



# ***Estudio de la nitración de lípidos en la lipoproteína de baja densidad***

*Departamento de Bioquímica  
Centro de Investigaciones Biomédicas*

***Maestría en Ciencias Biológicas***

*Orientación: Bioquímica*

***PEDECIBA***

***Orientador: Dr. Homero Rubbo***

***Co-orientador: Dr. Andrés Trostchansky***

***Lic. Mauricio Mastrogiovanni***

*Facultad de Medicina*

*Universidad de la República*

*Diciembre, 2016*

## Contenido

1. Resumen.....	5
2. Introducción .....	6
2.1. Generalidades de lipoproteínas.....	6
2.2. Transporte de lípidos en sistema circulatorio .....	7
2.3. Lipoproteína de Baja Densidad (LDL).....	10
2.4. LDL en aterosclerosis .....	11
2.5. Especies reactivas del nitrógeno y oxígeno de relevancia biológica .....	17
2.5.1. Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	17
2.5.2. Óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) .....	18
2.5.3. Dióxido de nitrógeno radical ( $\cdot NO_2$ ).....	19
2.5.4. Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) .....	20
2.6. Mecanismos de nitración de lípidos. ....	21
2.7. Espectrometría de masas aplicada a la detección de ácidos grasos nitrados .	26
2.8. Objetivos.....	29
Objetivo General.....	29
Objetivos Específicos .....	29
3. Materiales y Métodos .....	30
3.1. Materiales .....	30
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Purificación de LDL .....	30
3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	31
3.2.3. Nitración de LDL .....	31
3.2.4. Cuantificación de $\alpha TOH$ .....	32
3.2.5. Cuantificación relativa de carbonilos totales .....	32
3.2.6. Cuantificación relativa de 3-nitrotirosina.....	33
3.2.7. Métodos de detección de ácidos grasos nitrados.....	33
3.2.8. Análisis de ácidos grasos nitrados en la LDL.....	34
3.2.9. Cuantificación de ácidos grasos nitrados por LC-MS/MS.....	35
3.2.10. Cromatografía en capa fina .....	35
3.2.11. Tratamiento con BME .....	36
3.2.12. Detección de cLA.....	36
4. Resultados .....	37
4.1. Optimización de métodos de HPLC-MS/MS para detección y cuantificación de ácidos grasos nitrados .....	37
4.1.1. Infusión directa .....	37

4.1.2.	Métodos cromatográficos. ....	42
4.1.3.	Acoplamiento HPLC-MS/MS .....	43
4.1.4.	Calibración .....	44
4.2.	Estudios en LDL .....	51
	Purificación de la LDL .....	51
	Caracterización de la LDL nitrada .....	52
4.2.1.	Cuantificación de alfa tocoferol.....	52
4.2.2.	Formación de carbonilos .....	55
4.2.3.	Formación de 3-nitrotirosina .....	56
4.2.4.	Nitración lipídica .....	57
4.2.4.1.	Procesamiento de muestras .....	57
4.2.4.2.	Detección de ácidos grasos nitrados.....	58
4.2.5.	Cuantificación de cLA en LDL .....	63
4.2.6.	Cuantificación de NO <sub>2</sub> -cLA en LDL nitrada.....	64
5.	Discusión y conclusiones .....	66
6.	Perspectivas .....	71
7.	Referencias bibliográficas .....	72

## Índice de figuras

Figura 1. <b>Modelo de estructura de apoB</b> .....	11
Figura 2. <b>Mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados</b> .....	23
Figura 3. <b>Estructura de ácidos grasos nitrados</b> . ....	24
Figura 4. <b>Mecanismo de adición de Michael</b> .....	26
Figura 5. <b>Espectro de masas <i>full scan</i> del [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA</b> .....	38
Figura 6. <b>Espectro de <i>enhanced resolution</i> del [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA</b> . ....	39
Figura 7. <b>Espectro de fragmentación del [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA</b> .....	41
Figura 8. <b>Optimización de energías de colisión</b> .....	41
Figura 9. <b>Análisis del [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA por HPLC-MS/MS</b> .....	44
Figura 10. <b>Curva de calibración de NO<sub>2</sub>-cLA</b> . ....	45
Figura 11. <b>Análisis de LNO<sub>2</sub> por espectrometría de masas</b> . ....	46
Figura 12. <b>Análisis de [D<sub>4</sub>,<sup>15</sup>N]OANO<sub>2</sub> por espectrometría de masas</b> .....	47
Figura 13. <b>Análisis de [<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]OANO<sub>2</sub> por espectrometría de masas</b> . ....	48
Figura 14. <b>Análisis de OANO<sub>2</sub> por espectrometría de masas</b> . ....	49
Figura 15. <b>Electroforesis en gel de agarosa</b> .....	52
Figura 16. <b>Análisis de αTOH</b> .....	53
Figura 17. <b>Cuantificación de αTOH</b> . ....	54
Figura 18. <b>Formación de carbonilos</b> . ....	55
Figura 19. <b>Formación de 3-nitrotirosina</b> .....	56
Figura 20. <b>Hidrólisis enzimática de triglicéridos y fosfolípidos de la LDL</b> . ....	57
Figura 21. <b>Análisis de ácidos grasos de la LDL por HPLC-MRM</b> . ....	59
Figura 22. <b>Reactividad con βME</b> .. ....	61
Figura 23. <b>Detección de NO<sub>2</sub>-cLA en LDL nitrada</b> .. ....	62
Figura 24. <b>Detección de cLA en LDL</b> .....	64
Figura 25. <b>Formación de NO<sub>2</sub>-cLA en LDL por infusión de ONOO<sup>-</sup></b> .....	65
Figura 26. <b>Esquema de la reacción carbonilo proteico con 2,4-dinitrofenilhidrazina</b> . 66	
Figura 27. <b>Esquema de nitración de tirosina por vía radicalar</b> .....	67

## 1. Resumen

Los ácidos grasos nitrados, en particular los nitroalquenos, son compuestos señalizadores que presentan potente acción anti-inflamatoria. En los últimos años se ha obtenido un conjunto de evidencias que demuestran que los procesos de nitración lipídica ocurren en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, generando una variedad de biomoléculas capaces de modular la respuesta celular inflamatoria. La detección de estos compuestos ha presentado dificultades porque los métodos utilizados no aportaron inicialmente la sensibilidad y reproducibilidad necesaria. Es por eso que uno de los objetivos que se plantea en este trabajo, implica la optimización de métodos de detección y cuantificación de ácidos grasos nitrados en muestras biológicas. Los métodos se valen del uso de equipamiento de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS/MS) y sus correspondientes estándares internos con isótopos pesados. Este trabajo tiene un especial interés en el estudio de la formación de ácidos grasos nitrados en la lipoproteína de baja densidad (LDL), que se proponen como moduladores de la capacidad pro-aterogénica de la misma. Es así que se estudian condiciones experimentales que favorezcan la nitración lipídica con respecto a la oxidación y nitración proteica, exponiendo LDL humana a diferentes agentes nitrantes que incluyen al peroxinitrito y nitrito en medio ácido. En estas condiciones experimentales, se comparan los niveles de ácidos grasos nitrados con respecto a los de 3-nitrotirosina, carbonilos presentes y antioxidantes (como marcadores de oxidación proteica y lipídica). Mediante análisis de HPLC-MS/MS se detectó la formación de ácidos grasos nitrados derivados del ácido linoleico conjugado (NO<sub>2</sub>-cLA) en una LDL tratada con peroxinitrito en infusión. Los resultados aquí encontrados alientan futuras investigaciones sobre el efecto biológico de los ácidos grasos nitrados en la LDL, y sobre el posible diseño de biopartículas de LDL conteniendo nitroalquenos para el tratamiento de aterosclerosis.

## 2. Introducción

### 2.1. Generalidades de lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos solubles de proteínas (apolipoproteínas) y lípidos que son transportados por el sistema circulatorio de todos los vertebrados, e inclusive insectos. Las lipoproteínas se sintetizan en el hígado e intestino, derivan de cambios metabólicos de otras lipoproteínas, o se ensamblan en membranas plasmáticas a partir de lípidos celulares y apolipoproteínas o lipoproteínas exógenas. En la circulación, las lipoproteínas son altamente dinámicas; participan en transferencia de lípidos (espontánea o facilitada por intercambiadores) y de apolipoproteínas solubles, el componente lipídico participa de reacciones enzimáticas, y sufren cambios conformacionales en respuesta a las variaciones en su composición. Finalmente, las lipoproteínas son absorbidas y catabolizadas en el hígado, riñón y tejidos periféricos por endocitosis mediada por receptor y otros mecanismos<sup>1</sup>.

A pesar de que el ensamblaje, la estructura, metabolismo e interacciones con receptores específicos dependen principalmente del componente proteico, las lipoproteínas se clasifican comúnmente en base a su densidad. En función de dicho criterio se encuentran las siguientes clases: quilomicrones (QM), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL, del inglés *Very Low Density Lipoprotein*), lipoproteína de baja densidad (LDL, del inglés *Low Density Lipoprotein*) y la lipoproteína de alta densidad (HDL, del inglés *High Density Lipoprotein*). El principal determinante de la densidad de estas partículas es la proporción (en masa) de proteína:lípido que varía desde 1:50 en QM hasta 1:1 en HDL (Tabla 1)<sup>1</sup>.

Tabla 1. Composición lipídica de las lipoproteínas (adaptada de Jonas *et al*<sup>1</sup>).

	QM	VLDL	LDL	HDL
<b>Densidad (g/mL)</b>	<0,94	0,94-1,006	1,006-1,063	1,063-1,210
<b>Lípidos totales (% m-m LDL)</b>	98-99	90-92	75-80	40-48
<b>Glicerolípidos (% m-m lípido)</b>	81-89	50-58	7-11	6-7
<b>Ésteres de colesterol (%m-m lípido)</b>	2-4	15-23	47-51	24-45
<b>Colesterol libre (%m-m lípido)</b>	1-3	4-9	10-12	6-8
<b>Fosfolípidos (FL, %m-m lípido)</b>	7-9	19-21	28-30	42-51
<b>Fosfatidil colina (FC, %m-m FL)</b>	57-80	60-74	64-69	70-81
<b>Esfingomielina (%m-m FL)</b>	12-26	15-23	25-26	12-14
<b>Liso-FC (%m-m FL)</b>	4-10	~5	3-4	~3
<b>Otros (%m-m FL)</b>	6-7	6-10	2-10	5-10

Las principales funciones de las lipoproteínas están determinadas por su apolipoproteína y componentes lipídicos. Los QM son sintetizados en el intestino para el transporte de triglicéridos de la dieta hacia varios tejidos. La VLDL se sintetiza en el hígado para la exportación de triglicéridos endógenos, mientras que la LDL surge de la metabolización de la VLDL en circulación. La principal función de la LDL es llevar colesterol a los tejidos periféricos e hígado. La HDL se sintetiza en el hígado e intestino o se forma por transformación metabólica de otras lipoproteínas en circulación, y de lípidos celulares en las membranas biológicas. La HDL remueve el colesterol en exceso de las células y lo transporta al hígado y tejidos esteroideogénicos para su posterior metabolización y excreción<sup>1</sup>.

## 2.2. Transporte de lípidos en sistema circulatorio

Este proceso comprende el transporte de lípidos de la dieta o endógenos, secretados por el intestino e hígado respectivamente, hacia los tejidos periféricos. Estas partículas son ricas en triglicéridos, contienen ésteres de colesterol y una única copia de la apolipoproteína B (apoB). Las proteínas sintetizadas por el intestino contienen una apoB trunca (apoB48) y se secretan vía linfa, mientras que el hígado secreta al torrente sanguíneo una lipoproteína (VLDL) que presenta la apoproteína completa, denominada

apoB100. En ambos casos, a través de vías similares, las lipoproteínas se remodelan en partículas cada vez más pequeñas y ricas en colesterol.

Los QM o VLDL recién sintetizados se liberan al sistema circulatorio en conjunto con otras apolipoproteínas como apoE, apoC-II y apoC-III, que se ensamblarán luego a las partículas que contienen apoB. Éstas son conocidas como proteínas intercambiables ya que también se obtienen por el intercambio con HDL. El proceso de remodelado de las lipoproteínas comienza cuando se acercan al endotelio por adhesión a los proteoglicanos. En esa situación, la apoC-II presente en la lipoproteína activa la enzima lipoproteína lipasa (LPL, del inglés *Lipoprotein Lipase*), que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos del núcleo hidrofóbico de la lipoproteína, liberando ácidos grasos que difunden a través del endotelio hacia las células musculares o el tejido adiposo, dependiendo de la situación. Este proceso de liberación de ácidos grasos se da de manera continua a través del tejido vascular, mientras que las partículas se vuelven cada vez más pequeñas (y densas). Para el caso de las lipoproteínas que contienen apoB100 (secretadas por el hígado como VLDL), existe otro paso de remodelación en el que la lipasa hepática también puede hidrolizar los triglicéridos liberando ácidos grasos. Luego de este procesamiento, la proporción de lípido en la partícula disminuye, lo que aumenta la probabilidad de que las apolipoproteínas intercambiables (apoE, apoC-II y apoC-III) puedan re-asociarse con la HDL. Es así que los remanentes de VLDL terminan en una lipoproteína de mayor densidad conteniendo únicamente apoB100, denominada LDL. Eventualmente la mayor parte de las partículas que contienen apoB son recicladas en el hígado a partir del reconocimiento por receptores LRP (del inglés *LDL Receptor-Related Protein*) o receptores de LDL (LDLr o receptor apoE/apoB). Sin embargo, existen otros destinos metabólicos; la LDL puede ser absorbida por tejidos periféricos para suplir de colesterol a las células. En una situación de mayor preocupación clínica, la LDL o los remanentes de QM pueden presentar patrones de reconocimiento para los receptores barreneros (*scavenger*) de macrófagos de la pared arterial y ser endocitados de forma desregulada (este proceso tiene gran relevancia en aterosclerosis y se explica con mayor detalle más adelante).

El ciclo de transporte del colesterol se complementa mediante la participación de la HDL. El hígado e intestino liberan apoA-I con muy baja proporción de lípidos. Una vez en

circulación, la apolipoproteína toma el exceso de colesterol de tejidos periféricos formando eventualmente una HDL (de especial importancia cuando se trata de macrófagos). El transporte de colesterol sucede por diferentes mecanismos. Inicialmente el exceso de colesterol en macrófagos activa la expresión de un transportador miembro de la familia de transportadores dependientes de unión a ATP (ABCA1, del inglés *ATP-binding cassette A1*) y una hidrolasa que es capaz de hidrolizar los ésteres de colesterol de las gotas lipídicas. El colesterol es transportado por el ABCA1 hacia la membrana plasmática en donde la apoA-I lo asocia, formando inicialmente una lipoproteína denominada HDL naciente. El ABCA1 continúa enviando colesterol hacia la membrana plasmática a la vez que la HDL naciente lo incorpora. El colesterol que queda libre sobre la superficie de la apoA-I es re-esterificado mediante la acción de la lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT, del inglés *Lecitin-Cholesterol Acyl Transferase*) y se dispone en el núcleo hidrofóbico de la lipoproteína, formando así una HDL<sub>3</sub> que presenta un estructura más redondeada y cargada de lípidos. Este subtipo de HDL, es capaz de cargar colesterol existente en la membrana plasmática de los macrófagos mediante la participación del receptor barrendero B1 (SR-BI, del inglés *Scavenger Receptor-B1*) o colesterol de balsas lipídicas y cavéolas. En ambos casos la LCAT que se encuentra en la HDL<sub>3</sub>, es capaz de formar ésteres de colesterol formando eventualmente una HDL rica en ésteres de colesterol denominada HDL<sub>2</sub>. De esta manera la HDL favorece el eflujo de colesterol de los macrófagos de la pared arterial. Además, la HDL formada es capaz de intercambiar colesterol con las lipoproteínas ricas en triglicéridos con ayuda de una proteína intercambiadora de ésteres de colesterol con triglicéridos (CETP, del inglés *Cholesterol Ester Transfer Protein*). Esto resulta en un enriquecimiento en triglicéridos por parte de la HDL mientras que las apoB se enriquecen en colesterol. La HDL<sub>2</sub> tiene tres destinos posibles: 1) la lipasa hepática hidroliza los triglicéridos y se convierte en HDL<sub>3</sub> nuevamente, 2) es reconocida por SR-BI en el hígado y se transporta el colesterol hacia los hepatocitos, convirtiéndose nuevamente en HDL<sub>3</sub>, 3) se cataboliza por el hígado. Estos sistemas complementarios de transporte lipídico funcionan en forma coordinada para mantener la homeostasis lipídica del organismo.

### 2.3. Lipoproteína de Baja Densidad (LDL)

Las lipoproteínas de baja densidad son partículas esféricas con un diámetro de 19 – 23 nm, constituyendo la población de lipoproteínas que poseen una densidad entre 1,006 y 1,063 g/mL. Estas partículas están especializadas en el transporte de lípidos en sangre. Cada partícula contiene una única apoB100, una proteína de ~550 kDa, contiene 37 triptófanos, 152 tirosinas y 78 metioninas (aminoácidos susceptibles de oxidación) y en su conformación nativa presenta 4 cisteínas reducidas (el resto forma enlaces disulfuro). Además se le asocian unas miles de moléculas de lípidos. Se estima que una partícula de LDL contiene, en promedio, 600 moléculas de colesterol, 1600 moléculas de ésteres de colesterol, 700 moléculas de fosfolípidos, 180 moléculas de triglicéridos. El peso molecular de la LDL es variable dependiendo de su composición pero se aproxima a los  $3 \times 10^6$  Da. La LDL tiene un núcleo hidrofóbico formado principalmente por ésteres de colesterol y triglicéridos. Una monocapa de fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina y esfingomielina) y colesterol libre, rodean el núcleo, y junto con la apoB100 forman la partícula de LDL.

La apoB100 provee del marco estructural para el ensamblaje de la LDL. La estructura exacta de la proteína en la lipoproteína no ha sido elucidada debido a su hidrofobicidad y gran tamaño. En base a estudios de mapeo de los epítopes de anticuerpos anti apoB por microscopía electrónica, se ha sugerido la presencia de una estructura tipo “cinta y moño” (del inglés *ribbon and bow*) en una partícula de LDL esférica<sup>2</sup>. En este modelo, la mayor parte de la secuencia de la apoB100 da una vuelta en torno a la partícula, de manera tal que envuelve como una cinta a la esfera, y el 11% del extremo C-terminal forma un *loop* que gira hacia atrás, hacia el sitio de unión al LDLr, formando un “moño”. Este modelo sugiere que la secuencia que forma parte del *loop* se mueve hacia fuera de la partícula durante la lipólisis, exponiendo así el sitio de reconocimiento de la LDL al LDLr. Este modelo de la apoB100 envolviendo a la partícula esférica ha sido consistente con análisis de escaneo de neutrones y reconstrucciones tridimensionales basadas en múltiples imágenes de microscopía crioelectrónica. También se han aplicado modelos computacionales originalmente diseñados para buscar homología de secuencia, a la apoB humana con el fin de dilucidar posibles estructuras tridimensionales<sup>3</sup>. Dichos estudios revelaron la presencia de dominios hidrofóbicos ricos en prolina y regiones de

repetidos de hélices alfa. Con estas técnicas, se desarrolló un modelo para la apoB en el que los 1000 aminoácidos del extremo N-terminal presentan un dominio globular (denominado  $\beta\alpha_1$ ), seguido de dominios cadena- $\beta$  y  $\alpha$ -hélices alternados (Figura 1). El modelo se comparte para las secuencias de apoB100 de ocho vertebrados diferentes (gallina, rana, hámster, mono, ratón, chanco, rata y conejo), a pesar de existir poca conservación en la secuencia de aminoácidos de cada especie. Un bolsillo lipídico se propuso para la iniciación del reclutamiento de lípidos por secuencias N-terminal<sup>3</sup>. La correlación del modelo con los datos experimentales sugiere que  $\beta_1$  y  $\beta_2$  están en directo contacto con los lípidos neutros del núcleo hidrofóbico de la lipoproteína, y que esos dominios ricos en cadenas  $\beta$ , determinan el diámetro de la partícula. Recientemente se ha postulado la estructura de la LDL humana a 37 °C en su conformación nativa con una resolución de 16 Å usando microscopía crio-electrónica<sup>4</sup>. En ella se revela la importancia de los ésteres de colesterol en el efecto de la temperatura sobre la forma global de la lipoproteína y se confirman modelos ya establecidos.

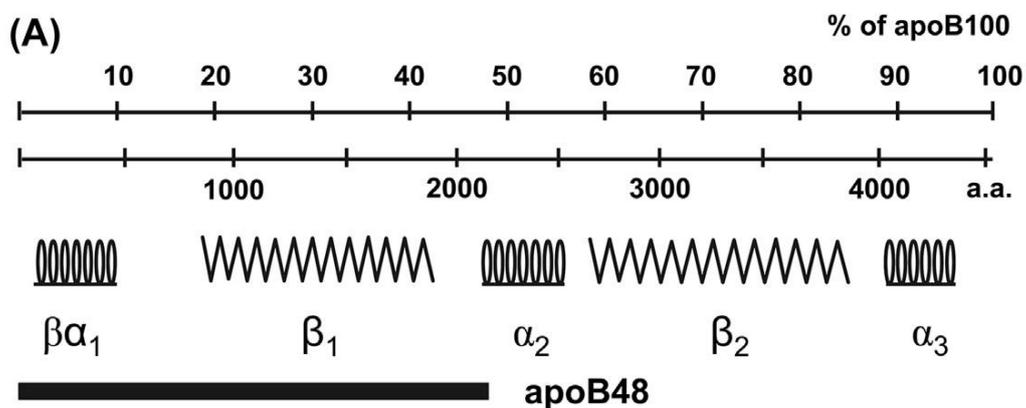


Figura 1. **Modelo de estructura de apoB.** Se representa un esquema del modelo planteado por Segrest *et al.* La posición de los dominios se indica sobre una escala porcentual (% de apoB100) o por número de aminoácido (a.a). En línea gruesa se representa la ubicación de la apoB48 como referencia<sup>5</sup>.

