C. B. De Souza, y M. T. Murakami, “Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the mitochondrial trypanredoxin peroxidase from *Leishmania braziliensis*”, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 69, n.º 4, pp. 408-411, 2013. DOI: 10.1107/S1744309113003989. Epub 2013 Mar 28.
- [9] G. Eslami, F. Frikha, R. Salehi, A. Khamesipour, H. Hejazi, y M. A. Nilforoushzadeh, “Cloning, expression and dynamic simulation of TRYP6 from *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER)”, *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, n.º 6, pp. 3765-3776, 2011. DOI: 10.1007/s11033-010-0492-5. Epub 2010 Dec 1.
- [10] A. H. Fairlamb y A. Cerami, “Metabolism and functions of Trypanothione in the kinetoplastida”, *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 46, pp. 695-729, 1992. DOI: 10.1146/annurev.mi.46.100192.003403.
- [11] O. Mutlu, “In Silico Molecular Modeling and Docking Studies on the Leishmanial Trypanredoxin Peroxidase”, *Brazilian archives of Biology and Technology. An International Journal*, vol. 57, n.º April, pp. 244-252, 2014. doi.org/10.1590/S1516-89132014000200013.
- [12] L. Ortiz-Joya, L. E. Contreras-rodríguez, y M. H. Ramírez-Hernández, “Protein-protein interactions of the nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase of *Leishmania braziliensis*”, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 114, n.º 2, pp. 1-9, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760180506.
- [13] J. König y A. H. Fairlamb, “A comparative study of type I and type II trypanredoxin peroxidases in *Leishmania major*”, *FEBS J.*, vol. 274, n.º 21, pp. 5643-5658, 2007. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06087.x. Epub 2007 Oct 8.
- [14] A. Kumar, B. Saha, y S. Singh, “Dataset generated for Dissection of mechanisms of Trypanothione Reductase and Trypanredoxin Peroxidase through dynamic network analysis and simulations in leishmaniasis”, *Data Br.*, vol. 15, pp. 757-769, 2017. DOI: 10.1016/j.dib.2017.10.031. eCollection 2017 Dec.
- [15] J. P. Iyer, A. Kaprakkaden, M. L. Choudhary, y C. Shaha, “Crucial role of cytosolic trypanredoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence”, *Mol. Microbiol.*, vol. 68, n.º 2, pp. 372-391, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06154.x. Epub 2008 Feb 26.
- [16] R. K. Gundampati, S. S. Ankita Shukla, R. K. Pandey, M. Patel, R. M. Banik y M. V. Jagannadham, “Trypanredoxin peroxidase of *Leishmania braziliensis*: homology modeling and inhibitory effects of flavonoids for anti-leishmanial activity”, *Bioinformation*, vol. 10, n.º 6, pp. 353-357, 2014. DOI: 10.6026/97320630010353. eCollection 2014.
- [17] A. Fiorillo, G. Colotti, A. Boffi, P. Baiocco, y A. Ilari, “The Crystal Structures of the Trypanredoxin-Trypanredoxin Peroxidase Couple Unveil the Structural Determinants of *Leishmania* Detoxification Pathway”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, n.º 8, p. e1781, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001781.
- [18] T. G. Wolfsberg, “Using the NCBI Map Viewer to Browse Genomic Sequence Data”, *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 1.5.1-1.5., n.º 29, pp. 1-25, 2010. DOI: 10.1002/0471250953.bi0105s16.
- [19] J. M. Butler, “DNA Amplification (The Polymerase Chain Reaction)”, en *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, 2010, pp. 125-146. DOI: 10.1021/ac00212a004.