## 2.4. LDL en aterosclerosis

Cuando las lipoproteínas apoB se producen en exceso o cuando los mecanismos de re-captación no funcionan adecuadamente, éstas se acumulan en el plasma. Esto

representa un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, incluyendo infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares y enfermedades vasculares en general. En la clínica, todas las lipoproteínas que contienen apoB son consideradas como factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis<sup>5</sup>. La aterosclerosis y sus complicaciones cardiovasculares constituyen la principal causa de morbimortalidad en las sociedades occidentales<sup>6</sup>. En la actualidad, en Uruguay este tipo de enfermedades constituyen la primera causa de muerte por encima del cáncer, enfermedades respiratorias y los accidentes<sup>7</sup>. La aterosclerosis afecta las principales arterias del organismo por acumulación de lípidos y elementos fibrosos en su pared. En sus etapas avanzadas y clínicamente significativas, esta enfermedad constituye una enfermedad inflamatoria crónica<sup>8</sup> con estrés oxidativo vascular caracterizado por la oxidación de lípidos y proteínas en la pared vascular y la pérdida de la función normal del endotelio<sup>9</sup>. La oxidación, adhesión aumentada y alteración en el metabolismo de las lipoproteínas, son eventos clave asociados al desarrollo de la lesión<sup>10,11</sup>. La oxidación lipídica se propone como una lesión temprana, considerando que la modificación de la LDL le confiere características proaterogénicas<sup>12-14</sup>. La hipótesis de la modificación oxidativa en la aterosclerosis ha sido sustentada por evidencias que muestran que la oxidación de la LDL es un proceso que ocurre *in vivo*, que se relaciona con el riesgo cardiovascular y que contribuye a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Uno de los puntos críticos en el desarrollo de la aterosclerosis es la fagocitosis descontrolada de LDL por macrófagos, que lleva a la formación de células espumosas. Los macrófagos tienen mecanismos de protección contra los efectos tóxicos del exceso de colesterol, como ser la regulación a la baja de la expresión de receptores de LDL (receptor apoE/apoB) en la superficie celular cuando se completan las reservas intracelulares de colesterol<sup>15</sup>. Sin embargo, en ciertas condiciones, la LDL puede ser oxidada y esta partícula de LDL oxidada (oxLDL) puede de ser reconocida por los receptores barrenderos, cuya expresión no disminuye en presencia de un exceso intracelular de colesterol. Esta endocitosis descontrolada lleva al macrófago a desarrollar el fenotipo de célula espumosa y contribuye de manera importante al desarrollo de la placa de ateroma<sup>16</sup>.

Es generalmente aceptado que los procesos de oxidación de la LDL no suceden en el plasma debido a la presencia de antioxidantes tales como tocoferol, ascorbato y ácido úrico en concentraciones elevadas<sup>16</sup>. En cambio, se propone que la mayor parte de los procesos oxidativos suceden en el espacio subendotelial de la pared arterial, en donde la LDL puede ser secuestrada por proteoglicanos y la concentración de antioxidantes es mucho más baja que en plasma. Los sitios más favorables para la oxidación de la LDL son los sitios de inflamación vascular, ya que en ellos hay un aumento en la permeabilidad del vaso que trae como consecuencia el aumento en la cantidad de LDL que pasa a la íntima. Además se produce una infiltración de neutrófilos y monocitos/macrófagos, que son activados por señales inflamatorias y producen especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Dentro de las especies reactivas formadas encontramos radicales como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ) y el óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ). Además se forman otras especies oxidantes no radicalares de relevancia fisiológica como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ; producto de la reacción del  $O_2^{\bullet-}$  y  $^{\bullet}NO$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). (Debido al interés de las especies reactivas derivadas del oxígeno y nitrógeno para este trabajo, en el punto 2.5 se detalla sus fuentes de formación y efectos sobre distintas biomoléculas). Varias de estas especies reactivas oxidan a los ácidos grasos poliinsaturados generando productos altamente reactivos que son capaces de modificar a la apoB100 y alterar su reconocimiento por los receptores celulares normales. En la pared arterial una fuente importante de los oxidantes son formados por vía enzimática a través de la NADPH oxidasa, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, mieloperoxidasa (MPO) y la lipoxigenasa, enzimas que se encuentran presentes en las lesiones ateroscleróticas<sup>16</sup>.

El término LDL oxidada (LDLox) es utilizado para referirse a una amplia variedad de preparaciones de LDL que han sido oxidadas *ex vivo* bajo condiciones definidas, o aisladas de muestras biológicas. El mayor problema surge al comparar los resultados de estudios que emplean LDLox que provienen de diferentes grupos de trabajo y utilizan distintos protocolos de purificación. No existe una forma ideal de preparar la LDLox *ex vivo* y las preparaciones aisladas de tejidos difieren significativamente en términos de composición y efectos biológicos<sup>16</sup>. De todas maneras existe una clasificación arbitraria en la que se definen dos grandes grupos de LDL: LDLmm, que hace referencia a una LDL

mínimamente modificada, y LDLox, que hace referencia a una LDL altamente oxidada. La gran diferencia entre estos grupos es que la LDLmm es reconocida por el receptor de LDL, pero no es reconocida por la mayoría de los receptores barrenderos conocidos. Por otro lado, las preparaciones de LDLox son reconocidas por una amplia variedad de receptores barrenderos. La LDLmm es lo suficientemente modificada como para ser distinguida de la LDL nativa pero, sin embargo, no es reconocida por los receptores barrenderos y sí lo es por el receptor de LDL. Se distingue de la LDL nativa en cuanto a que induce proteínas quimotácticas y pro-inflamatorias en células endoteliales y macrófagos. Las propiedades son diversas y se destacan algunas en la Tabla 2. La LDLox no es reconocida por el receptor de LDL, y sí se reconoce por los receptores barrenderos.

En la LDL, tanto el componente lipídico como la apoB100 son susceptibles de modificaciones oxidativas. Los lípidos que sufren oxidaciones en la LDL son varios y a continuación se mencionan algunos de los productos de oxidación revisados en Levitan *et al*, 2010<sup>16</sup>. Parte de los productos de oxidación de fosfolípidos que han sido descritos comprenden: lisofosfatidilcolina, ácido lisofosfatídico, fosfolípidos con cadenas acil-graso en posición sn2 que son cortas (producto de ruptura por oxidación) o que presentan modificaciones como hidroxil- o hidroperoxilaciones. Estos productos presentan diferentes efectos biológicos entre los que se destacan adhesión monocitaria, inducción de interleuquina-8, MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos-1, del inglés *Monocyte Chemotactil Protein-1*) y agregación plaquetaria. También se han descrito productos de esfingolípidos, como ceramida, esfingosina o esfingosina fosfato que promueven agregación de LDL y mitogénesis de células musculares lisas. Aldehídos libres como malondialdehído e hidroxinonal son capaces de inducir expresión de MCP-1, ciclooxigenasa-2 (COX2) y del factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta). La apoB100 se modifica por reacciones de adición de alguno de los productos de oxidación lipídica ya mencionados, en alguno de los grupos funcionales de aminoácidos reactivos como la Lys, Cys, His, Trp y Tyr. Se ha visto que estos productos están implicados en la antigenicidad de la LDLox y en el reconocimiento por receptores barrenderos, al mismo tiempo que son responsables de la pérdida de reconocimiento por el receptor de LDL (apoE/apoB).

Beckman (1994)<sup>17</sup> detectó por primera vez 3-nitrotirosina en células espumosas de lesiones de arterias coronarias humanas, lo que llevó a pensar que especies reactivas derivadas del nitrógeno estarían implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis. Años más tarde se encontró que los niveles de LDL nitrada (a nivel de la proteína) en lesiones de aorta humana son 90 veces más grandes que en pacientes sanos<sup>18</sup>. Por otra parte, una breve exposición de la LDL a MPO es suficiente para convertir la LDL a una forma reconocida por el receptor CD36, pero se requiere larga exposición para que sea reconocida por SR-AI. Los lípidos extraídos de la LDL nitrada demostraron ser importantes competidores de la LDL nitrada por la unión a CD36<sup>15</sup>.

Tabla 2. **Propiedades de diferentes preparaciones de LDLmm** (adaptada de Levitan *et al* <sup>16</sup>)

<b>Método</b>	<b>Composición</b>	<b>Receptor</b>	<b>Comentarios</b>	<b>Ref.</b>
<b>LDL conservada a 4 °C en oscuridad por 3-6 meses</b>	3 nmol TBARS, 6 nmol Colesterol epóxido y 2 nmol peróxidos/mg colesterol	LDLr	No detectan aumento en dienos conjugados ni en movilidad electroforética.	19,20
<b>LDL tratada con 1 µM FeSO<sub>4</sub> por 96 h o 0,5 µM FeSO<sub>4</sub> por 48 h a Tamb</b>	5-10 nmol TBARS/mg colesterol; formación de POVPC y PGPC	LDLr	Aumento en dienos conjugados; Reacciona contra el anticuerpo DLH3	20,21
<b>Tratamiento con células expresantes de 15-LOX</b>	12,6 nmol TBARS/mg proteína; disminución del 7% de AG 18:2; leve pérdida de proteína	LDLr, CD14		22,23
<b>Tratamiento con LOX</b>	PL y ésteres de colesterol oxidados		Producen activación de macrófagos	24
<b>Tratamiento con hemoglobina en hipoxia</b>			Aumento de movilidad electroforética; estimula proliferación celular	25
<b>Oxidación limitada con Cu<sup>2+</sup></b>	2,3 nmol TBARS/mg ¿?	LDLr	Inhibe LCAT	26
<b>LDL aislada de plasma</b>	4,6 nmol TBARS/mg Colesterol; enriquecida en oxisteroles e hidroperóxidos lipídicos.		Aumento en movilidad electroforética	27
<b>Modificación por HOCl (MPO)</b>	Aumento en hidroperóxidos lipídicos, no aumento de TBARS y se mantiene vit E.		Aumento de movilidad electroforética	28,29

## 2.5. Especies reactivas del nitrógeno y oxígeno de relevancia biológica

Las especies reactivas del nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) son un grupo de moléculas que incluyen al  $\cdot\text{NO}$ ,  $\cdot\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  y trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) entre otros. Son compuestos altamente reactivos y pueden reaccionar con biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN, dando lugar a modificaciones químicas que pueden producir alteraciones de función o estructura<sup>30</sup>.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) son moléculas reactivas derivadas del oxígeno molecular que se forman como subproducto natural del metabolismo aerobio. Actualmente, es ampliamente aceptado el hecho de que las ROS juegan un papel fisiológico crucial no solo en varios estados patológicos sino también en la homeostasis celular. Bajo condiciones normales, las concentraciones de ROS se encuentran estrechamente controladas por moléculas antioxidantes manteniéndolas en niveles que les permiten participar como segundos mensajeros en la transducción de señales. Sin embargo, cuando se producen excesivamente, o cuando los niveles de antioxidantes se encuentran agotados, las ROS pueden causar daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las ROS pueden ser tanto de naturaleza radicalar como no radicalar<sup>31</sup>

### 2.5.1. Superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

La formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  puede considerarse como el paso inicial para la formación de otras ROS. Es generado por la reducción monoelectrónica del  $\text{O}_2$ , y en comparación con otros radicales, es una especie poco reactiva<sup>32</sup>. Puede actuar como agente oxidante ( $E_{\text{O}_2^{\cdot-}, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2}^{\text{O}'_2} = +0,94 \text{ V}$ ) así como también como un agente reductor ( $E_{\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}}^{\text{O}'_2} = -0,33 \text{ V}$ ). Al ser una especie cargada en condiciones fisiológicas ( $\text{pK}_a = 4,8$ ), no puede atravesar libremente las membranas biológicas, aunque puede hacerlo a través de canales aniónicos. En medios acuosos a pH neutro puede ocurrir dismutación espontánea del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  con una constante de velocidad del orden de  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (33). Sin embargo, el destino del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a nivel celular está determinado principalmente por la actividad de varias enzimas sitio-específicas: la familia de las superóxidos dismutasas (SOD), que convierten al  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{O}_2$  y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) con una constante de velocidad de  $1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Ec. 1)<sup>32</sup>. También existe otro destino del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a destacar,

que es la reacción con el óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) para dar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ , Ec. 2) con una constante de velocidad de  $k = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , por lo que éste puede competir con las SOD por el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  <sup>(34)</sup>.



A pesar de ser éstas las principales vías de consumo de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , existen otras reacciones directas entre el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y blancos celulares, capaces de producir daño a biomoléculas. Sin embargo, los principales efectos citotóxicos del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se dan a través de la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{ONOO}^-$  <sup>35</sup>.

La formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se da principalmente en la mitocondria y fagosomas. A nivel mitocondrial, se genera por la reducción mono-electrónica del  $\text{O}_2$  por componentes de la cadena transportadora de electrones. Dentro de los fagosomas, la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se da durante la activación del fagocito a través de la activación del complejo NADPH oxidasa (NOX), que cataliza la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a partir de NADPH y  $\text{O}_2$  <sup>(36)</sup>.

### 2.5.2. Óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )

El  $\cdot\text{NO}$  es producido por una gran variedad de tipos celulares mediante las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas e inducibles, y cumple diversos roles fisiológicos como la regulación del tono vascular, neurotransmisión y la modulación de procesos inflamatorios. Sin embargo, la producción excesiva de  $\cdot\text{NO}$  es capaz de producir daño tisular. A pesar de ser un radical, el  $\cdot\text{NO}$  tiene una reactividad selectiva, reaccionando predominantemente con otras especies paramagnéticas como hierro férrico o ferroso en hemoproteínas o centros ferrosulfurados,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y radicales lipídicos o proteicos. Su auto-oxidación por reacción con  $\text{O}_2$  resulta en la formación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como producto final en medios acuosos, a través de un mecanismo propuesto según como se ilustra en Ec. 3-7 <sup>(30)</sup>. Es importante destacar la formación del trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) como intermediario inestable de la auto-oxidación de

$\cdot\text{NO}$ . A pesar de reaccionar directamente con ciertos blancos intracelulares, su principal potencial citotóxico radica en la formación de especies de mayor reactividad durante su oxidación, principalmente  $\text{ONOO}^-$ , y radical dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ )<sup>30</sup>.

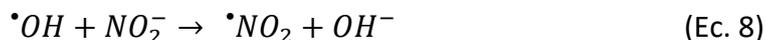


### 2.5.3. Dióxido de nitrógeno radical ( $\cdot\text{NO}_2$ )

El  $\cdot\text{NO}_2$  participa en una variedad de reacciones, que incluyen la recombinación con otras especies radicalares, la adición a dobles enlaces, la transferencia electrónica y la abstracción de átomos de H de enlaces C-H de compuestos insaturados, fenoles y tioles. Las constantes de velocidad de las reacciones de recombinación del  $\cdot\text{NO}_2$  con un gran número de radicales están cercanas a la limitación por difusión ( $> 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ); son de particular relevancia las reacciones de recombinación del  $\cdot\text{NO}_2$  con radicales lipídicos y proteicos para producir lípidos y proteínas nitradas<sup>37</sup>.

El  $\cdot\text{NO}_2$  puede formarse directamente a partir de la auto-oxidación del  $\cdot\text{NO}$ , que en última instancia produce  $\text{NO}_2^-$ . Este mecanismo sería fisiológicamente importante solo bajo condiciones de una producción excesiva de  $\cdot\text{NO}$ , o en entornos hidrofóbicos en los que el  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2$  se concentran debido a la mayor solubilidad en dicho ambiente. En determinadas situaciones, el  $\text{NO}_2^-$  también puede generar  $\cdot\text{NO}_2$ . En entornos ácidos, el  $\text{NO}_2^-$  se protona dando  $\text{HNO}_2$  ( $\text{pKa} = 3,46$ ). Éste forma  $\text{N}_2\text{O}_3$  que es inestable y produce  $\cdot\text{NO}_2$  y  $\cdot\text{NO}$  (Ec. 6 sentido inverso).

Otro mecanismo de formación de  $\cdot\text{NO}_2$  es a partir de la oxidación monoelectrónica de  $\text{NO}_2^-$  catalizada por diversas hemoperoxidasas en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ej mieloperoxidasa y peroxidasa de eosinófilo) o por sistemas de Fenton, que producen  $\cdot\text{OH}$  (Ec. 8).



Por último, también puede generarse a partir de la descomposición por homólisis de  $\text{ONOO}^-$ , ya sea mediante su protonación o tras reacción con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) o metales de transición<sup>37</sup> (ver siguiente punto).

#### 2.5.4. Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

El  $\text{ONOO}^-$  es una especie oxidante de corta vida media que, como se menciona anteriormente, se produce por la reacción controlada por difusión entre el  $\cdot\text{NO}$  y el  $\text{O}_2\cdot^-$ . El anión  $\text{ONOO}^-$  es la base conjugada del ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ); dado que el pKa es de 6,8, ambas especies coexisten en pH fisiológico. Tanto el  $\text{ONOO}^-$  como el  $\text{ONOOH}$  pueden participar directamente en oxidaciones por uno o dos electrones con biomoléculas, en particular con metales de transición y tioles. Uno de los blancos principales del  $\text{ONOO}^-$  en sistemas biológicos es el  $\text{CO}_2$ , que lleva a la formación del aducto nitrosoperoxocarboxilato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ , Ec. 10). Dicho compuesto decae espontáneamente a  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{CO}_2$ , pero también produce un radical anión carbonato ( $\text{CO}_3\cdot^-$ ) y  $\cdot\text{NO}_2$  con un rendimiento de aproximadamente 35 % (Ec. 11), capaces de participar en procesos de oxidación por un electrón. Alternativamente, el  $\text{ONOOH}$  puede experimentar una ruptura homolítica del enlace O-O (homólisis catalizada por protón) generando  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$  con un rendimiento del 30 % (Ec. 12), el resto decae a  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, esta reacción es lenta ( $0,9 \text{ s}^{-1}$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH 7,4) en comparación con las reacciones directas del  $\text{ONOO}^-$  y el  $\text{ONOOH}$  con otros blancos presentes en sistemas biológicos, constituyendo un componente menos relevante de la reactividad *in vivo* del peroxinitrito<sup>38</sup>.

Más allá de los blancos mencionados, numerosas biomoléculas son oxidadas y/o nitradas por los radicales derivados del peroxinitrito, como son los residuos de tirosina, los tioles, el ADN y los ácidos grasos insaturados. Estas modificaciones dependientes de

radicales derivados del peroxinitrito suelen ser procesos de bajo rendimiento debido al gran número de reacciones en las que pueden participar especies como el  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  y el  $\bullet\text{NO}_2$ , y también debido a la existencia de moléculas atrapadoras de los mismos, principalmente de glutatión<sup>38</sup>.



## 2.6. Mecanismos de nitración de lípidos.

La bioquímica de la nitración de ácidos grasos insaturados se basa en reacciones del  $\bullet\text{NO}$ , especies derivadas de  $\bullet\text{NO}$  ( $\bullet\text{NO}_2$  y  $\text{ONOO}^-$ ) y ROS, como el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y radicales lipoperoxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ )<sup>39,40</sup>. La formación de especies derivadas del  $\bullet\text{NO}$  y las reacciones subsiguientes que median la nitración de biomoléculas, depende esencialmente de la concentración de  $\bullet\text{NO}$ , la tensión de  $\text{O}_2$ , el sitio de generación, la concentración local de los blancos de nitración, presencia de catalizadores y atrapadores, así como de la partición de estos compuestos entre compartimientos hidrofóbicos e hidrofílicos<sup>40</sup>. Estos factores son reflejo del estado metabólico celular, condiciones de inflamación y son los que en última instancia regulan el alcance de la oxidación, nitración y nitrosación de moléculas.

Existen múltiples mecanismos que promueven la nitración de biomoléculas. Se han reportado mecanismos de nitración de ácidos grasos insaturados aunque el mecanismo *in vivo* no ha sido elucidado aún<sup>34,39</sup>. En particular, los lípidos insaturados o radicales lipídicos pueden reaccionar con el  $\bullet\text{NO}_2$ , dando como producto derivados lipídicos isomerizados, oxidados, nitrados, dinitrados o nitro-hidroxiados<sup>34,41</sup>. Desde reportes iniciales se describen posibles mecanismos de nitración de ácidos grasos por  $\bullet\text{NO}_2$ <sup>42-44</sup>. En este mecanismo, se propone un ataque homolítico del  $\bullet\text{NO}_2$  al doble enlace produciendo un radical nitro-alquilo que, en baja tensión de  $\text{O}_2$ , puede combinarse con

otro  $\cdot\text{NO}_2$  para formar un derivado nitro/nitrito del ácido graso. Los nitroalquenos se producirían a partir de estas especies mediante la pérdida de ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), mientras que la hidrólisis de este grupo produce derivados nitro hidroxilados. Dado que el  $\cdot\text{NO}_2$  también puede iniciar la peroxidación lipídica, el grado de nitración dependerá esencialmente de la tensión de oxígeno. El grado de nitración del ácido graso dependerá entonces de los niveles de  $\text{O}_2$ : a bajas concentraciones predomina la formación de nitroalquenos mientras que en altas concentraciones de  $\text{O}_2$  predominarán los procesos de oxidación que concluyen en formación de hidroperóxidos lipídicos (que decaen a alcoholes) o isomerización del doble enlace.

Diversos estudios han demostrado la formación de nitroalquenos en muestras biológicas. Éstos derivan de ácidos grasos tales como el oleico, linoleico y araquidónico y debido al mecanismo de formación que presentan, se forman como mezclas de isómeros de posición del grupo nitro, encontrándose dos isómeros por doble enlace. Las estructuras de algunos de ellos se representan en la Figura 3.

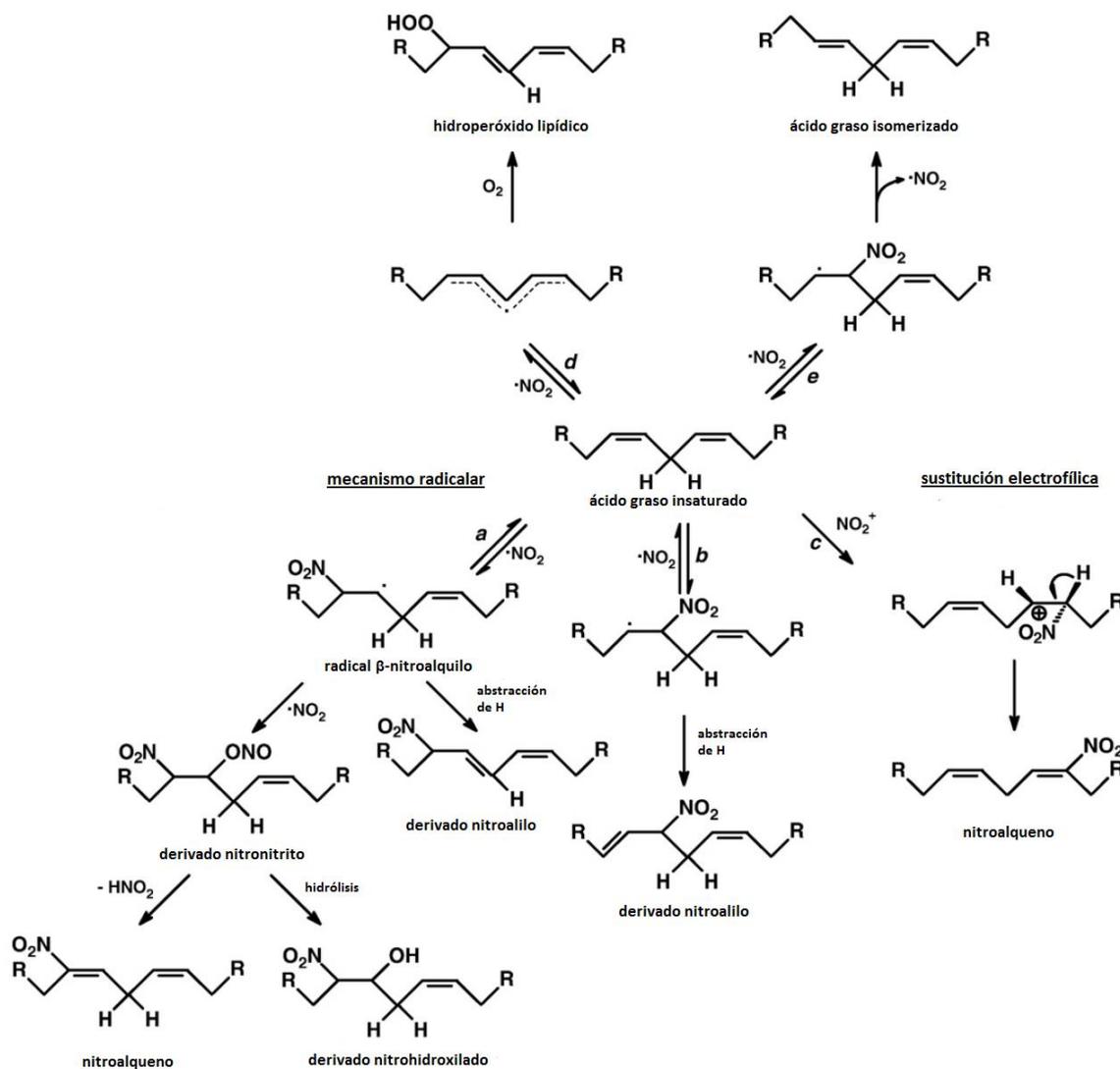


Figura 2. **Mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados.** a) El  $\cdot\text{NO}_2$  reacciona con el ácido graso insaturado mediante una vía radicalar produciendo un radical  $\beta$ -nitroalquilo que combina con otro  $\cdot\text{NO}_2$  formando un intermediario nitro/nitrito. Luego, la pérdida de  $\text{HNO}_2$  o hidrólisis del grupo nitrito dan como producto un nitroalqueno o un derivado nitrohidroxilado, respectivamente. b) El radical  $\beta$ -nitroalquilo puede formar un nitroalilo por abstracción de un átomo de H. c) De forma alternativa, un mecanismo de sustitución electrofílica al doble enlace por ion nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ) también produce nitroalquenos. d) El  $\cdot\text{NO}_2$  y otros radicales formados durante estrés nitrooxidativo pueden iniciar oxidación lipídica que conlleva a la formación de hidroperóxidos que derivan en mediadores secundarios y toxinas tales como aldehídos. e) El  $\cdot\text{NO}_2$  promueve la isomerización *trans* del doble enlace (figura adaptada de Rubbo *et al*, 2008<sup>34</sup>).

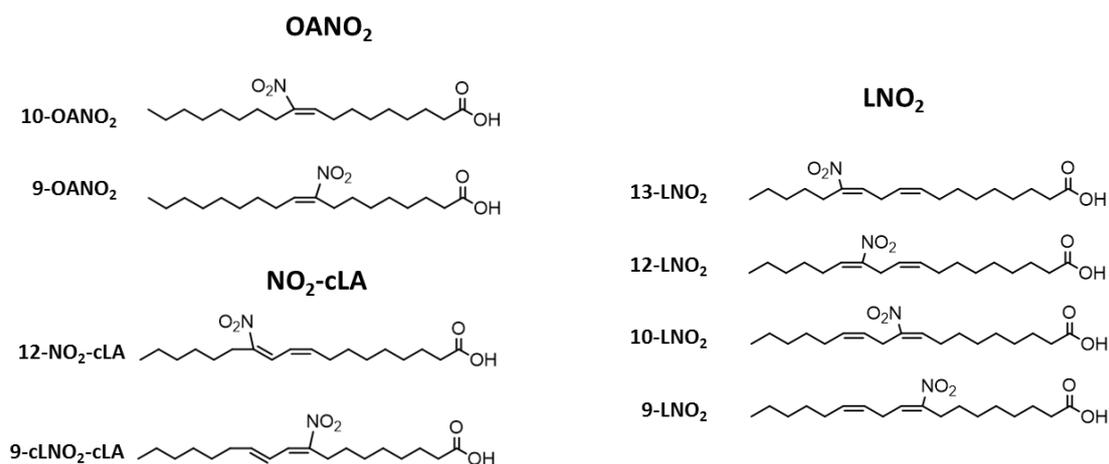


Figura 3. **Estructura de ácidos grasos nitrados.** Se representan los distintos isómeros de los nitroalquenos derivados del ácido oleico (OANO<sub>2</sub>), ácido linoleico (LNO<sub>2</sub>) y ácido linoleico conjugado (NO<sub>2</sub>-cLA). Para el caso del cLA, se representan únicamente los isómeros más abundantes en muestras biológicas según Bonacci *et al*, 2012 <sup>44</sup>.

En particular, estudios de nuestro grupo de trabajo mostraron que las reacciones de oxidación y nitración que pueden desencadenarse durante los procesos inflamatorios pueden conducir a la nitración de lípidos en macrófagos; en efecto, durante la activación de macrófagos se observa la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) asociada a la nitración del éster de colesterol del ácido linoleico a colesteril-nitrolinoleato (CLNO<sub>2</sub>)<sup>45</sup>. Los productos de nitración de ácidos grasos insaturados, en particular los nitroalquenos, han mostrado multiplicidad de efectos sobre la función de una variedad de tipos celulares, incluyendo células inflamatorias. Estos efectos incluyen la liberación de <sup>•</sup>NO y la vasorelajación dependiente de guanosina monofosfato cíclico (GMPc)<sup>30,34,46</sup>. Por otro lado, se han descrito diferentes efectos de tipo anti-inflamatorio inducidos por los nitroalquenos: a modo de ejemplo, el nitrolinoleato (LNO<sub>2</sub>) es capaz de inhibir la producción de O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, la degranulación y la movilización de calcio, así como la expresión de CD11b inducida en neutrófilos por varios estímulos. Además, se han descrito efectos moduladores de los nitroalquenos sobre el macrófago, incluyendo el apagamiento de la NOS2 así como la inhibición en la secreción de interleuquinas y citoquinas proinflamatorias<sup>45,47</sup>. Los derivados nitrados de ácidos grasos también son capaces de suprimir la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1, resultando en una disminución del rodado y de la adhesión de monocitos y una inhibición de la

infiltración de los mismos. Al menos parte de los mecanismos antiinflamatorios detallados podrían explicarse por la capacidad de los nitroalquenos de inhibir el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, ya que estos compuestos electrofílicos son capaces de interferir con la activación/translocación de NF- $\kappa$ B por nitroalquilación de la subunidad p65, inhabilitando su unión a la región promotora de genes inflamatorios<sup>34,46</sup>. Por otro lado, la enzima hemooxigenasa-1 (HO-1) es potentemente inducida por nitroalquenos en células endoteliales y macrófagos<sup>34,46</sup>. Esta enzima cataliza la degradación del grupo hemo hacia biliverdina, hierro y CO, desempeñando un rol protector central durante la inflamación. La capacidad de los nitroalquenos de inducir la HO-1 podría explicar algunos de los efectos observados sobre la regulación negativa de la NOS2 y de las citoquinas inflamatorias.

Los nitroalquenos, debido a su carácter electrofílico, tienen la capacidad de formar productos de adición con proteínas mediante reacciones de nitroalquilación, causando alteraciones en la estructura y función, como se ha observado para la catepsina B, la insulina o la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa<sup>48</sup>. Su reactividad electrofílica radica en el carbono  $\beta$  adyacente al carbono que está unido al grupo nitro, y esta propiedad promueve la reacción con nucleófilos (por ejemplo residuos Cys e His) vía el mecanismo conocido como reacción de Michael, conduciendo a nuevas estructuras con unión carbono-carbono o carbono-heteroátomo (Figura 4). La formación de aductos parece ser un destino importante de estas moléculas y en este sentido Rudolph *et al* reportaron la adición del ~90% de ácido nitro-oleico (ONO<sub>2</sub>) a macromoléculas del plasma a los 5 min luego de su inyección en ratones C57BL/6<sup>49</sup>. Otro ejemplo de regulación mediante adición de los nitroalquenos a proteínas es la modulación de la activación del factor de transcripción Nrf-2, que dirige la transcripción de varios genes citoprotectores incluyendo HO-1. Se ha propuesto que los nitroalquenos son capaces de interaccionar directamente con Keap1, conduciendo a la activación de Nrf-2<sup>34,46,50</sup>. De la misma forma, se ha observado que los nitroalquenos inducen efectos notorios sobre las cascadas de señales que involucran a MAPK y JNK; algunas proteínas tirosina fosfatasas contienen un motivo en un sitio activo que incluye una cisteína con bajo pKa, propiedad que promueve la reactividad nucleofílica y la susceptibilidad a la nitroalquilación. Por último es de destacar que los nitroalquenos tienen capacidad de

ligarse con alta afinidad a los receptores nucleares PPAR (del inglés, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), siendo agonistas robustos de los receptores PPAR-gama y en menor medida de PPAR-alfa y PPAR-delta<sup>51</sup>, modulando eventos de señalización celular que regulan la adipogénesis, homeostasis de la glucosa en adipocitos, así como expresión de CD36 en macrófagos.

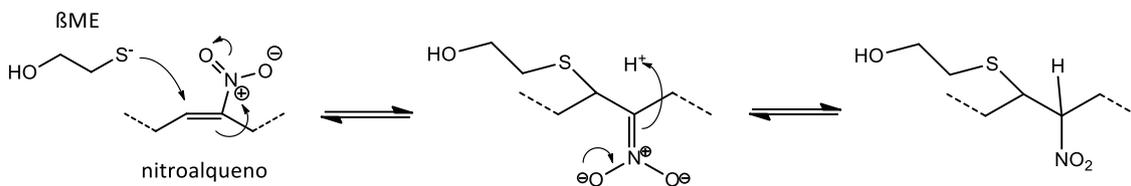


Figura 4. **Mecanismo de adición de Michael.** Se ilustra la reacción de adición nucleofílica del grupo tiolato del  $\beta$ ME sobre el carbono electrofílico en posición beta del nitroalqueno.

## 2.7. Espectrometría de masas aplicada a la detección de ácidos grasos nitrados

Las primeras demostraciones de formación de ácidos grasos nitrados a partir de  $\cdot\text{NO}_2$  se valieron del empleo de la espectrometría de masas como técnica de detección junto con NMR e IR.<sup>42,52-54</sup> Inicialmente se utilizó ionización química en modo negativo para identificar los productos de reacción del  $\cdot\text{NO}_2$  con metil-linoleato y metil-linolenato, diferenciando productos nitrados de los hidroperóxidos que se forman<sup>55</sup>. En estos estudios se detectaba la formación de un ion de  $m/z$  46 formado por disociación por captura electrónica característico de los grupos nitro ( $-\text{NO}_2$ ) o nitrito ( $-\text{ONO}$ ), a diferencia del  $m/z$  62, característico de la función nitrato. En trabajos posteriores enfocados al estudio de la nitración de ácidos grasos insaturados por especies derivadas del  $\cdot\text{NO}$ <sup>53</sup>, se empleó cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas empleando ionización por *electrospray* y analizadores de triple cuadrupolo con los que se comenzaron los estudios de fragmentación. En tanto, otros grupos de investigación realizaron análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con los que se obtuvo espectros de impacto electrónico<sup>43</sup>. En 2002, aparece el primer artículo que detecta lípidos nitrados en muestras de plasma<sup>56</sup>,

empleando RPLC-MS/MS como técnica de detección de ácido linoleico nitrado. En dicho trabajo se realiza una comparación entre dos grupos de donantes (normolipidémicos e hipercolesterolémicos) y se realiza una cuantificación relativa del ácido linoleico nitrado empleando un ácido graso de 17 carbonos como estándar interno.

Numerosos trabajos sucedieron a éstos, la gran mayoría utilizando LC-MS/MS como método de detección y cuantificación de ácidos grasos nitrados. Se ha detectado ésteres de colesterol con ácido linoleico nitrado en plasma, en lipoproteínas y en cultivos celulares<sup>45,57</sup>; en 2005 Baker *et al* reportaron la detección y cuantificación de productos nitrados y nitro-hidroxiados del ácido palmitoleico, oleico, linoleico, araquidónico y eicosapentaenoico en plasma humano mediante LC-MS/MS<sup>58</sup>. Los valores reportados en ese momento fueron de varios órdenes de magnitud mayores a los que se reportaron luego mediante análisis similares por el mismo grupo<sup>59</sup> o mediante análisis realizados por GC-MS/MS<sup>60,61</sup>, verificados posteriormente por ambas técnicas para el caso del OANO<sub>2</sub><sup>62</sup>. Actualmente existe un consenso en que las concentraciones de ácidos grasos nitrados en el plasma varía en el rango de pM-nM<sup>63</sup>.

En la literatura se encuentran diversos trabajos en los que se caracterizan en detalle varios lípidos nitrados mediante NMR, IR y MS<sup>55,56,58,64,65</sup>. Recientemente, se han reportado estudios de ácidos grasos nitrados esterificados en triglicéridos mediante HPLC-MS/MS con equipos de alta resolución y con ionización química a presión atmosférica<sup>66</sup>, y fosfolípidos mediante cromatografía líquida de interacción hidrofóbica acoplada a ESI-MS<sup>67</sup>. En la Tabla 3 se resumen los datos obtenidos de análisis por MS para ácidos grasos libres nitrados.

Tabla 3. Fragmentación de ácidos grasos nitrados.

Ácido graso nitrado	Ion precursor	Ion producto	Composición del producto	Ref.
NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	46,1	[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	277,2	[C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	44,68
9-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	224,4	[C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>-</sup>	44,68
9-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	210,1	[C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>-</sup>	44,68
9-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	168,1	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> N] <sup>-</sup>	44,68
12-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	244,2	[C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N] <sup>-</sup>	44
12-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	213,1	[C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	44,68
12-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	195,1	[C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	44,68
12-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	171,1	[C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	44,68
12-NO <sub>2</sub> -CLA	324,2	157,1	[C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	44,68
OANO <sub>2</sub>	326,2	46,1	[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
OANO <sub>2</sub>	326,2	279,2	[C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
9-OANO <sub>2</sub>	326,2	168,1	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> N] <sup>-</sup>	69
9-OANO <sub>2</sub>	326,2	124,1	[C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N] <sup>-</sup>	69
9-OANO <sub>2</sub>	326,2	150,1	[C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> ON] <sup>-</sup>	69
10-OANO <sub>2</sub>	326,2	169,1	[C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	69
10-OANO <sub>2</sub>	326,2	125,1	[C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O] <sup>-</sup>	69
10-OANO <sub>2</sub>	326,2	151,1	[C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	69
LNO <sub>2</sub>	324,2	46,1	[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
LNO <sub>2</sub>	324,2	277,2	[C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
9-LNO <sub>2</sub>	324,2	168,1	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> N] <sup>-</sup>	69
9-LNO <sub>2</sub>	324,2	224,1	[C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>-</sup>	69
9-LNO <sub>2</sub>	324,2	210,1	[C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>-</sup>	69
10-LNO <sub>2</sub>	324,2	182,1	[C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> N] <sup>-</sup>	69
10-LNO <sub>2</sub>	324,2	238,1	[C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>-</sup>	69
10-LNO <sub>2</sub>	324,2	224,1	[C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>-</sup>	69
12-LNO <sub>2</sub>	324,2	157,1	[C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	69
12-LNO <sub>2</sub>	324,2	213,1	[C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	69
12-LNO <sub>2</sub>	324,2	195,1	[C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	69
13-LNO <sub>2</sub>	324,2	185,1	[C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	69
13-LNO <sub>2</sub>	324,2	227,1	[C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	69
13-LNO <sub>2</sub>	324,2	209,1	[C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	69

## 2.8. Objetivos

### Objetivo General

Estudiar la formación de ácidos grasos nitrados en la LDL humana bajo estrés nitro-oxidativo.

### Objetivos Específicos

- A. Optimizar un método de HPLC-MS/MS para la detección y cuantificación de ácidos grasos nitrados.
- B. Caracterizar el estado nitrooxidativo de LDL humana expuesta a diferentes sistemas nitrantes: peroxinitrito (bolo e infusión) y nitrito en medio ácido.
- C. Analizar la nitración del componente lipídico en la LDL nitrada.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Materiales

El hidróxido de sodio (NaOH) fue adquirido de Applichem. El ácido o-fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , solución 85 % w/w) fue adquirido de Merck. Los solventes: metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) y ácido acético (HAc) se obtuvieron de J.T. Baker.

Los ácidos grasos nitrados ( $\text{OANO}_2$ ,  $^{13}\text{C}_{18}\text{OANO}_2$ ,  $[\text{D}_4,^{15}\text{N}]\text{OANO}_2$ ,  $\text{LNO}_2$ ,  $^{13}\text{C}_{18}\text{LNO}_2$ ,  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  y  $^{15}\text{N}\text{O}_2\text{-cLA}$ ) y el 4-fenil-1,2,4, triazolina-3,4-diona fueron aportados por el laboratorio del Dr. Bruce Freeman (Universidad de Pittsburgh, E.E. U.U.) en el marco de una colaboración científica.

Los demás reactivos fueron adquiridos de SIGMA. Todas las soluciones fueron preparadas en agua ultra pura deionizada obtenida por equipamiento de purificación disponible en nuestro laboratorio (Thermo Scientific).

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Purificación de LDL

La LDL se purifica por ultracentrifugación diferencial del plasma humano realizando un gradiente con KBr<sup>70,71</sup>. El plasma se mezcla con KBr en una relación 0,28 g por cada mililitro de plasma y posteriormente se preparan los tubos de ultracentrifugación con 2,5 mL de plasma y 5 mL de NaCl 0,15 M. Los tubos se centrifugan a 290.000 g durante 105 min a 4 °C. Se separa la banda color naranja que se observa en el tercio medio del tubo (densidad 1,02 - 1,06 mg/mL); de esta manera se obtiene un preparado de LDL que denominamos LDL-1p. Para trabajar con un preparado libre de albúmina, de otras fracciones lipoproteicas, se completa la purificación de la LDL-1p mediante un segundo paso de ultracentrifugación en un gradiente de KBr. En esta ocasión la banda color naranja aparece en el tercio inferior de los tubos, es separada y se conserva a 4 °C bajo atmosfera de argón hasta su análisis. La concentración proteica se determina por absorbancia a 280 nm ( $\epsilon = 1,05 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ )<sup>72</sup>.

### 3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar la pureza de las fracciones de LDL obtenidas se realiza un gel de electroforesis en agarosa al 0,5 % m-v <sup>73,74</sup>. La agarosa se prepara en un buffer Tris-glicina pH 8,3. La electroforesis se realiza en 2 pasos; los primeros 40 min a 65 V constante (corriente aproximada de 30 mA) y luego se corre durante 15 min adicionales a 90 voltios constante. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se incuba con solución de fijación por 15 minutos y posteriormente se deshidrata empleando papel filtro. La tinción se realiza con solución de azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,15 % en Destain y finalmente el gel se incuba en Destain hasta obtener un buen contraste entre tinción de banda y fondo.

### 3.2.3. Nitración de LDL

Se emplearon tres sistemas de nitración de LDL: ONOO<sup>-</sup> en infusión, ONOO<sup>-</sup> en bolo y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en medio ácido.

Las reacciones de nitración de LDL se realizaron agregando el ONOO<sup>-</sup> en forma de bolos sucesivos bajo agitación vigorosa (20 μM cada 1 min) o mediante infusión lenta empleando un equipo de infusión automática (Kd Scientific) a una solución de LDL 3 μM en buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7,3 con DTPA 100 μM. Las concentraciones de ONOO<sup>-</sup> acumuladas a tiempo final se encuentran en un rango de 0,1 a 2 mM para ambos casos. El agregado de DTPA en el buffer se realiza con el fin de quelar los posibles metales presentes en la solución que puedan reaccionar. Debido a que la solución stock de ONOO<sup>-</sup> es fuertemente alcalina, el pH de las muestras fue controlado siempre luego de realizadas las reacciones para asegurar que las variaciones causadas por el agregado de ONOO<sup>-</sup> no alteraran el pH de la solución, teniendo en cuenta un margen de tolerancia de 0,2 unidades de pH. En cada experimento se realizaron controles de adición de ONOO<sup>-</sup> previamente descompuesto en buffer fosfato pH 7,3 para descartar el efecto de los productos de descomposición del ONOO<sup>-</sup> (en particular NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) sobre los resultados.

Las reacciones de nitración empleando NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se realizaron mediante el agregado de NaNO<sub>2</sub> en diferentes concentraciones (relación molar con NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:LDL 25 o 100) bajo agitación constante durante 60 min a una solución de LDL 3 μM en buffer fosfato de

potasio 100 mM, pH 3 con DTPA 100  $\mu$ M. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras son inmediatamente analizadas con el fin de terminar las reacciones de oxidación o se les adiciona butilhidroxitolueno en una concentración final de 0,025 %m-v con el mismo objetivo. En el caso de los análisis que involucran la hidrólisis enzimática de los lípidos de la LDL, la reacción se detiene por ajuste de pH con KOH hasta alcanzar pH 7.

#### 3.2.4. Cuantificación de $\alpha$ TOH

El  $\alpha$ TOH se extrae de las muestras de LDL mediante extracción orgánica. Las muestras se vortexean con MeOH (9:1 v/v) y posteriormente se centrifugan 15 min a 13.000 g y 4 °C para separar la proteína precipitada de los componentes hidrofóbicos extraídos. El sobrenadante se analiza por HPLC de fase reversa empleando una columna Supelcosil LC-18 (250 x 46 mm, 5  $\mu$ m) y MeOH 100 % a 1 mL/min como fase móvil isocrática. La elución del  $\alpha$ TOH se monitorea por fluorescencia con  $\lambda_{ex}$ = 295 nm y  $\lambda_{em}$ = 330 nm<sup>75</sup>. El tiempo de retención determinado para el  $\alpha$ TOH en estas condiciones de análisis es de 7 min. La cuantificación del  $\alpha$ TOH se realiza mediante la extrapolación del área de la señal obtenida para cada muestra en la una curva de calibración de  $\alpha$ TOH que se construye previamente a partir de un stock de  $\alpha$ TOH comercial.

#### 3.2.5. Cuantificación relativa de carbonilos totales

La formación de carbonilos como indicadores de oxidación de la LDL se determinó por Dot-Blot, empleando un método indirecto en el que los carbonilos presentes reaccionan con la dinitrofenilhidrazina (DNPH) y posteriormente se detecta la presencia del grupo dinitrofenol (DNP) empleando anticuerpos policlonales anti-DNP<sup>76</sup>. Se siembran 3  $\mu$ g de LDL en una membrana de PVDF previamente hidratada con buffer de corrida, teniendo la precaución de que la gota de siembra no supere los 5 mm de diámetro. Posteriormente se realiza la derivatización de la muestra para lo que se incuba la membrana en HCl 2 N por 5 min y luego con DNPH 0,1 mg/mL disuelto en HCl 2 N. Luego se realizan 2 lavados con ácido, 7 lavados con MeOH de 5 min cada uno y finalmente se lava el solvente orgánico con abundante PBS y Tween 0,1 %v-v. La membrana se bloquea con 5 %m-v de leche en PBS durante 1 hora a Tamb. Luego se incuba *overnight* con el anticuerpo primario anti-DNP (dilución 1/3000 en PBS con 5

%m-v de leche y 0,1 %v-v de Tween). Después de la incubación y de los lavados con PBS Tween 0,1 %v-v, se incuba con el anticuerpo secundario (dilución 1/12.000, en PBS Tween 0,1 %v-v) específico para el revelado posterior en un equipo de detección de fluorescencia en el infrarrojo. Tras una hora de incubación, la membrana se lava nuevamente y se procede a revelar en un equipo Odyssey (Li-Cor). La intensidad de las señales detectadas se cuantifica por densitometría utilizando el software controlador del equipo. La cuantificación relativa se calcula como relativa porcentual del máximo de señal obtenido.