- [20] Catalog no. K300-01, “Champion pET SUMO Protein Expression System”, - *Invit.*, vol. Van Allen, n.º Carlsbad, CA, p. 52.
- [21] J. Sambrook, M. R. Green, D. W. Russell, y C. S. H. Laboratory, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001.
- [22] T. Vincze, J. Posfai, y R. J. Roberts, “NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, n.º 13, pp. 3688-3691, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg526.
- [23] F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman y J. A. Smith, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. 2003.
- [24] H. Towbin, T. Staehelin, y J. Gordon, “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 24, n.º 9, pp. 4350-4354, 1992. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- [25] Z. Q. Liu, T. Mahmood, y P. C. Yang, “Western blot: Technique, theory and trouble shooting”, *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 6, n.º 3, p. 160, 2014. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
- [26] The QIAexpressionist™, *A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*, Fifth Edit., n.º June. 2003.
- [27] J. A. Bonnhorst y J. J. Falke, “Purification of proteins using polyhistidine affinity tags”, *Bull. Acad. Natl. Med.*, vol. 150, n.º 23, pp. 446-453, 1966. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26058-8.
- [28] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- [29] E. A. Herrera T., L. E. Contreras, A. G. Suárez, G. J. Diaz, y M. H. Ramirez, “G1Sir2.1 of *Giardia lamblia* is a NAD + -dependent cytoplasmic deacetylase”, *Heliyon*, vol. 5, n.º 4, p. e01520, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01520. eCollection 2019 Apr.
- [30] H. F. Stils, «Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants”, *ILAR J.*, vol. 46, n.º 3, pp. 280-293, 2005. DOI: 10.1093/ilar.46.3.280.
- [31] A. Larsson, R. M. Bålów, T. L. Lindahl, y P. O. Forsberg, “Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review.», *Poult. Sci.*, vol. 72, n.º 10, pp. 1807-1812, 1993. DOI: 10.3382/ps.0721807.
- [32] R. Schade, C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, H. Hugl, G. Koch, A. Larsson, W. Pollmann, M. Regenmortel, E. Rijke, H. Spielmann, H. Steinbusch y D. Straughan, “The production of avian ( egg yolk ) antibodies : IgY . The report and recommendations of ECVAM workshop 21 The Production of Avian ( Egg Yolk ) Antibodies : IgY The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21 1 , 2” , n.º November, 1996. DOI:10.1177/026119299602400607.
- [33] R. Schade, E. G. Calzado, R. Sarmiento, P.A. Chacana, J. Porankiewicz-Asplund, y H. R. Terzolo, “Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine”, *ATLA Altern. to Lab. Anim.*, vol. 33, n.º 2, pp. 129-154, 2005. DOI: 10.1177/026119290503300208.
- [34] D. Pauly, P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs, y R. Schade, “Igy technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation”, *J. Vis. Exp.*, vol. 51, n.º e3084, pp. 1-6, 2011. DOI: 10.3791/3084.
- [35] L. Contreras, “Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT)”, para optar por el título de Doctor, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, 2016.
- [36] P. Van Der Geer, *Analysis of protein-protein interactions by coimmunoprecipitation*, 1.ª ed., vol. 541 :35-47 Elsevier Inc., 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00004-5.
- [37] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, y Y. Zhang, “The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction”, *Nat. Methods*, vol. 12, n.º 1, pp. 7-8, 2014. DOI: 10.1038/nmeth.3213.
- [38] D. Bhattacharya, J. Nowotny, R. Cao, y J. Cheng, “3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n.º W1, pp. W406-W409, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw336.
- [39] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng y T. E Ferrin, “UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis”, *Wiley InterSci.*, vol. 25, n.º 13, pp. 1605-1612, 2004. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- [40] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, y M. C. Peitsch, “SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, n.º 13, pp. 3381-3385, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg520.
- [41] J. Ko, H. Park, L. Heo, y C. Seok, “GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, n.º W1, pp. 294-297, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks493.
- [42] L. Flohé, H. Budde, K. Bruns, H. Castro, J. Clos, B. Hofmann, S. Kansal-Kalavar, D. Krumme, U. Menge, K. Plank-Schumacher, H. Sztajer, J. Wissing, C. Wylegalla y H. Jürgen Hecht, “Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism”, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 397, n.º 2, pp. 324-335, 2002. DOI: 10.1006/abbi.2001.2688.
- [43] O. Emanuelsson, S. Brunak, G. von Heijne, y H. Nielsen, “Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools”, *Nat. Protoc.*, vol. 2, n.º 4, pp. 953-971, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.131.
- [44] K. C. Chou y H. Bin Shen, “Cell-PLoc: A package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms”, *Nat. Protoc.*, vol. 3, n.º 2, pp. 153-162, 2008. DOI: 10.1038/nprot.2007.494.
- [45] J. J. Almagro Armenteros, C. K. Sønderby, S. K. Sønderby, H. Nielsen, y O. Winther, “DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning”, *Bioinformatics*, vol. 33, n.º 21, pp. 3387-3395, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx431.
- [46] Y. Z. Ambrish Roy, Alper Kucukural y Y. Zhang, “I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction”, *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 9, n.º December, pp. 5-9, 2011. DOI:10.1038/nprot.2010.5.
- [47] Y. Zhang, “I-TASSER server for protein 3D structure prediction”, *BMC Bioinformatics*, vol. 8, pp. 1-8, 2008. DOI: 10.1038/nprot.2010.5. Epub 2010 Mar 25.
- [48] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall III, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, y D. C. Richardson, «Structure validation by C alpha Geometry: phi, psi and C beta Deviation”, *Proteins-Structure Funct. Genet.*, vol. 50, n.º August 2002, pp. 437-450, 2003. DOI: 10.1002/prot.10286.
- [49] M. C. Gretes, L. B. Poole, y P. A. Karplus, “Peroxioredoxins in Parasites”, *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 17, n.º 4, pp. 608-633, 2012. DOI: 10.1089/ars.2011.4404.

[50] M. Brindisi, S. Brogi, N. Relitti, A. Vallone, S. Butini, S. Gemma, E. Novellino, G. Colotti, G. Angiulli, F. Di Chiaro, A. Fiorillo, A. Ilari y G. Campiani, "Structure-based discovery of the first non-covalent inhibitors of *Leishmania major* trypanothione peroxidase by high throughput docking", *Sci. Rep.*, vol. 5, n.º 9705, pp. 1-10, 2015. DOI: 10.1038/srep09705.

[51] G. L. Rosano y E. A. Ceccarelli, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges", *Front. Microbiol.*, vol. 5, n.º APR, pp. 1-17, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172. eCollection 2014.

[52] S. D. Barr y L. Gedamu, "Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidase genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals", *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n.º 36, pp. 34279-34287, 2001. doi: 10.1074/jbc.M104406200. Epub 2001 Jul 3.

**Citación de artículo:**

S. E. Villamil-Silva, L. J. Ortiz-Joya, L. E. Contreras-Rodríguez, G. Díaz- Gonzalez & M. H. Ramírez-Hernández, "Identificación de una tripanotina peroxidasa citoplasmática en *Leishmania braziliensis*", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 50, no. 2, pp. 3-14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v50n2.91721>