### 3.2.6. Cuantificación relativa de 3-nitrotirosina

La formación de 3-NT se evalúa por Dot-Blot, empleando anticuerpos policlonales anti-3NT producidos en el Departamento de Bioquímica. Se siembran 3 µg de LDL en una membrana de nitrocelulosa, teniendo la precaución de que la gota de siembra no supere los 5 mm de diámetro. La membrana se bloquea con 5 %m-v de leche en PBS durante 1 hora a  $T_{amb}$ . Luego se incuba overnight con el anticuerpo primario anti-3NT (dilución 1/2000 en PBS con 1 %m-v de leche y 0,1 %v-v de Tween). Después de la incubación y de los lavados con PBS Tween 0,1 %v-v, se incuba con el anticuerpo secundario (dilución 1/12.000, en PBS Tween 0,1%v-v) específico para el revelado posterior en un equipo de detección de fluorescencia en el infrarrojo. Tras una hora de incubación, la membrana se lava nuevamente y se procede a revelar en un equipo Odyssey (Li-Cor). La intensidad de las señales detectadas se cuantifica por densitometría utilizando el software controlador del equipo. La cuantificación relativa se calcula como relativa porcentual del máximo de señal obtenido.

### 3.2.7. Métodos de detección de ácidos grasos nitrados

La metodología empleada para la detección y cuantificación de ácidos grasos nitrados por HPLC-MS se realiza empleando un sistema compuesto por un cromatógrafo *Agilent 1260 Infinity* y un espectrómetro de masas con fuente de ionización de *electrospray* y un analizador de triple cuadrupolo con trampa de iones (QTRAP 4500,

ABSciex). Con el fin de optimizar métodos de alta sensibilidad para detectar y cuantificar ácidos grasos nitrados en muestras de LDL se planteó diseñar un método de *MRM*. La optimización de dichos métodos forma parte del trabajo de esta tesis y se detalla en las siguientes secciones. A continuación se describe brevemente la estrategia de optimización de los métodos.

Inicialmente, los estándares de ácidos grasos se analizaron por infusión directa al espectrómetro de masas realizando espectros de masa con Q1 y espectros de alta resolución empleando la trampa lineal. En esta etapa se determina el ion molecular y se optimizan los parámetros referidos a la ionización de los analitos para obtener mayor señal.

Una vez determinado el ion molecular de cada ácido graso nitrado y los parámetros de ionización, se realizan experimentos de fragmentación de cada ion para identificar los fragmentos que producen iones de mayor intensidad y proporcionan información de identidad para así obtener un método de alta sensibilidad. Se eligen dos iones producto para cada ácido graso y se optimizan los parámetros referidos a la fragmentación de manera de obtener mayor señal, siendo la energía de colisión el parámetro de mayor incidencia.

Completadas las etapas anteriores se procede a optimizar el sistema de HPLC-MS. Para ello se toman métodos cromatográficos reportados para el análisis de ácidos grasos nitrados como punto de partida<sup>66,77,78</sup> y se verifica la detección de cada transición elegida en etapas anteriores para cada ácido graso. Finalmente se elaboran las curvas de calibración correspondientes para cada ácido graso nitrado, empleando sus respectivos estándares internos.

### 3.2.8. Análisis de ácidos grasos nitrados en la LDL

Previo al procesamiento de la muestra se adiciona una mezcla de estándares internos compuesta por  $[^{13}\text{C}_{18}]\text{OANO}_2$ ,  $[\text{D}_4,^{15}\text{N}]\text{OANO}_2$ ,  $[^{13}\text{C}_{18}]\text{LNO}_2$  y  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ .

Las muestras de LDL (3  $\mu$ M, 500  $\mu$ L) se incuban con 5 mg de lipasa pancreática bovina (10 mg/mL) y 40 U de fosfolipasa A1 en un buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4. La incubación se realiza a 37 °C bajo agitación constante durante 1 hora, con el fin de hidrolizar los triglicéridos y fosfolípidos presentes en la LDL. Posteriormente se realiza una extracción orgánica de los lípidos con la adición de 2,5 volúmenes de la mezcla Hexano:Isopropanol:HAc (30:20:2) a cada muestra y posteriormente se realizan dos extracciones con 2,5 volúmenes de Hexano<sup>79</sup>. En cada caso se toma la fase superior, se juntan y el solvente orgánico es evaporado a sequedad.

La siguiente etapa tiene como objetivo separar los distintos componentes lipídicos del extracto mediante extracción en fase sólida, empleando columnas cuya fase estacionaria se compone de un grupo amino (Phenomenex StrataNH2, 55  $\mu$ m, 500 mg/6 mL)<sup>66</sup>. Las muestras se resuspenden en 0,5 mL de CHCl<sub>3</sub> y se siembran en las columnas que han sido previamente activadas con 6 mL de MeOH y 6 mL de CHCl<sub>3</sub>. Luego se lava con CHCl<sub>3</sub> y se dispone a eluir distintas fracciones lipídicas enriquecidas en ésteres de colesterol, lípidos apolares, ácidos grasos libres y lípidos polares empleando 6 mL de Hexano, 4 mL de CHCl<sub>3</sub>:Isopropanol (2:1), 6 mL de EtOEt:HAc 2% y 4 mL de MeOH, respectivamente. La fase correspondiente con ácidos grasos libres se evapora a sequedad y se conserva a -80 °C hasta su análisis por HPLC-MS.

### 3.2.9. Cuantificación de ácidos grasos nitrados por LC-MS/MS

La cuantificación se realiza utilizando estándares con isótopos pesados y se describe en detalle en la sección Resultados

### 3.2.10. Cromatografía en capa fina

El seguimiento de la hidrólisis se realizó mediante cromatografía en capa fina<sup>80</sup>. Se siembran alícuotas de 5  $\mu$ L de la mezcla de incubación en una placa de sílica y se desarrolla la cromatografía empleando una mezcla de hexanos:dietileter:ácido acético (70:30:1) como fase móvil. El revelado de la placa se realiza mediante aspersion de una solución de CuSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posterior calentamiento.

### 3.2.11. Tratamiento con BME

Los nitroalquenos son grupos electrófilos capaces de reaccionar con  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) mediante adición de Michael. Por tanto, para confirmar la presencia del grupo nitroalqueno en las muestras en las que el análisis de masa presenta resultados indicativos de la presencia de ácidos grasos nitrados, se incuban las muestras con  $\beta$ ME y re-analizan por HPLC-MS/MS<sup>81</sup>. En caso de que la señal correspondiente con el ácido graso nitrado desaparece, se confirma la reactividad con  $\beta$ ME, y por tanto la presencia del grupo nitroalqueno. Para ello, la fracción de ácidos grasos liberados por la digestión de la LDL (obtenida como se describe anteriormente), se evapora a sequedad y resuspende en buffer fosfato 100 mM, pH 7,3 conteniendo 2 mM de  $\beta$ ME. La mezcla se mantiene a  $T_{amb}$  durante 30 min y es inmediatamente analizada por HPLC-MS/MS en busca de nitroalquenos de interés.

### 3.2.12. Detección de cLA

La detección de cLA en LDL se realiza a partir de la fracción de ácidos grasos obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de la LDL según se describió anteriormente. Las muestras se evaporan a sequedad y se resuspenden en 50  $\mu$ L de una solución de 4-fenil-1,2,4-triazolin-3,5-diona (PTAD) 10 mM en acetonitrilo para derivatizar el cLA presente. El reactivo PTAD es un fuerte dienófilo que reacciona rápidamente con dienos conjugados para formar un producto de adición Diels-Alder. Este reactivo ha sido empleado para la detección y cuantificación de cLA en otros trabajos<sup>44,78,82</sup>. La mezcla se mantiene a  $T_{amb}$  por 15 min para la reacción de derivatización y luego se evapora el solvente a sequedad. Las muestras se resuspenden previo al análisis del cLA-PTAD que se realiza por HPLC-MS/MS en modo positivo en busca de la transición 454  $\rightarrow$  178, correspondiente con la fragmentación a nivel de los enlaces C-N del producto de adición generando 4-fenilurazol, ([PU + H]<sup>+</sup>). La cromatografía se desarrolla en una columna de fase reversa (Luna C-18(2), Phenomenex, 5  $\mu$ m, 100 x 2,0 mm) empleando un gradiente de acetonitrilo (30 – 100 %) con 0,05 % de ácido acético en agua por 10 min a un flujo de 700  $\mu$ L/min. La cuantificación se realiza a partir de una curva de calibración elaborada con 9,11-cLA y PTAD bajo las mismas condiciones de reacción.

## 4. Resultados

### 4.1. Optimización de métodos de HPLC-MS/MS para detección y cuantificación de ácidos grasos nitrados

El objetivo de esta etapa fue diseñar un método cromatográfico con detección por espectrometría de masas que permita detectar y cuantificar ácidos grasos nitrados en muestras biológicas. Para eso fue fundamental la adquisición de estándares correspondientes con los analitos de interés, con los que se realizaron ensayos preliminares que permitieron optimizar los parámetros del equipo. Los estándares estudiados fueron: OANO<sub>2</sub>, [<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]OANO<sub>2</sub>, [D<sub>4</sub>,<sup>15</sup>N]OANO<sub>2</sub>, LNO<sub>2</sub>, [<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]LNO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>-cLA y [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA.

La optimización de los parámetros se realizó en dos etapas; la primera se realizó por infusión directa de los compuestos al espectrómetro de masas, y la segunda utiliza un sistema acoplado de cromatografía líquida. Este procedimiento se realizó para cada uno de los estándares estudiados y para mayor comprensión del desarrollo del método, se detalla el procedimiento realizado con uno de ellos ([<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA) y finalmente se resumen los resultados análogos obtenidos para el resto de los estándares.

#### 4.1.1. Infusión directa

El estándar de [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA se diluye a una concentración 10 - 50 nM en una solución acuosa de 50 % MeOH con 0,1 % de ácido acético. El pH de esta solución es ácido y es posible que dificulte la ionización por desprotonación de los ácidos grasos. Sin embargo, es importante adicionar ácido acético a la solución ya que será posteriormente utilizado para mejorar la resolución en la cromatografía. De este modo las características de la solución en la que se encuentran los analitos a optimizar, son más representativas de las que se encontrarán en el método final. Las soluciones se analizan por infusión directa al espectrómetro de masas que opera en modo de *full scan* empleando el primer cuadrupolo (Q1) en modo negativo. Con este experimento se obtiene un espectro de masas de un amplio rango de masas (50 – 500 *m/z*) en el que se puede observar un pico de mayor intensidad en *m/z* 325 que representa el ion molecular del ácido graso nitrado, correspondiente con [M-H]<sup>-</sup> (Figura 5). Se estudiaron las condiciones de ionización por

*electrospray* para conseguir la mejor selectividad y sensibilidad de los compuestos; se optimizan los parámetros de ionización y se evalúa el efecto de la temperatura de la fuente sobre los compuestos de estudio. Para realizar dicha optimización, se ajustó el rango de  $m/z$  de manera tal que solo incluya el ion de interés ( $325 \pm 5$  Da) y se varió manualmente los parámetros del equipo a la vez que se monitorizó la intensidad total de la señal. El hecho de que la ventana del espectro sea pequeña, permite hacer un seguimiento rápido de la intensidad que se obtiene para el ion de interés a la vez que se alteran los valores de cada parámetro. En el caso de los ácidos grasos nitrados, se encontró que los parámetros de la fuente evaluados no afectaban significativamente a la señal de los analitos, por lo que se usaron valores estándar para la temperatura de la fuente, potencial de *declustering* y voltaje del capilar (Potencial y temperatura de fuente -4,4 kV y 550 °C, y potencial de *declustering* -80 V).

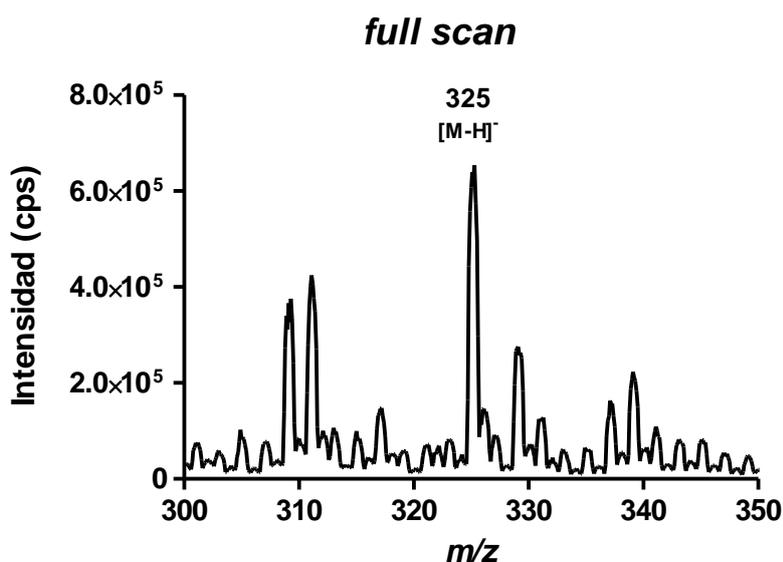


Figura 5. Espectro de masas *full scan* del  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ . Se infunde el estándar disuelto en una solución acuosa de MeOH 50 % con 0,1 % de ácido acético con un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  al espectrómetro de masas. El espectro se obtiene con el cuadrupolo Q1 en modo negativo en un rango de 5 – 500  $m/z$  con una velocidad de escaneo de 1000 Da/s y resolución HIGH. En la figura se representa un rango de  $m/z$  acotado con el fin de ilustrar el ion molecular del  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ .

Posteriormente se utiliza la trampa lineal del espectrómetro, en un experimento de mayor resolución, para determinar la masa del ion molecular detectado con el *full scan*.

En este experimento de *enhanced resolution*, la trampa realiza un escaneo centrado en el ion 325 con una ventana de 30 Da y lo realiza a baja velocidad (250 Da/s) con el fin de obtener la mejor resolución (Figura 6). En este espectro se detecta el ion molecular con mayor resolución con  $m/z$  325,2 y se observa la distribución isotópica del compuesto, detectándose picos con  $m/z$  326,2 y 327,2 correspondientes con los iones generados a partir de, M+1 y M+2, respectivamente.

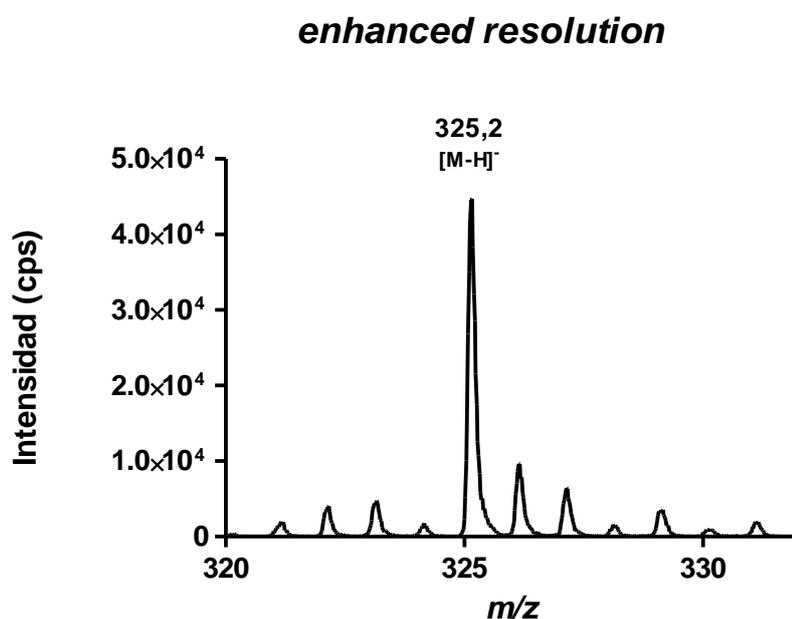


Figura 6. **Espectro de *enhanced resolution* del  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ .** La solución estándar se infunde con un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y la detección se realiza mediante el uso de la trampa lineal en modo de resolución aumentada. El espectro presenta mayor resolución que el *full scan*, por lo que se identifica y determina el valor del ion molecular del estándar.

En la siguiente etapa se buscó obtener el patrón de fragmentación de los ácidos grasos nitrados con el fin de obtener mayor información de identidad de cada compuesto. Para ello se realizó un experimento *Product Ion* del ion con  $m/z$  325,2 en el que se emplean los cuadrupolos de manera tal que: Q1 selecciona el ion precursor (en este caso,  $m/z$  325,2), éste es fragmentado en Q2 y el Q3 se realiza un escaneo de los iones producidos por la fragmentación. La energía de colisión (CE) es el parámetro que

presenta mayor influencia en el espectro de fragmentación por lo que se realizó especial énfasis en el estudio de este valor. Primeramente se realizó un espectro de fragmentación del ion 325,2 con un barrido de CE de -45 V a -10 V con un intervalo de 0,5 V a una velocidad lenta (200 Da/s). Los espectros obtenidos para cada energía de colisión se promedian de forma automática por el software del equipo. De esta manera, se obtiene un espectro de fragmentación completo que contiene amplia información acerca de los iones fragmento que la molécula es capaz de producir. Para el caso del  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ , el espectro de fragmentación (Figura 7) muestra tres iones de mayor intensidad, entre los que se encuentre el ion precursor; obtenido fundamentalmente en las fragmentaciones realizadas con energía de colisión baja. Los iones restantes se corresponden con los obtenidos por otros investigadores y reportados en la bibliografía (ver Tabla 1). El ion 47,1 corresponde con el producto de la fragmentación del grupo nitró,  $[^{15}\text{NO}_2]^+$ , mientras que el ion 183,1 se corresponde con la fragmentación producida a nivel del doble enlace del  $\text{C}_{10}$ ,  $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2^{15}\text{N}]^+$ . Estos fragmentos proveen información suficiente para identificar al  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ , por lo que se procedió a estudiar la energía de colisión óptima con la que se obtienen estos dos iones. Para ello se realiza un análisis de los datos obtenidos del mismo experimento; en este caso se extraen los datos correspondientes a la intensidad de los iones 47,1 y 183,1 y se representan en gráficos de intensidad en función de la energía de colisión (Figura 8). Para el caso del ion 47,1 se observa que la intensidad obtenida es mayor cuando la energía de colisión se encuentra en el rango de -40 a -30 V. En cambio el ion 183,1 se obtiene en mayor proporción con mayores energías de colisión ( $\text{CE} \leq -45 \text{ V}$ ).

**Product Ion 325,2  
(CE -45 a -10 V)**

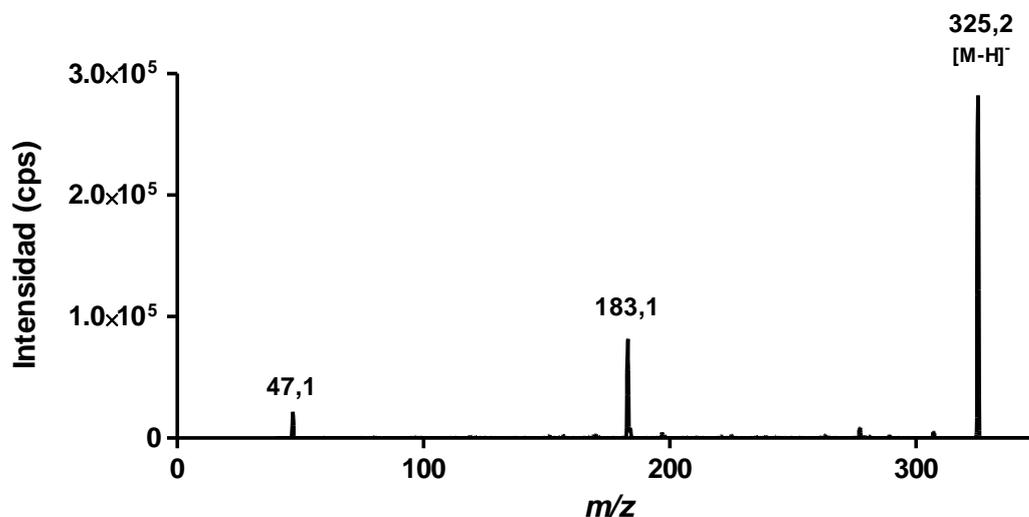


Figura 7. **Espectro de fragmentación del [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA.** El estándar se infunde en el espectrómetro y se realiza un experimento de *Product Ion* del ion precursor 325,2 realizando un barrido de energías de colisión (-45 a -10 V). El espectro representa un promedio de los espectros obtenidos para cada energía, y se destaca la presencia de dos iones fragmento; *m/z* 47,1 y 183,1.

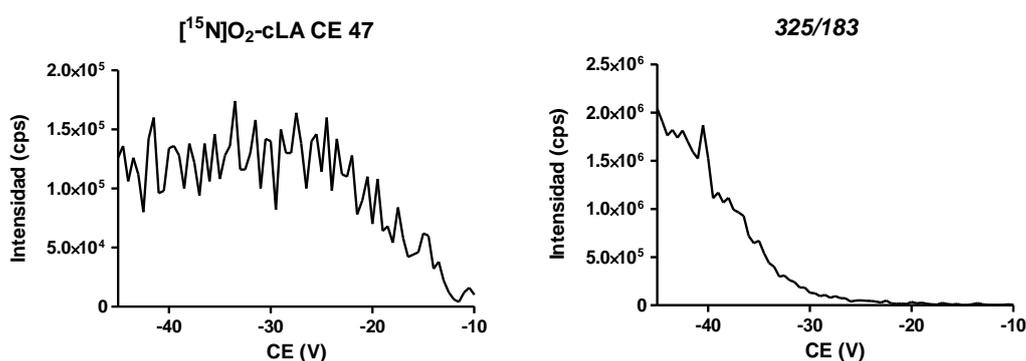


Figura 8. **Optimización de energías de colisión.** Se extraen los datos de intensidad correspondiente con cada ion a partir del espectro de *Product Ion* obtenido anteriormente. Se determina la energía de colisión óptima para fragmentar el [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA en los iones de interés, *m/z* 47,1 (izquierda); 183,1 (derecha).

Con los datos obtenidos al momento se obtuvo información necesaria para diseñar un experimento de fragmentación denominado *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*, que le otorga gran sensibilidad y especificidad a la detección y cuantificación de los analitos. En él, se analizan únicamente las dos fragmentaciones estudiadas anteriormente, empleando los cuadrupolos. En este caso el Q1 filtra el ion precursor 325,2; Q2 fragmenta con la energía de colisión óptima para cada fragmentación y Q3 filtra los iones producto que sean indicados; en este caso, las transiciones estudiadas son 325,2/46,1 con CE = -40 V y 325,2/183,1 con CE = -40 V. Este método de espectrometría de masas será utilizado acoplado al sistema de cromatografía líquida, por lo que previamente se verificó que los parámetros de la fuente de ionización ya optimizados fueran compatibles con el sistema cromatográfico. Especialmente se debió ajustar los valores de presión de los gases de secado ya que el flujo de ingreso de la muestra al espectrómetro aumenta considerablemente (de 10 a 700  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

#### 4.1.2. Métodos cromatográficos.

Se emplearon dos sistemas cromatográficos para analizar los ácidos grasos nitrados; utilizando en ambos casos el espectrómetro de masas en modo *MRM*.

-Sistema A: Es un sistema de cromatografía rápido (separación de los compuestos en 10 min), utilizado fundamentalmente para procesamiento y análisis de grandes cantidades de muestras. Las muestras se inyectan en una columna Luna C-18(2) (Phenomenex; 5  $\mu\text{m}$ ; 100 x 2,0 mm) pre-equilibrada con 30 % acetonitrilo con 0,05 % de ácido acético en agua, a un flujo de 700  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La separación se realiza mediante un gradiente lineal de acetonitrilo (30 – 100 %) en 10 min y luego se restablece la fase móvil inicial para reequilibrar el sistema.

-Sistema B: Un sistema cromatográfico que otorga buena resolución de los isómeros de posición de los ácidos grasos nitrados. En este sistema las muestras se inyectan en una columna Luna C-18(2) (Phenomenex; 3  $\mu\text{m}$ ; 150 x 2,0 mm) pre-equilibrada con 45 % de acetonitrilo en agua con 0,05 % de ácido acético, a un flujo de 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La elución se realiza mediante un gradiente lineal de acetonitrilo (45 – 80 %) en 45 min y luego se realiza un lavado con 100 % acetonitrilo durante 10 min y se restablece la fase móvil inicial para reequilibrar el sistema.

En ambos sistemas, los analitos se monitorean usando ESI/MS/MS en modo positivo con un experimento de *MRM* con dos transiciones para cada ácido graso nitrado. Según los parámetros ya optimizados, el espectrómetro se empleó con la fuente a -4,4 kV, 550 °C y un potencial de *declustering* de -80 V. Los cuadrupolos Q1 y Q3 se utilizan en resolución UNIT. Los iones monitoreados y los parámetros de adquisición para cada analito están resumidos en la Tabla 4. Con las condiciones cromatográficas empleadas los diferentes ácidos grasos nitrados se separan presentando picos a tiempos de retención característicos.

#### 4.1.3. Acoplamiento HPLC-MS/MS

Finalmente se elaboró un método de HPLC-MS/MS en el que se inyectan entre 0,1 – 1 pmol del estándar  $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$  en una columna de fase reversa y mediante un gradiente de acetonitrilo eluyen diferencialmente los distintos isómeros del  $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$ , mientras que son monitoreados por el método de *MRM*. El tiempo de retención de cada ácido graso nitrado junto con el empleo de dos transiciones para cada uno de ellos, otorga mayor especificidad al método de detección por HPLC-MS/MS (Figura 9 y Tabla 4). Como se observa en la Figura 9, en ambos sistemas cromatográficos el  $^{15}\text{N}\text{O}_2\text{-cLA}$  eluye como dos picos diferentes, que corresponden con los diferentes isómeros de posición del grupo nitro. En el caso del sistema B, la cromatografía se realiza en un tiempo mayor y los picos se separan en el tiempo obteniendo una mejor resolución. De todas formas, para ambos sistemas se obtiene una buena señal para el  $^{15}\text{N}\text{O}_2\text{-cLA}$ .

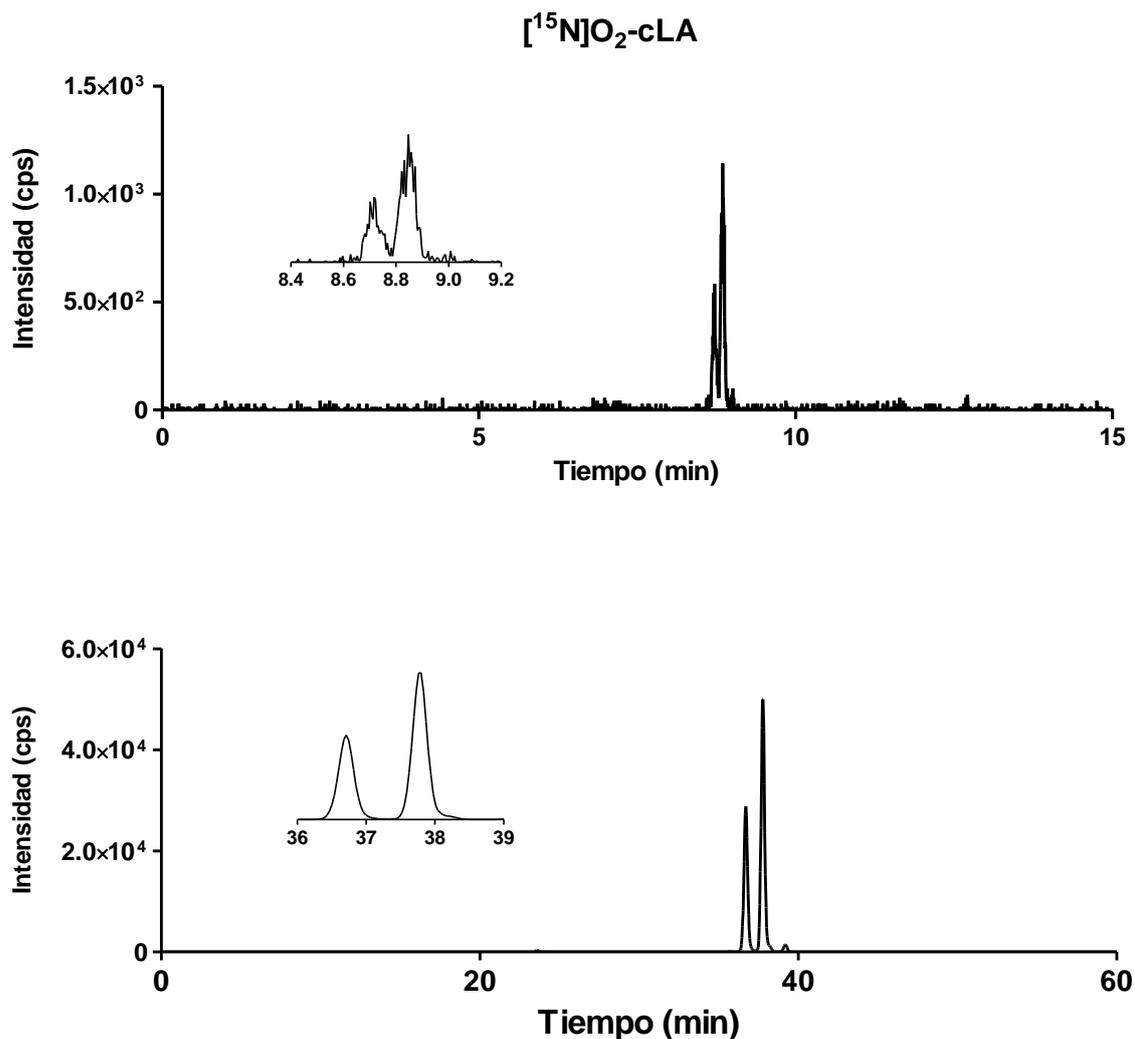


Figura 9. **Análisis del [<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA por HPLC-MS/MS.** Cromatogramas obtenidos por el método optimizado en la primera etapa del trabajo de tesis para el estándar de NO<sub>2</sub>-cLA. Se analizan 0,1 – 1 pmol de estándar empleando los sistemas cromatográficos A y B (Panel superior e inferior, respectivamente) se eluye con un gradiente de acetonitrilo en agua con 0,05 % de ácido acético. En ambos casos se representa la señal del *MRM* correspondiente con la transición 325,2/47,1. Los *inset* representan los cromatogramas correspondientes con mayor aumento en el tiempo de retención del estándar estudiado.

#### 4.1.4. Calibración

Finalmente se realizó una curva de calibración para el NO<sub>2</sub>-cLA. Las curvas de calibración se generaron empleando una concentración fija de estándar interno isotópicamente marcado ([<sup>15</sup>N]O<sub>2</sub>-cLA) a la que se le adicionan concentraciones variables del estándar NO<sub>2</sub>-cLA que posteriormente se analizan por los métodos de

HPLC-MS/MS ya optimizados. Se grafica la relación de áreas obtenidas para cada estándar en función de la relación molar de concentraciones (Figura 10).

Como se observa en la figura, se detectó una correlación lineal entre el área de los picos cromatográficos y la concentración del estándar de NO<sub>2</sub>-cLA analizado. En este caso se trabajó con concentraciones de NO<sub>2</sub>-cLA de 0,1 - 40 nM y por lo que la correlación se mantiene en un amplio rango de concentraciones. Además, obtiene un método de cuantificación sensible, que alcanza a detectar 1 fmol (0,1 nM, 10 μL).

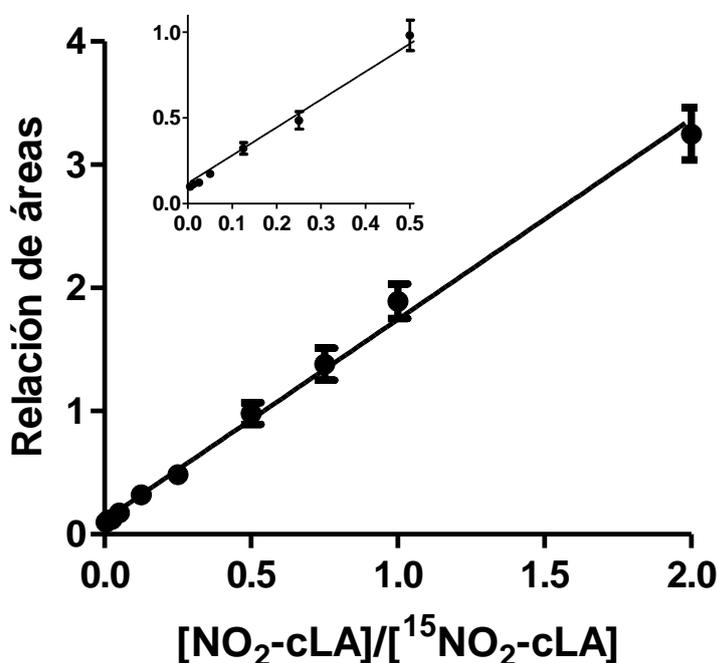


Figura 10. **Curva de calibración de NO<sub>2</sub>-cLA.** Se adicionaron concentraciones crecientes de NO<sub>2</sub>-cLA a una solución estándar de <sup>15</sup>NO<sub>2</sub>-cLA (20 nM) y son posteriormente analizadas por HPLC-MS/MS. Se demuestra una relación lineal entre la relación de áreas detectadas para cada estándar y las cantidades relativas presentes en cada muestra.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo del método de detección de ácidos grasos nitrados por HPLC-MS/MS se realizó para todos los estándares que fueron adquiridos. En las figuras 11-14 se representan los espectros obtenidos para cada uno de ellos.

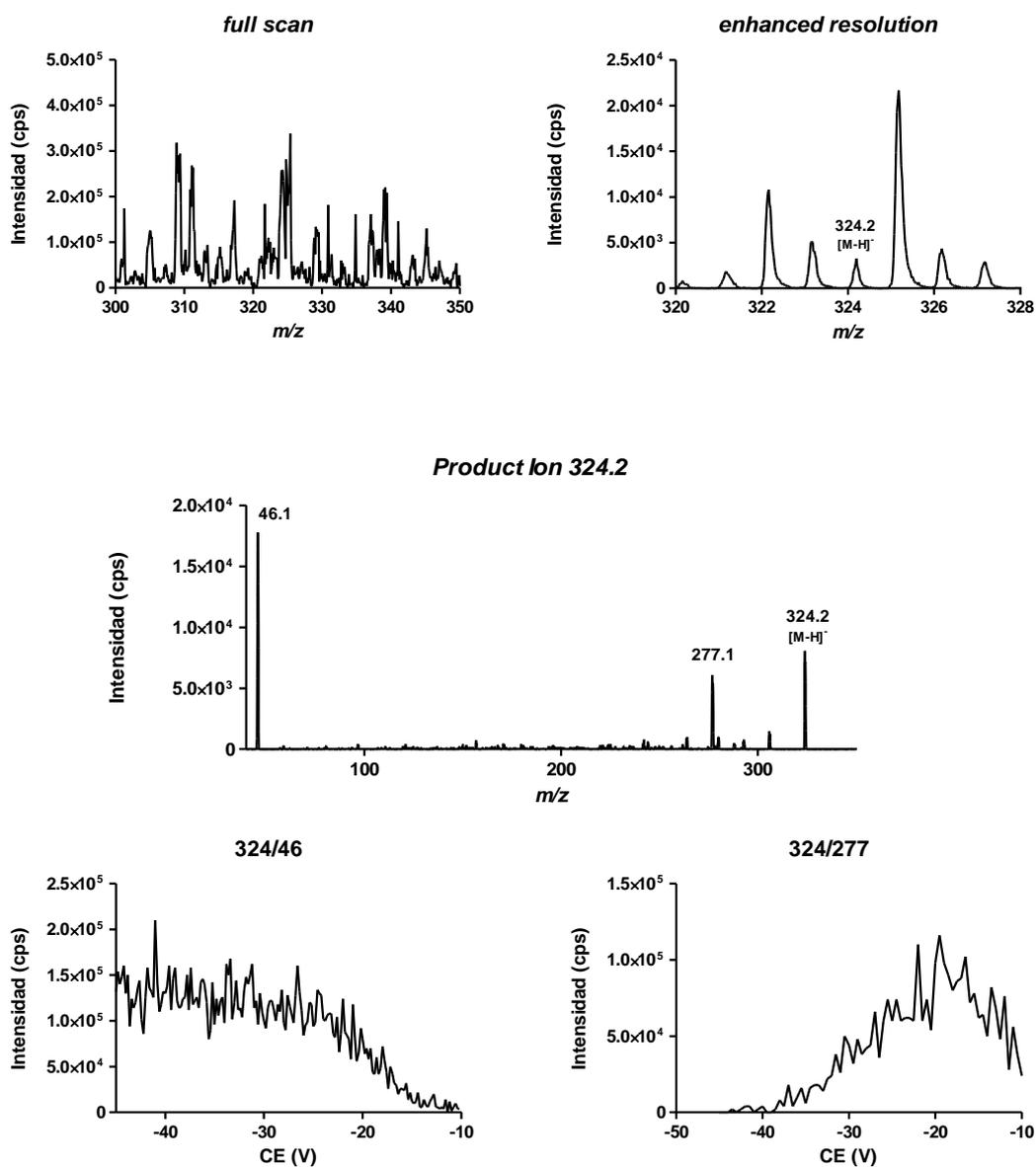
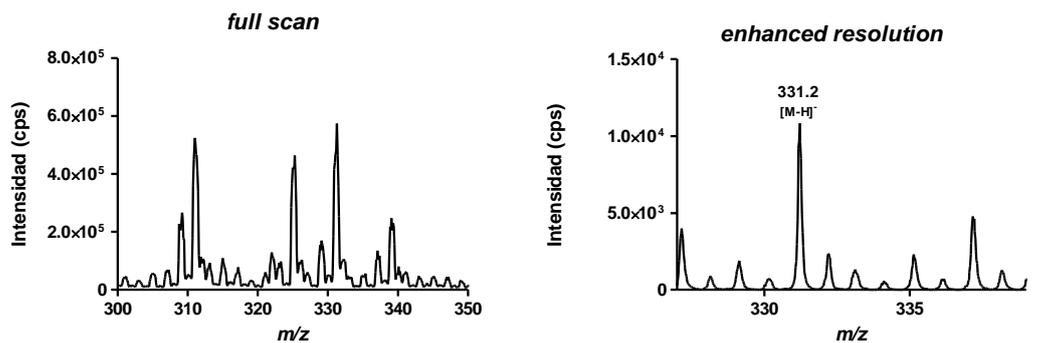


Figura 11. Análisis de LNO<sub>2</sub> por espectrometría de masas.



**Product Ion 331.2**

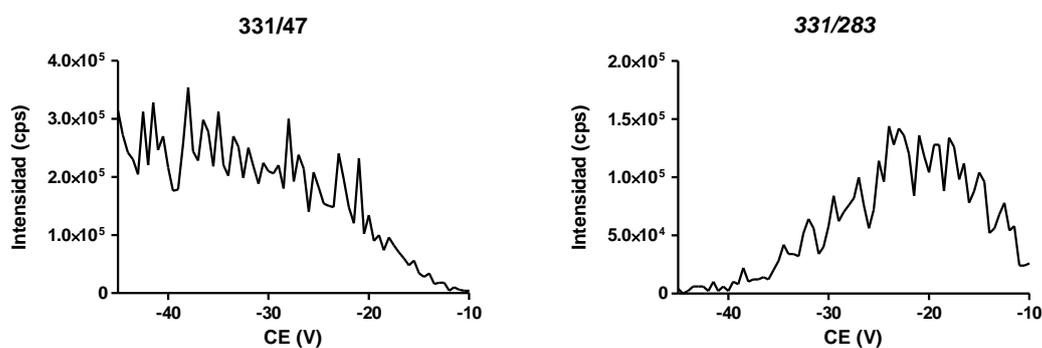
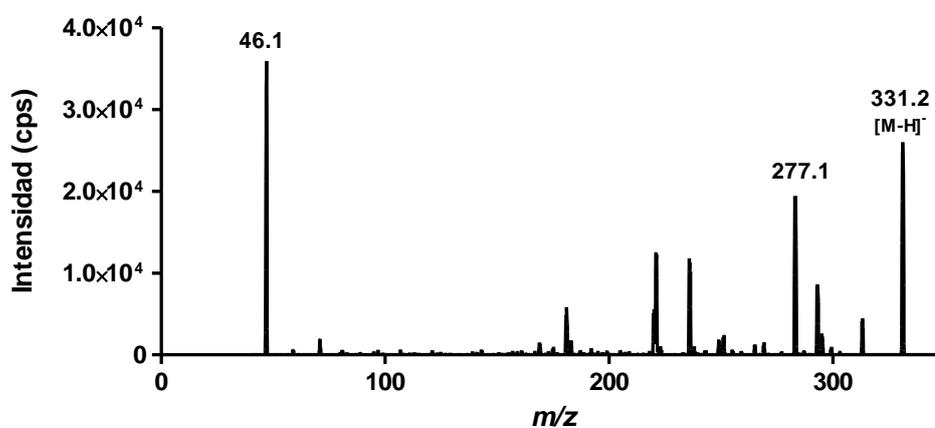


Figura 12. Análisis de  $[D_4,^{15}N]OANO_2$  por espectrometría de masas.

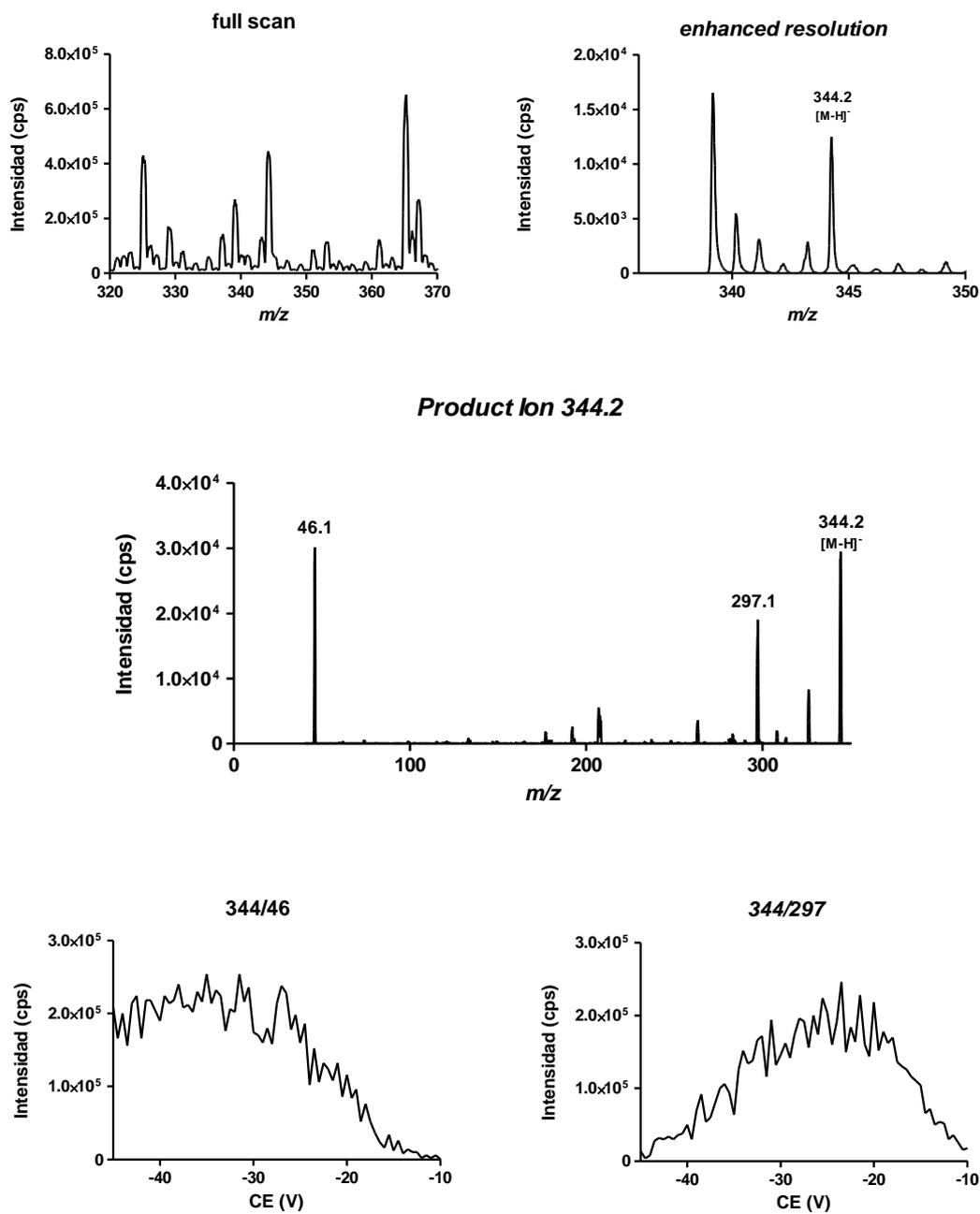


Figura 13. Análisis de  $[^{13}\text{C}_{18}]\text{OANO}_2$  por espectrometría de masas.

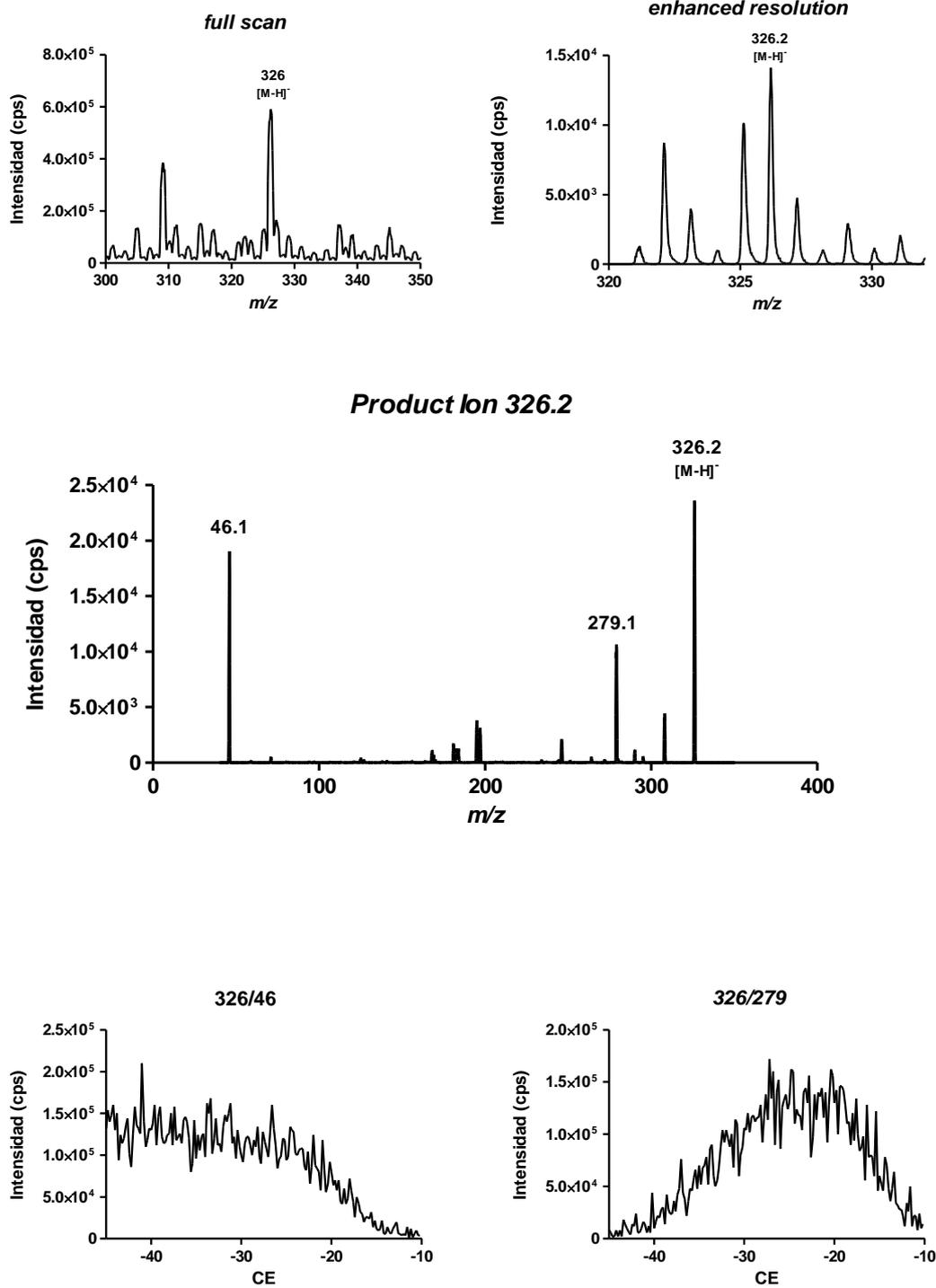


Figura 14. Análisis de  $\text{OANO}_2$  por espectrometría de masas.

Tabla 4. Fragmentaciones empleadas en método HPLC-MS/MS

Ácido graso nitrado	Ion precursor [M-H] <sup>-</sup>	Ion producto	CE (V)	Composición del ion producto
OANO <sub>2</sub>	326,2	46,1	-40	[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
	326,2	279,1	-20	[C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
[D <sub>4</sub> , <sup>15</sup> N]OANO <sub>2</sub>	331,2	47,1	-40	[ <sup>15</sup> NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
	331,2	283,1	-20	[C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> D <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
[ <sup>13</sup> C <sub>18</sub> ]OANO <sub>2</sub>	344,2	46,1	-40	[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
	344,2	297,1	-20	[ <sup>13</sup> C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
LNO <sub>2</sub> y NO <sub>2</sub> -cLA	324,2	46,1	-40	[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
	324,2	277,1	-20	[C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
[ <sup>15</sup> N]O <sub>2</sub> -cLA	325,2	47,1	-40	[ <sup>15</sup> NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
	325,2	183,1	-40	[C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> <sup>15</sup> N] <sup>-</sup>

## 4.2. Estudios en LDL

### Purificación de la LDL

El primer paso del trabajo fue obtener una LDL pura a partir de sangre humana con el fin de evitar reacciones secundarias con otros componentes. Se obtuvieron muestras de sangre de donantes normolipidémicos aparentemente sanos, y se separó el plasma fresco por centrifugación (2500 rpm, 5 min). Posteriormente se realizaron dos pasos de purificación por ultracentrifugación con los que se obtuvieron las dos fracciones de LDL (LDL-1p y LDL-2p) y se hizo un seguimiento de la purificación por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en agarosa 0,5 % y posterior tinción con Coomasie. En la Figura 15, se muestra un gel de agarosa representativo teñido con Coomasie en el que se analizan las muestras de plasma y LDL obtenidas de dos donantes diferentes (A y B). En el carril correspondiente al plasma, se resalta una banda correspondiente con albúmina (HSA), que también se detecta con menor intensidad en los carriles correspondientes con LDL-1p. Esto demuestra que aún quedan trazas de albúmina luego de un paso de ultracentrifugación. Las muestras purificadas de LDL presentan una banda mayoritaria con menor Rf que la HSA, correspondiente con la LDL. De particular interés para este trabajo, en la muestra LDL-2p no se detectan otras bandas que puedan corresponder con proteínas contaminantes en la fracción.

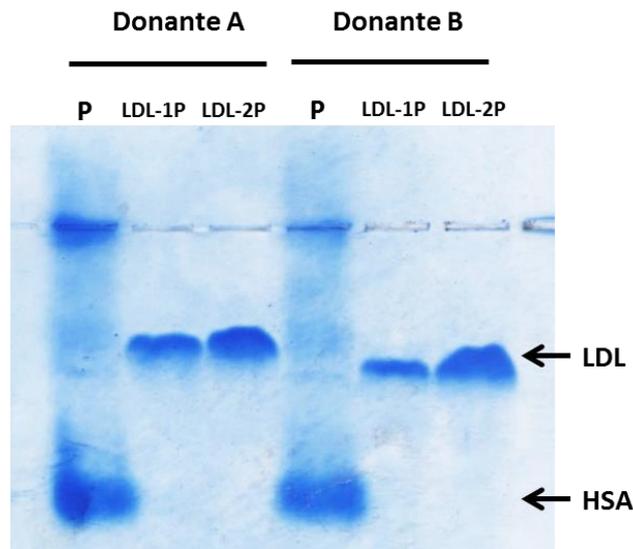


Figura 15. **Electroforesis en gel de agarosa.** Se realiza una electroforesis para evaluar la purificación de LDL a partir del plasma (**P**) de dos donantes. La purificación de la LDL se realiza por dos pasos de ultracentrifugación en gradiente de KBr, obteniéndose una fracción en cada paso. **LDL-1p**: fracción de LDL obtenida por un paso de ultracentrifugación; **LDL-2p**: LDL obtenida luego del segundo paso de ultracentrifugación. Luego del segundo paso de ultracentrifugación se obtiene una LDL purificada libre de albúmina (HSA).

## Caracterización de la LDL nitrada

### 4.2.1. Cuantificación de alfa tocoferol

Los niveles de alfa tocoferol ( $\alpha$ TOH) se determinaron mediante el método de HPLC ya descrito. El método es capaz de detectar eficazmente el  $\alpha$ TOH por fluorescencia, obteniéndose picos de elución del  $\alpha$ TOH en el entorno de los 7 min. Esto permite la cuantificación del  $\alpha$ TOH por esta técnica, realizando una curva de calibración de manera confiable y precisa. La Figura 16 presenta la curva de calibración para  $\alpha$ TOH obtenida en un rango de 1 a 50  $\mu$ M.

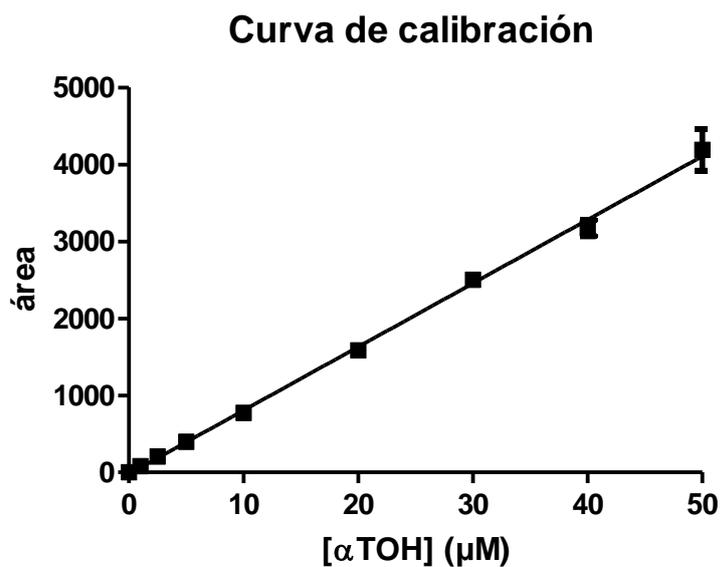


Figura 16. **Análisis de  $\alpha$ TOH.** Curva de calibración de  $\alpha$ TOH. Se realizó una curva de calibración de  $\alpha$ TOH disuelto en MeOH mediante análisis por HPLC-FLD.

Las muestras de LDL (3  $\mu$ M) fueron tratadas con tres sistemas nitrantes: ONOO<sup>-</sup> en infusión continua (20  $\mu$ M/min) o en bolos sucesivos (20  $\mu$ M por bolo cada 1 min) en un buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7,3 con DTPA 100  $\mu$ M o diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en un buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 3, 100  $\mu$ M DTPA. Se realizaron extracciones con MeOH de cada muestra para separar el  $\alpha$ TOH de la proteína y se determinó la concentración de  $\alpha$ TOH para cada muestra mediante el método descrito anteriormente. Las curvas de consumo de  $\alpha$ TOH en los distintos tratamientos se representan en la Figura 17.

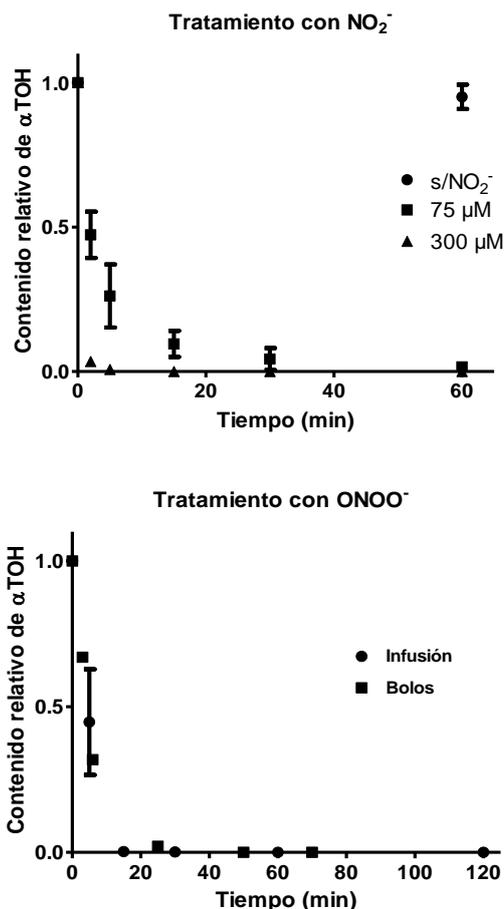


Figura 17. **Cuantificación de  $\alpha$ TOH.** Las muestras de LDL (3  $\mu$ M) se expusieron a 75  $\mu$ M o 300  $\mu$ M de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en buffer fosfato pH 3 durante 60 min. Por otra parte la LDL se expuso a una infusión continua de ONOO<sup>-</sup> (20  $\mu$ M ONOO<sup>-</sup>/min, ●) o bolos sucesivo de ONOO<sup>-</sup> (20  $\mu$ M cada 1 min, ■) en buffer fosfato pH 7,3. El  $\alpha$ TOH se extrajo con MeOH (1/9, LDL/MeOH) y el grado de oxidación se analizó por RP-HPLC, empleando el método descrito anteriormente. Los datos corresponden a la relación entre el  $\alpha$ TOH remanente a distintos tiempos respecto a la concentración inicial.

En todos los sistemas evaluados se detecta disminución de los niveles de  $\alpha$ TOH durante el tratamiento hasta lograr una depleción total de este antioxidante a los 60 min. En particular, el tratamiento con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> tiene un comportamiento dosis dependiente en el que se observa que: mientras que el  $\alpha$ TOH ha sido completamente oxidado a los 5 min del tratamiento con 300  $\mu$ M NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, aún resta aproximadamente un 30 % del  $\alpha$ TOH en las muestras que se incuban con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 75  $\mu$ M.

En cuanto al tratamiento con ONOO<sup>-</sup>, no se detectan diferencias entre la adición mediante bolos sucesivos o infusión continua. En ambos casos todo el contenido de

$\alpha$ TOH es oxidado luego de la adición de una concentración acumulada de 0,5 mM  $\text{ONOO}^-$

#### 4.2.2. Formación de carbonilos

Las muestras tratadas con  $\text{ONOO}^-$  en infusión o  $\text{NO}_2^-$  fueron analizadas por Dot-Blot en busca de carbonilos, como huellas de oxidación. En la Figura 18 se muestra la cuantificación relativa en base al máximo obtenido. Como se observa, el  $\text{ONOO}^-$  induce la formación de carbonilos de manera dosis dependiente hasta alcanzar un máximo luego de la adición acumulada de 1 mM  $\text{ONOO}^-$ . En cambio, el tratamiento con  $\text{NO}_2^-$  300  $\mu\text{M}$  en un buffer fosfato pH 3 no provoca un aumento en la formación de carbonilos durante 60 minutos de incubación, demostrando que la oxidación de los componentes de la LDL presenta un perfil diferente según los tratamientos ensayados.

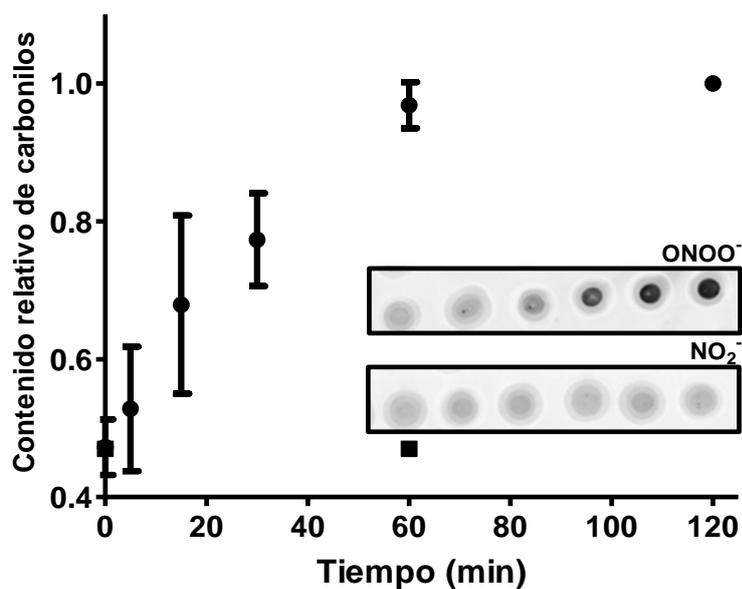


Figura 18. **Formación de carbonilos.** La LDL (3  $\mu\text{M}$ ), se expuso a un flujo continuo de  $\text{ONOO}^-$  (20  $\mu\text{M}/\text{min}$ , ●) en buffer fosfato pH 7,3. La detección se realizó mediante derivatización con dinitrofenilhidrazina seguida de análisis por Dot-Blot con anticuerpos anti-DNP. El contenido relativo de carbonilos se determina respecto al máximo obtenido. (■) Representa el tratamiento con  $\text{NO}_2^-$  300  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.3. Formación de 3-nitrotirosina

Empleando la técnica de Dot-Blot se estudió la formación del producto de nitración de la tirosina en la LDL tratada con  $\text{ONOO}^-$  en bolo o infusión y  $\text{NO}_2^-$  en medio ácido. Como se observa en la Figura 19 los niveles de 3-NT formada aumentaron conforme al aumento de  $\text{ONOO}^-$ , con un comportamiento tipo hiperbólico; a bajas concentraciones de  $\text{ONOO}^-$ , la 3-NT aumenta rápidamente mientras que a concentraciones más altas el aumento es menor. Para el caso del tratamiento con  $\text{ONOO}^-$  en bolos sucesivos, la nitración alcanza un máximo a los 0,50 - 0,75 mM mientras que la máxima formación alcanzada con  $\text{ONOO}^-$  en infusión sucede cuando la concentración de  $\text{ONOO}^-$  acumulada es del entorno de 2 mM. En ambos casos el rendimiento de formación de 3-NT en la condición de máxima nitración es similar según se detecta por Dot-Blot. Es importante destacar que el tratamiento con 300  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$  durante 60 min, no produce nitración de tirosina, revelando que la nitración causada por los distintos sistemas es diferente.

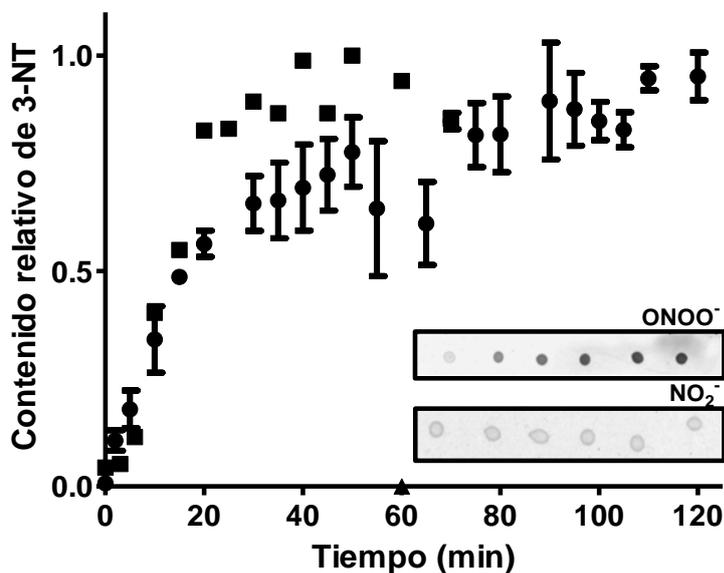


Figura 19. **Formación de 3-nitrotirosina.** La LDL (3  $\mu\text{M}$ ), se expuso a un flujo continuo de  $\text{ONOO}^-$  (20  $\mu\text{M}/\text{min}$ , ●) o bolos sucesivos (concentración final 1,4 mM, ■) de  $\text{ONOO}^-$  en buffer fosfato pH 7,3. El análisis se realizó por Dot-Blot empleando anticuerpos policlonales anti-3-NT. La cantidad relativa de 3-nitrotirosina se determinó en función de la condición de mayor intensidad. (▲) Representa el tratamiento con  $\text{NO}_2^-$  300  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.4. Nitración lipídica

##### 4.2.4.1. *Procesamiento de muestras*

Las muestras de LDL fueron co-incubadas con lipasa pancreática y fosfolipasa A<sub>2</sub> en un buffer fosfato pH 7,3 con el fin de hidrolizar los ácidos grasos esterificados en triglicéridos y fosfolípidos. Para corroborar la hidrólisis de los lípidos en estas condiciones se realiza un seguimiento de la incubación mediante cromatografía en capa fina. A medida transcurre el tiempo de incubación se liberan ácidos grasos, que presentan un R<sub>f</sub> menor al de sus equivalentes esterificados. En la Figura 20 se muestra una TLC representativa de estos análisis revelada con I<sub>2</sub>.

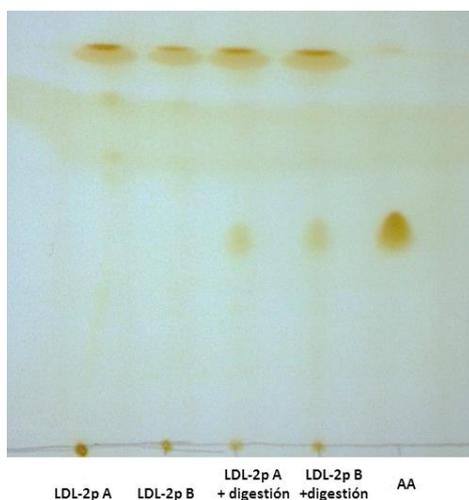


Figura 20. **Hidrólisis enzimática de triglicéridos y fosfolípidos de la LDL.** Se muestra una fotografía de la capa fina luego de realizada la cromatografía para separación de lípidos de la LDL y posterior revelado con vapores de I<sub>2</sub>. Se presentan dos muestras de LDL correspondientes a diferentes donantes (LDL-2p A y B), y las muestras tratadas con la mezcla de enzimas hidrolíticas (+digestión). En el carril de la derecha se sembró ácido araquidónico (AA) como estándar de ácido graso.

Las muestras tratadas con ONOO<sup>-</sup> o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fueron tratadas con lipasa y fosfolipasa, y los lípidos fueron posteriormente extraídos por extracción con hexanos. La fase orgánica se

separa empleando un método de extracción en fase sólida descrito en sección métodos. De esta manera se obtiene una fracción enriquecida en ácidos grasos libres, que se evaporaran a sequedad. Finalmente se resuspenden en un volumen mínimo para su análisis por HPLC-MS/MS.

#### 4.2.4.2. *Detección de ácidos grasos nitrados*

En ensayos primarios se estudió la formación de ácidos grasos nitrados bajo condiciones de máxima exposición a  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{ONOO}^-$ . Para ello se trataron muestras de LDL (3  $\mu\text{M}$ ) con  $\text{NO}_2^-$  300  $\mu\text{M}$  en medio ácido (pH 3) durante 60 min o con  $\text{ONOO}^-$  en infusión 20  $\mu\text{M}/\text{min}$  a pH 7,3 durante 60 min. Las muestras fueron procesadas según se describió antes, y posteriormente se sometieron a extracción orgánica y extracción en fase sólida. La fracción enriquecida en ácidos grasos se analizó por HPLC-MS/MS en busca de ácidos grasos nitrados con los métodos desarrollados en etapas previas. En particular, siendo que los ácidos oleico y linoleico son los más abundantes en la LDL, se realizó especial énfasis en la identificación los derivados nitrados de éstos. En este caso se empleó un método cromatográfico en el que se utiliza una columna de 15 cm de largo y un gradiente lento (Sistema B), en el que se logra separar los distintos isómeros de cada ácido graso nitrado. La detección se realiza por *MRM*, en busca de dos transiciones por cada ácido graso nitrado y sus correspondientes estándares pesados. En la Figura 21 se muestra el cromatograma del análisis de las muestras tratadas con  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{ONOO}^-$ .

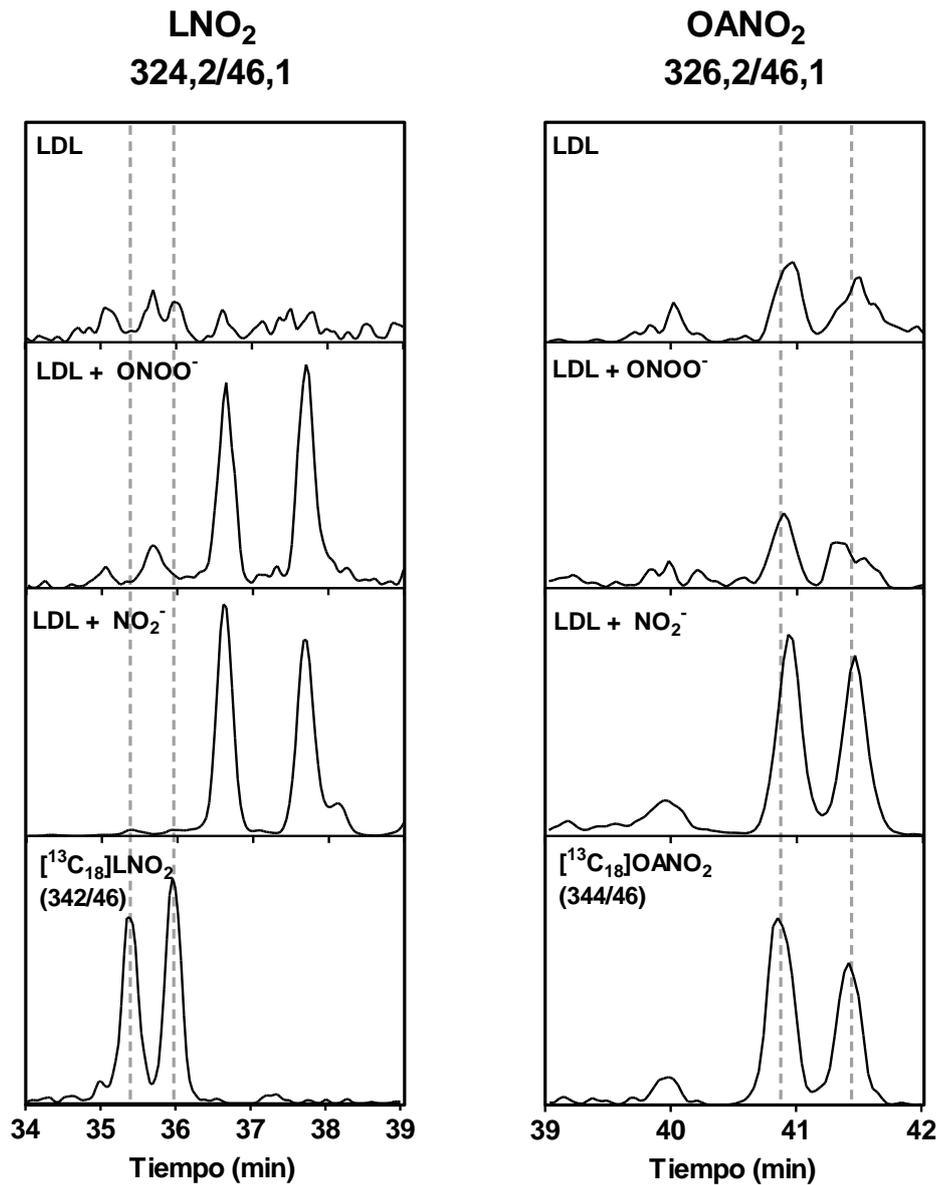


Figura 21. **Análisis de ácidos grasos de la LDL por HPLC-MRM.** Se muestran los cromatogramas obtenidos para los análisis de las fracciones enriquecidas en ácidos grasos de las muestras de LDL sin tratar (LDL), tratada con  $\text{ONOO}^-$  en infusión durante 60 min ( $\text{LDL} + \text{ONOO}^-$ ) y LDL tratada con  $\text{NO}_2^-$  en medio ácido ( $\text{LDL} + \text{NO}_2^-$ ). Izquierda-> Estudio de la transición 324,2/46,1 correspondiente con la pérdida del grupo nitro del ácido linoleico nitrado. Derecha-> estudio de la transición 326,2/46,1 correspondiente con la pérdida del grupo nitro del ácido oleico nitrado. La línea punteada indica el tiempo de retención de los estándares de los ácidos grasos nitrados con  $^{13}\text{C}$ .

En las muestras provenientes de LDL sin exponer a agentes nitrantes no se detecta señal en la transición correspondiente con  $\text{LNO}_2$  y la señal correspondiente a  $\text{OANO}_2$  presenta picos que se encuentran cercanos al ruido.

En el caso del tratamiento con  $\text{NO}_2^-$ , se detectan picos en las transiciones 326,2/46,1 y 326,2/295,1 (no mostrado) que coinciden con el tiempo de retención obtenido para el estándar de  $^{13}\text{C}_{18}\text{OANO}_2$  indicando la formación de derivados nitrados del ácido oleico en la LDL tratada con  $\text{NO}_2^-$ . Sin embargo en las muestras tratadas con  $\text{ONOO}^-$  no se detecta mayor señal que para la LDL sin tratar.

En el caso de las transiciones correspondientes con el ácido linoleico nitrado, se encuentran picos con alta intensidad en las muestras de LDL sometidas a ambos tratamientos pero que no coinciden en tiempo de retención con el del estándar pesado  $^{13}\text{C}_{18}\text{LNO}_2$ . Esto indica que se generan compuestos que no son derivados nitrados del ácido linoleico. De todas formas, las transiciones estudiadas corresponden con la fragmentación del grupo nitroalqueno, y para verificar la presencia de este grupo funcional electrofílico, se estudió la reactividad con  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta\text{ME}$ ).

Las muestras tratadas con  $\text{ONOO}^-$  se incubaron con  $\beta\text{ME}$  (2 mM) en buffer fosfato pH 7,3 durante 30 min y se sometieron a un nuevo análisis por HPLC-MS/MS en busca de las transiciones correspondientes al nitroalqueno. En estas condiciones, el  $\beta\text{ME}$  es capaz de reaccionar con los nitroalquenos mediante adición de Michael y por tanto, la señal correspondiente a los nitroalquenos debe disminuir. En este caso, el método cromatográfico empleado utiliza una columna de fase reversa de 10 cm de largo y un flujo de 700  $\mu\text{L}/\text{min}$  por lo que el tiempo de retención del compuesto estudiado disminuye. En la Figura 22 se muestra el análisis de una muestra tratada con  $\text{ONOO}^-$  en la que se detecta señal para la transición 324,2/46,1 y ésta es completamente eliminada cuando se trata con  $\beta\text{ME}$ , indicando que el compuesto en estudio es un electrófilo.

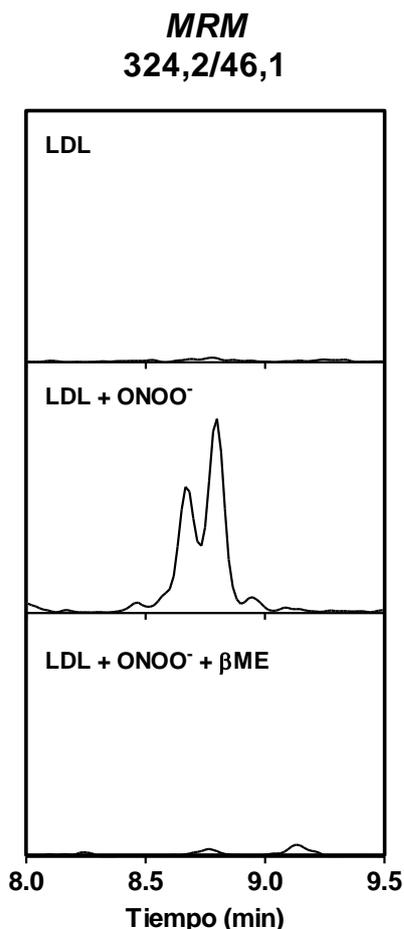


Figura 22. **Reactividad con  $\beta$ ME**. Se muestran los cromatogramas obtenidos para los análisis de MRM empleando la transición 324,2/46,1 para las fracciones enriquecidas en ácidos grasos de las muestras de LDL sin tratar (LDL), tratada con  $\text{ONOO}^-$  en infusión durante 60 min (LDL +  $\text{ONOO}^-$ ) y la fracción de anterior tratada con  $\beta$ ME (LDL +  $\text{ONOO}^-$  +  $\beta$ ME). Se detecta la presencia de un compuesto que se forma con  $\text{ONOO}^-$  y desaparece cuando es tratado con un nucleófilo como el  $\beta$ ME, sugiriendo la presencia de la función nitroalqueno, que reacciona mediante adición de Michael con el  $\beta$ ME (ver Figura 4).

Considerando los resultados obtenidos durante la optimización de los métodos de detección de ácidos grasos nitrados por HPLC-MS/MS, sabemos que las transiciones que presenta el  $\text{LNO}_2$  son compartidas con el  $\text{NO}_2$ -cLA, pero presenta un tiempo de retención menor que el de su isómero de dienos conjugados. Por lo tanto se comparó el tiempo de retención de los derivados nitrados obtenidos en las muestras de LDL con el tiempo de retención del  $\text{NO}_2$ -cLA. En la Figura 23 se representan los cromatogramas correspondientes con el análisis del nitroalqueno encontrado en LDL tratada con

agentes nitrantes y el del estándar pesado de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$ . Este análisis fue realizado con el método cromatográfico de larga duración empleando una columna de fase reversa de 15 cm de largo (Sistema B). A partir de los resultados obtenidos (Figura 23) podemos inferir que el nitroalqueno presente en las muestras de LDL tratada, cuyas transiciones coinciden con las del  $\text{LNO}_2$  y presenta tiempo de retención mayor, es un derivado nitrado del ácido linoleico conjugado,  $\text{NO}_2\text{-cLA}$ .

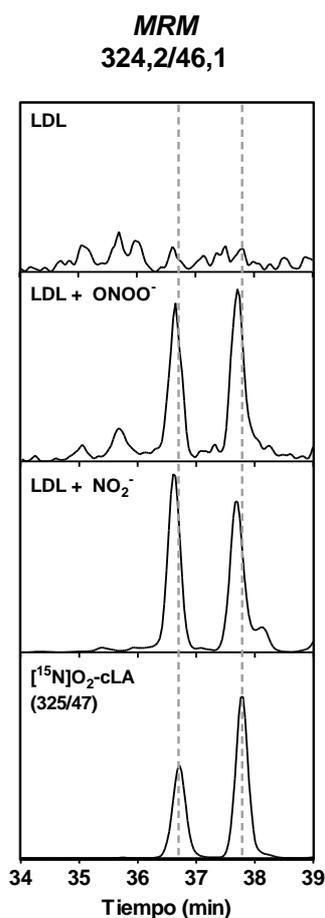


Figura 23. **Detección de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  en LDL nitrada.** Se analizaron las muestras de LDL sin tratar (LDL), tratada con  $\text{ONOO}^-$  en infusión durante 60 min ( $\text{LDL} + \text{ONOO}^-$ ) y LDL tratada con  $\text{NO}_2^-$  en medio ácido ( $\text{LDL} + \text{NO}_2^-$ ). Se adicionó un estándar de  $^{15}\text{N}\text{O}_2\text{-cLA}$  en la muestra con el fin de determinar coincidencias en el tiempo de retención.

#### 4.2.5. Cuantificación de cLA en LDL

Dado que no existen reportes que estudien la presencia de cLA en lípidos que componen la LDL, se procedió a estudiar la presencia de este lípido en las fracciones de ácidos grasos derivados de los lípidos de la LDL obtenidas de la misma manera que se describe en etapas anteriores. Para ello se hacen reaccionar los ácidos grasos con un reactivo (PTAD) que reacciona específicamente con dobles enlaces conjugados. De esta manera, el cLA presente en la muestra queda derivatizado y presenta un patrón de fragmentación característico de la ruptura del grupo PTAD (Figura 24). De esta manera se analiza por HPLC-MS/MS en busca del producto de reacción cLA-PTAD (detallado en Metodología). Primeramente se realizó un análisis sobre 9,11-cLA (comercial) en solución con el que se elaboró una curva de calibración. Luego se extrajeron los ácidos grasos de muestras de LDL (3  $\mu$ M) sometida a hidrólisis con lipasa pancreática y fosfolipasa, y la fracción purificada de ácidos grasos se puso a reaccionar con PTAD para derivatizar el cLA presente. Como se observa en la Figura 24, en la muestra obtenida a partir de LDL se detecta un pico mayoritario cuyo tiempo de retención coincide con el del compuesto derivado del 9,11-cLA. Además, se encuentra otro pico con un tiempo de retención menor que podemos asumir, se corresponde con un isómero de posición del 9,11-cLA presente en la LDL. La cuantificación del cLA presente en LDL se realiza mediante la extrapolación del área correspondiente a los dos isómeros en una curva de calibración externa realizada con 9,11-cLA. El análisis elaborado a partir de las muestras de LDL demuestra la presencia de cLA en lípidos de la LDL, en una concentración de 44 pmol/mg de ApoB100.

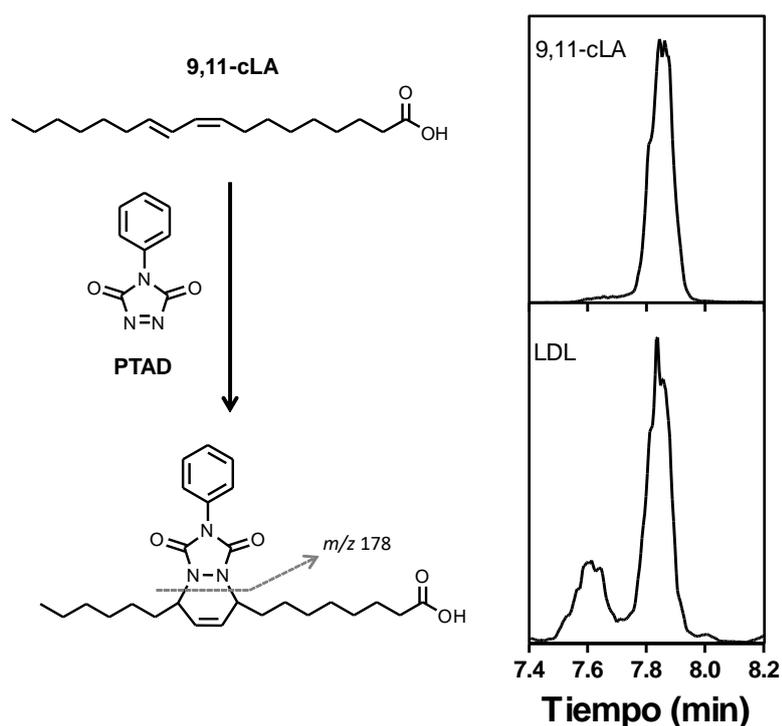


Figura 24. **Detección de cLA en LDL.** Se extrajeron los ácidos grasos de muestras de LDL (3  $\mu$ M) sometida a hidrólisis con lipasa pancreática y fosfolipasa, y la fracción purificada de ácidos grasos se puso a reaccionar con PTAD para derivatizar el cLA presente. **Izquierda;** Esquema de reacción de derivatización del 9,11-cLA. **Derecha;** Cromatograma obtenido del análisis por HPLC-MS/MS de una solución estándar de 9,11-cLA 250 nM (superior) y fracción de ácidos grasos derivados de LDL luego de derivatizar con PTAD.

#### 4.2.6. Cuantificación de $NO_2$ -cLA en LDL nitrada

Luego de confirmada la presencia de cLA en LDL, y de la observación de que éste se nitra por infusión de  $ONOO^-$ , se procedió a estudiar la cinética de nitración del cLA presente en la LDL a lo largo de toda la infusión. El análisis se realizó con los métodos de HPLC-MS/MS ya optimizados (Sistema A) empleando una columna de fase reversa de 10 cm de largo y un tamaño de poro de 2  $\mu$ m con la que se disminuye el tiempo de corrida a un total de 15 min por muestra. La cuantificación se realizó mediante el agregado de

un estándar interno ( $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ ) a cada muestra en el inicio del procesamiento y de una curva de calibración elaborada con  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  y  $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ . Los resultados obtenidos de la cuantificación se normalizan por concentración de proteína (ApoB100) y se representan en la Figura 25. En la figura se observa que la nitración del cLA aumenta con mayor velocidad en etapas iniciales de la infusión hasta alcanzar un valor máximo a los 45 min. En condiciones de máxima nitración se obtienen en promedio 5 pmol de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  por mg de proteína, lo que representa aproximadamente un 10 % del cLA presente en la LDL.

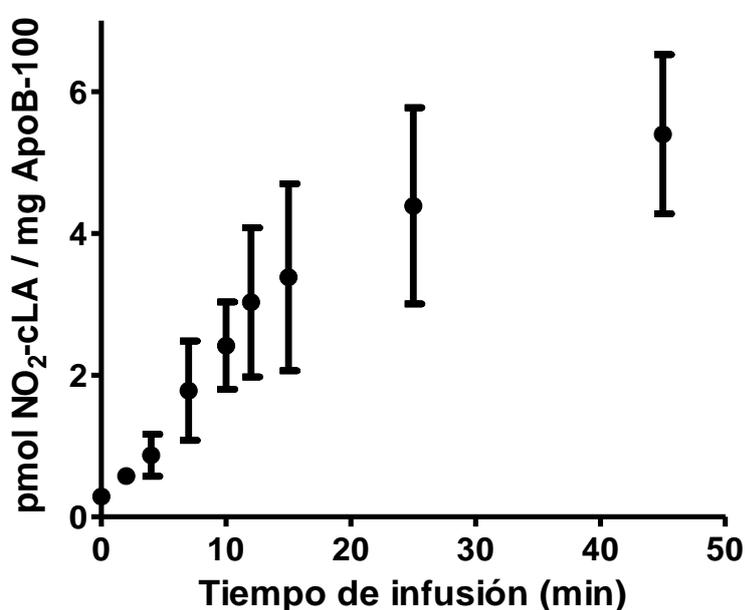


Figura 25. **Formación de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  en LDL por infusión de  $\text{ONOO}^-$ .** LDL ( $3\ \mu\text{M}$ ) se sometió a infusión de  $\text{ONOO}^-$  ( $20\ \mu\text{M}/\text{min}$ ) en buffer fosfato pH 7,3 bajo agitación constante. Las reacciones de oxidación se detienen por el agregado de BHT a distintos tiempos y se procedió con la digestión de los lípidos y extracción de ácidos grasos. La cuantificación de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  se realiza por HPLC-MS/MS empleando estándares internos y los valores se normalizan por el contenido de ApoB100.

## 5. Discusión y conclusiones

Según los resultados descritos en este trabajo podemos destacar las siguientes observaciones; el ONOO<sup>-</sup> en infusión de 20 μM/min genera una LDL (3 μM) depletada de antioxidantes, que contiene altos niveles de carbonilos y nitrotirosina, todos parámetros de una LDL oxidada. Además se demuestra que se generan ácidos grasos nitrados (libres o esterificados en triglicéridos y fosfolípidos) con posible acción anti-inflamatoria.

En todos los sistemas nitrantes evaluados, debido a la alta concentración de oxidantes la depleción de αTOH es el proceso que sucede con mayor velocidad. El αTOH es un antioxidante que reacciona rápidamente con <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> y otros radicales derivados del ONOO<sup>-</sup><sup>75</sup>, y la proporción que hay en la LDL alcanza para unos pocos minutos de tratamiento.

El reactivo de DNPH reacciona con carbonilos, tanto productos de oxidación lipídica como proteica. Los radicales derivados del peroxinitrito pueden oxidar cadenas laterales de algunos aminoácidos produciendo grupos carbonilo que reaccionan con el DNPH. Además el <sup>•</sup>OH generado por homólisis de ONOO<sup>-</sup> y el <sup>•</sup>NO<sub>2</sub>, generado a partir de ONOO<sup>-</sup> y también a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pueden abstraer un electrón de ácidos grasos insaturados generando un radical centrado en carbono, iniciador del proceso de lipoperoxidación, vía por la cual se generan hidroperóxidos lipídicos que son inestables y se rompen generando aldehídos reactivos que pueden ser detectados por reacción con DNPH (ver Figura 26). En nuestros sistemas observamos, mediante *western blot* anti DNP, que el ONOO<sup>-</sup> produce oxidación suficiente como para detectar presencia de DNP en las muestras mientras que el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no genera dicho efecto.

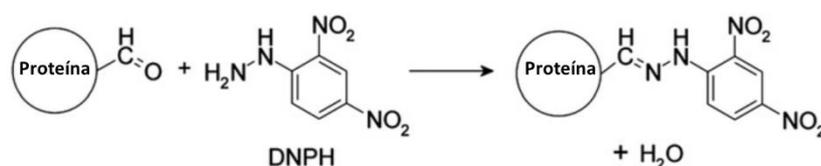


Figura 26. Esquema de la reacción carbonilo proteico con 2,4-dinitrofenilhidrazina. (Adaptado de Hawkins *et al*, 2006<sup>83</sup>)

El nivel de nitración proteica, evaluado como 3-nitrotirosina por western blot, también revela diferencias en ambos tratamientos; el  $\text{NO}_2^-$  no produce un aumento de nitración de tirosinas mientras que la infusión o bolos sucesivos de  $\text{ONOO}^-$  generan oxidación hasta alcanzar un máximo de formación de 3-nitrotirosina. Cabe destacar que para la nitración de tirosina, la cantidad de agente nitrante en nuestros sistemas siempre es limitante respecto a la cantidad de tirosinas presentes en la muestra. El mecanismo radicalar (y principal) de nitración de tirosina involucra la participación de un radical (que puede ser  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  o  $\cdot\text{NO}_2$ ) reaccionando con la tirosina para dar radical tirosilo y luego éste reacciona con  $\cdot\text{NO}_2$  produciendo finalmente la 3-nitrotirosina (Figura 27). En el caso de la incubación con nitrito, y considerando un rendimiento de generación de radicales de un 100%, se generarían  $600\ \mu\text{M}$  de  $\cdot\text{NO}_2$  que frente a las  $456\ \mu\text{M}$  de tirosinas ( $152$  tirosinas por apoB100) constituiría un factor limitante. En cambio en la incubación con  $\text{ONOO}^-$ , luego de una hora de incubación la concentración acumulada de radicales derivados de la homólisis es de  $720\ \mu\text{M}$  ( $1200\ \mu\text{M}$  de  $\text{ONOO}^-$ , 30 % homoliza generando dos radicales por  $\text{ONOO}^-$ ).

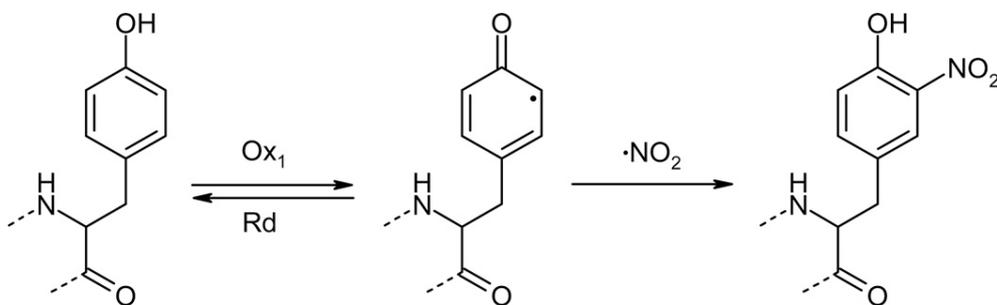


Figura 27. **Esquema de nitración de tirosina por vía radicalar.** Un oxidante de un electrón ( $\text{Ox}_1$ ) genera el radical tirosilo que finalmente se combina con  $\cdot\text{NO}_2$  mediante reacción radical-radical para dar 3-nitrotirosina. La presencia de un reductor (Rd), como el ascorbato, puede revertir el primer paso de la reacción.

Desde el primer reporte de generación de lípidos oxidados que contienen grupos nitrogenados derivados de  $\cdot\text{NO}$  <sup>54</sup>, aparecen dos artículos en la literatura que reportan presencia de ácidos grasos nitrados en muestras biológicas (sin tratamiento); Lima *et al*

en 2002 reportaron la presencia de LNO<sub>2</sub> en plasma humano y un año más tarde se reportó la presencia de LNO<sub>2</sub> esterificado a colesterol en LDL.

En el presente trabajo se analizaron los productos de hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos de la LDL y no se detectó la presencia de derivados nitrados de los ácidos oleico, linoleico, linoleico conjugado y araquidónico. Sin embargo, se detectó la formación de derivados nitrados del cLA en LDL mediante exposición a ONOO<sup>-</sup>. En este trabajo también se determina la concentración de cLA total en LDL (5 pmol por mg de apoB100) y se reporta que la cantidad de cLA nitrado por infusión de ONOO<sup>-</sup> alcanza un máximo que no supera el 10 % del cLA total presente en LDL.

El hecho de encontrar nitración en cLA es consistente con estudios previos; Bonacci *et al*/ reportaron estudios de nitración de ácidos grasos insaturados, en los que encontraron que el cLA presenta mayor reactividad frente a especies nitrantes (\*NO<sub>2</sub> gas) debido a la resonancia que se da sobre los dobles enlaces conjugados, obteniéndose cinco órdenes de magnitud mayor rendimiento en comparación con los dienos no conjugados<sup>44</sup>.

Los datos aquí mostrados nos permiten imaginarnos una situación fisiológica en la que los niveles basales de agentes nitrantes pueda darse la nitración de los ácidos grasos en la LDL confiriéndole un efecto regulador/protector. Hay dos formas principales con las que la LDL pueda tener ácidos grasos nitrados en su composición: 1) que éstos se incorporen en la dieta, sean absorbidos, y ensamblados en lipoproteínas hasta que finalmente terminen formando parte de una LDL o, 2) que la LDL se nitre luego de formada. Resulta difícil pensar en reacciones de oxidación y nitración en un LDL en circulación, pues el plasma presenta distintos antioxidantes capaces de evitarlo. Sin embargo, se puede pensar en que una parte del \*NO producido por el endotelio en condiciones fisiológicas se acumule en el interior hidrofóbico de la LDL, debido al elevado coeficiente de partición que tiene y al denominado *lens-effect*<sup>84,85</sup>. El O<sub>2</sub> también puede acumularse en el núcleo hidrofóbico de la LDL<sup>84</sup>, por lo que dentro de la LDL circulante pueden estar favorecidas las reacciones de autoxidación del \*NO, que derivan en especies capaces de nitrar ácidos grasos insaturados. Además, la posibilidad de encontrar en plasma LDL con ácidos grasos nitrados no puede descartarse

justificándose únicamente con la presencia de altas concentraciones de antioxidantes, ya que existen varios estudios en los que se aíslan lipoproteínas del plasma de pacientes y se detecta tanto apoB como apoA nitradas en tirosina, y que la nitración de ésta se correlaciona con la severidad de enfermedad cardiovascular que presentan los pacientes<sup>86,87</sup>. Es importante destacar que estos resultados implican que la LDL circulante está expuesta a niveles basales de agentes nitrantes (en particular  $\cdot\text{NO}_2$ ) y que la exposición aumenta en pacientes con riesgo cardiovascular.

Una vez formados (hipotéticamente) los ácidos grasos nitrados en la LDL, existe una limitante para que pueda ejercer su rol protector tal como se ha estudiado en la literatura; deben hidrolizarse para separarse del éster del que forman parte. Todos los estudios de acción protectora de ácidos grasos nitrados en diversos modelos biológicos han sido realizados con ácidos libres por lo que no se puede pensar al triglicérido o un fosfolípido conteniendo una de sus cadenas acil graso nitrada como un compuesto protector. Debe existir un paso en el que éstos sean hidrolizados y ahí sí se liberen los ácidos grasos nitrados al interior celular. El transporte intracelular puede suceder por las mismas proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, del inglés *Fatty Acid Binding Protein*) que transportan ácidos grasos por el citosol y al núcleo, pudiéndose dar allí su acción como señalizador modulando la expresión de determinados genes. Datos no publicados demuestran que las FABPs unen ácidos grasos nitrados con constantes de asociación similares a la de sus correspondientes no modificados (Ferreira, A., comunicación personal)

Otra situación posible sería la del empleo de ácidos grasos nitrados como fármacos moduladores de aterosclerosis. Existen reportes de modelos animales de aterosclerosis en los que la administración sistémica de  $\text{OANO}_2$  reduce la acumulación de lípidos en la pared arterial y estabiliza la placa de ateroma<sup>88</sup>. Existen múltiples mecanismos que fundamentan la acción antiinflamatoria en aterosclerosis. Los ácidos grasos nitrados tienen acción directa sobre células endoteliales; producen aumento de producción de  $\cdot\text{NO}$  por aumento en la expresión de la NOS2, y aumentan expresión de HO-1, ambos por vías dependientes e independientes de Nrf2<sup>89,90</sup>. También participan en la

regulación del plegamiento de proteínas mediante la síntesis *de novo* de chaperonas<sup>91</sup> y en la promoción de angiogénesis por producción de HIF1a<sup>92</sup>. Asimismo hay fuerte evidencia del posible rol antiinflamatorio de los ácidos grasos nitrados en aterosclerosis actuando sobre macrófagos regulando la producción de citoquinas y quimioquinas y receptores de adhesión celular. Inhiben inflamación vascular interfiriendo con la señalización por TLR4 y vías JAK/STAT y Nrf2<sup>93-95</sup>. Sin embargo más allá de los mecanismos de acción antiinflamatoria se debe considerar que la administración sistémica de ácidos grasos nitrados puede tener implicancias más amplias. Un hecho importante a considerar es la acción de ácidos grasos nitrados sobre la hemostasis en donde las plaquetas juegan un rol fundamental. Se ha demostrado inhibición de mediadores proinflamatorios tales como la ciclooxigenasa o citocromoP450 monooxigenasas por algunos ácidos grasos nitrados<sup>96,97</sup>, pero la inhibición de estos componentes en el contexto de la aterosclerosis no ha sido estudiada. Para superar esta dificultad, existe una estrategia posible, en la que los ácidos grasos nitrados sean incorporados en una LDL y posteriormente administrada por vía intravenosa a los pacientes con riesgo cardiovascular. Esta idea se sustenta en el uso de bionanopartículas como transportadores de fármacos. Existen muchos antecedentes del uso de lipoproteínas como transportadores de fármacos para diferentes patologías, mayoritariamente tratamiento de algunos tipos de cáncer, en los que las células tumorales presentan incorporación de LDL aumentada<sup>98</sup>. En cuanto al tratamiento de aterosclerosis, existen trabajos algunos trabajos de investigación en los que se incorporó palmitoil-dexametasona en LDL humana y se verificó su actividad tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales de aterosclerosis<sup>99,100</sup>. También hay reportes previos en los que la LDL se acetila previo a la incorporación de un fármaco con el fin de que sea reconocida por receptores barrenderos<sup>101</sup>. En ese caso se diseñó para tratar enfermedades infecciosas pero también podría usarse en aterosclerosis con el fin de ser más selectivo en el destino final de la droga, para nuestro caso sería el ácido graso nitrado.

## 6. Perspectivas

La detección de formación de ácidos grasos nitrados en LDL expuesta a agentes nitrantes que se encuentran en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas, estimula el estudio del efecto biológico que esta LDL es capaz de inducir. Si bien la LDL presenta marcadores de oxidación que pueden ser reconocidos para generar respuesta pro-inflamatoria, a partir de las observaciones de este trabajo surgen preguntas acerca de si éstos compuestos pueden tener un rol modulador de la respuesta inflamatoria, al menos en etapas tempranas del desarrollo de la aterosclerosis. Por tanto, existe un especial interés en evaluar el efecto biológico de una LDL que contiene ácidos grasos nitrados en cultivos celulares. Se plantean experimentos en los que se exponga un cultivo de macrófagos a LDL oxidada (en el que se esperaría observar un fenotipo pro-inflamatorio característico de células espumosas) y evaluar el efecto que presenta la co-incubación con LDL que contiene nitroalquenos. Es de esperar que la señal inducida sea dependiente de la proporción entre productos oxidados/lípidos nitrados, esperándose ver disminución en el perfil pro-inflamatorio del macrófago en los casos en que la proporción de nitroalquenos sea mayor, demostrando un rol protector de la LDL nitrada en su componente lipídico. Sería interesante evaluar LDL con nitrolípidos formados por exposición a sistemas nitrantes similares a los empleados en este trabajo, así como también LDL a la que se le incorporen ácidos grasos nitrados de manera exógena, tratando de preservar el estado nativo de los demás componentes. Este último enfoque, permitiría evaluar a la LDL como medio de transporte para ácidos grasos nitrados administrados como fármacos. El desarrollo de sistemas de detección y cuantificación de estos analitos en muestras biológicas por HPLC-MS/MS, como los que se realizaron en este trabajo, permiten estudiar la incorporación de ácidos grasos nitrados en cultivos celulares y en modelos animales. Esto permite evaluar la biodisponibilidad de los nitroalquenos una vez que son administrados por disitintas vías y bajo distintas preparaciones.

## 7. Referencias bibliográficas

1. Jonas, A. & Phillips, M. C. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (eds. Vance, D. E. & Vance, J. E.) 485 (2008).
2. Chatterton, J. E. *et al.* Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface. *J. Lipid Res.* **36**, 2027–37 (1995).
3. Richardson, P. E. *et al.* Assembly of lipoprotein particles containing apolipoprotein-B: structural model for the nascent lipoprotein particle. *Biophys. J.* **88**, 2789–2800 (2005).
4. Kumar, V. *et al.* Three-dimensional cryoEM reconstruction of native LDL particles to 16Å resolution at physiological body temperature. *PLoS One* **6**, (2011).
5. McLeod, R. S. & Yao, Z. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* 459–488 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-444-63438-2.00016-X
6. Schoen, F. J. in *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* 511 (2010). doi:10.1097/PAS.0b013e3181bc5f0f
7. Ministerio de Salud Pública. Mortalidad por causa, sexo y edad. Uruguay año 2015. *Estadísticas de Mortalidad* (2016). at <[www.msp.gub.uy/publicación/estadísticas-de-mortalidad/](http://www.msp.gub.uy/publicación/estadísticas-de-mortalidad/)>
8. Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
9. Stocker, R. & Kearney, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**, 1381–478 (2004).
10. Díaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A. & Kearney, J. F. Antioxidants With a Reduction. *N. Engl. J. Med.* **337**, 408–416 (1997).
11. Libby, P. in *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* **1**, 995–1009 (2001).
12. Hessler, J. R., Morel, D. W., Lewis, J. & Chisolm, G. M. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **3**, 215–222 (1983).
13. Morel, D. W., Hessler, J. R. & Chisolm, G. M. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res.* **24**, 1070–1076 (1983).
14. Klatt, P. & Esterbauer, H. Oxidative hypothesis of atherogenesis. *J Cardiovasc Risk* **3**, 346–351 (1996).
15. Podrez, E. A. *et al.* Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest.* **105**, 1095–1108 (2000).

16. Levitan, I., Volkov, S. & Subbaiah, P. V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 39–75 (2010).
17. Beckmann, J. S. *et al.* Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **36**, 152–162 (1994).
18. Leeuwenburgh, C. *et al.* Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in Low Density Lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Biol. Chem.* **272**, 3520–3526 (1997).
19. Anderson, J. W. *et al.* Antioxidant supplementation effects on low-density lipoprotein oxidation for individuals with type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**, 451–61 (1999).
20. Berliner, J. A. *et al.* Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* **85**, 1260–1266 (1990).
21. Itabe, H., Mori, M., Fujimoto, Y., Higashi, Y. & Takano, T. Minimally Modified LDL Is an Oxidized LDL Enriched with Oxidized Phosphatidylcholines. *J. Biochem.* **134**, 459–465 (2003).
22. Boullier, A. *et al.* Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1169–1176 (2006).
23. Sigari, F., Lee, C., Witztum, J. L. & Reaven, P. D. Fibroblasts that overexpress 15-lipoxygenase generate bioactive and minimally modified LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 3639–45 (1997).
24. Harkewicz, R. *et al.* Cholesteryl ester hydroperoxides are biologically active components of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **283**, 10241–10251 (2008).
25. Balagopalakrishna, C., Bhunia, A. K., Rifkind, J. M. & Chatterjee, S. Minimally modified low density lipoproteins induce aortic smooth muscle cell proliferation via the activation of mitogen activated protein kinase. *Mol Cell Biochem* **170**, 85–89 (1997).
26. Bielicki, J. K., Forte, T. M. & McCall, M. R. Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* **37**, 1012–21 (1996).
27. Sevanian, A., Hodis, H. N., Hwang, J., Mcleod, L. L. & Peterson, H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J. Lipid Res.* **36**, 1971–1986 (1995).
28. McCall, M. R., Carr, A. C., Forte, T. M. & Frei, B. LDL modified by hypochlorous acid is a potent inhibitor of lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Arter. Thromb Vasc Biol* **21**, 1040–1045 (2001).

29. Woenckhaus, C. *et al.* Hypochlorite-modified LDL: chemotactic potential and chemokine induction in human monocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **86**, 27–33 (1998).
30. Trostchansky, A. *et al.* *Nitric Oxide Redox Biochemistry in Lipid Environments. Nitric Oxide* (Elsevier Inc., 2010). doi:10.1016/B978-0-12-373866-0.00002-2
31. Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J. & Merkus, D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, (2013).
32. Newsholme, P. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and  $\beta$ -cell function: A critical role for amino acids. *J. Endocrinol.* **214**, 11–20 (2012).
33. Liochev, S. I. & Fridovich, I. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1465–1469 (2007).
34. Rubbo, H. & Radi, R. Protein and lipid nitration: Role in redox signaling and injury. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**, 1318–1324 (2008).
35. Fridovich, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* **272**, 18515–18517 (1997).
36. Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chemical Biology* **4**, 161–177 (2009).
37. Augusto, O. *et al.* Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859 (2002).
38. Szabó, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 662–680 (2007).
39. Rubbo, H. Nitro-fatty acids: Novel anti-inflammatory lipid mediators. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **46**, 728–734 (2013).
40. Freeman, B. A. *et al.* Nitro-fatty acid formation and signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 15515–15519 (2008).
41. Trostchansky, A. & Rubbo, H. Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1887–96 (2008).
42. Gallon, A. a. & Pryor, W. a. The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids* **29**, 171–176 (1994).
43. Napolitano, A., Camera, E., Picardo, M. & D'Ischia, M. Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: Formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1,3-pentadiene products. *J. Org. Chem.* **65**, 4853–4860 (2000).

44. Bonacci, G. *et al.* Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082 (2012).
45. Ferreira, A. M. *et al.* Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem. J.* **417**, 223–234 (2009).
46. Rubbo, H., Trostchansky, A. & O'Donnell, V. B. Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: Mechanisms and consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 167–172 (2009).
47. Trostchansky, A. *et al.* Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* **46**, 4645–4653 (2007).
48. Batthyany, C. *et al.* Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 20450–20463 (2006).
49. Rudolph, V. *et al.* Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166 (2010).
50. Diaz-Amarilla, P. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radic. Biol. Med.* **95**, 112–120 (2016).
51. Schopfer, F. J. *et al.* Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2340–5 (2005).
52. Gallon, A. a. & Pryor, W. a. The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linolenate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids* **28**, 125–133 (1993).
53. O'Donnell, V. B. *et al.* Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 83–92 (1999).
54. Rubbo, H. *et al.* Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 15–25 (1995).
55. Gallon, A. a. & Pryor, W. a. The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linolenate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids* **28**, 125–133 (1993).
56. Lima, É. S., Di Mascio, P., Rubbo, H. & Abdalla, D. S. P. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* **41**, 10717–10722 (2002).
57. Lima, E. S., Di Mascio, P. & Abdalla, D. S. P. Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated

- lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J. Lipid Res.* **44**, 1660–1666 (2003).
58. Baker, P. R. S. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464–42475 (2005).
  59. Rudolph, V. *et al.* Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation,  $\beta$ -oxidation, and protein adduction. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461–1473 (2009).
  60. Tsikas, D., Zoerner, A. A., Mitschke, A. & Gutzki, F. M. Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: A targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids* **44**, 855–865 (2009).
  61. Tsikas, D. *et al.* Specific GC-MS/MS stable-isotope dilution methodology for free 9- and 10-nitro-oleic acid in human plasma challenges previous LC-MS/MS reports. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 2895–2908 (2009).
  62. Trettin, A. *et al.* GC-MS/MS and LC-MS/MS studies on unlabelled and deuterium-labelled oleic acid (C18:1) reactions with peroxynitrite (ONOO-) in buffer and hemolysate support the pM/nM-range of nitro-oleic acids in human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **964**, 172–179 (2014).
  63. Trettin, A. *et al.* GC-MS/MS and LC-MS/MS studies on unlabelled and deuterium-labelled oleic acid (C18:1) reactions with peroxynitrite (ONOO-) in buffer and hemolysate support the pM/nM-range of nitro-oleic acids in human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **964**, 172–179 (2014).
  64. Napolitano, A., Camera, E., Picardo, M. & Ischia, M. Reactions of Hydro(pero)xy Derivatives of Polyunsaturated Fatty Acids/Esters with Nitrite Ions under Acidic Conditions . Unusual Nitrosative Breakdown of Methyl 13-Hydro(pero)xyoctadeca-9 , 11-dienoate to a Novel 4-Nitro-2-oximinoalk-3-enal Prod. *Society* 2096–2103 (2002).
  65. Trostchansky, A. *et al.* Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* **46**, 4645–4653 (2007).
  66. Fazzari, M. *et al.* Generation and esterification of electrophilic fatty acid nitroalkenes in triacylglycerides. *Free Radic. Biol. Med.* **87**, 113–124 (2015).
  67. Melo, T. *et al.* Recent Advances on Mass Spectrometry Analysis of Nitrated Phospholipids. *Anal. Chem.* **88**, 2622–2629 (2016).
  68. Salvatore, S. R. *et al.* Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J. Lipid Res.* **54**, 1998–2009 (2013).
  69. Bonacci, G. *et al.* Gas-phase fragmentation analysis of nitro-fatty acids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1534–1551 (2011).
  70. Chung, B. B. H. *et al.* Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* **128**, (1986).
  71. Batthyány, C. *et al.* Direct evidence for apo B-100-mediated copper reduction:

- studies with purified apo B-100 and detection of tryptophanyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 335–340 (2000).
72. Byun, J., Mueller, D. M., Fabjan, J. S. & Heinecke, J. W. Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett.* **455**, 243–246 (1999).
  73. Trostchansky, A. *et al.* Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**, 225–232 (2001).
  74. Sparks, D. L. & Phillips, M. C. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. **33**, 123–130 (1992).
  75. Botti, H. *et al.* Peroxynitrite-mediated alpha-tocopherol oxidation in low-density lipoprotein: A mechanistic approach. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 152–162 (2004).
  76. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. & Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* **329**, 23–38 (2003).
  77. Ferreira, A. M., Trostchansky, A., Ferrari, M., Souza, J. M. & Rubbo, H. Nitroalkenes: synthesis, characterization, and effects on macrophage activation. *Methods Enzymol.* **441**, 33–51 (2008).
  78. Delmastro-Greenwood, M. *et al.* Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 333–341 (2015).
  79. Zhang, R. *et al.* Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem.* **277**, 46116–46122 (2002).
  80. Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M. & Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *J. Chromatogr. A* **1218**, 2754–2774 (2011).
  81. Schopfer, F. J. *et al.* Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1250–1259 (2009).
  82. Higashi, T., Takekawa, M., Min, J. Z. & Toyo'oka, T. Diels–Alder derivatization for sensitive detection and characterization of conjugated linoleic acids using LC/ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 495–502 (2012).
  83. Hawkins, C. L., Morgan, P. E. & Davies, M. J. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 965–988 (2009).
  84. Möller, M. *et al.* Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **280**, 8850–8854 (2005).
  85. Möller, M. *et al.* Membrane 'lens' effect: Focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the •NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 709–714

- (2007).
86. Hamilton, R. T. *et al.* LDL protein nitration: Implication for LDL protein unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* **4**, 1–14 (2008).
  87. Zheng, L. *et al.* Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and function impairment in subjects with cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* **114**, 529–541 (2004).
  88. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945 (2010).
  89. Wright, M. M. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrooleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4299–304 (2006).
  90. Khoo, N. K. H. *et al.* Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 230–239 (2010).
  91. Kansanen, E. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids activate Nrf2 by a Keap1 cysteine 151-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 14019–14027 (2011).
  92. Rudnicki, M. *et al.* Hypoxia inducible factor-dependent regulation of angiogenesis by nitro-fatty acids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1360–1367 (2011).
  93. Villacorta, L. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **98**, 116–124 (2013).
  94. Cui, T. *et al.* Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–35698 (2006).
  95. Kansanen, E. *et al.* Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J. Biol. Chem.* **284**, 33233–33241 (2009).
  96. Bonilla, L., O'Donnell, V. B., Clark, S. R., Rubbo, H. & Trostchansky, A. Regulation of protein kinase C by nitroarachidonic acid: Impact on human platelet activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **533**, 55–61 (2013).
  97. Trostchansky, A. *et al.* Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **286**, 12891–12900 (2011).
  98. Harisa, G. I. & Alanazi, F. K. Low density lipoprotein bionanoparticles: From cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs. *Saudi Pharm. J.* **22**, 504–515 (2014).
  99. Tauchi, Y. *et al.* Inhibitory effect of dexamethasone palmitate-low density lipoprotein complex on low density lipoprotein-induced macrophage foam cell

- formation. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 466–471 (2000).
100. Tauchi, Y. *et al.* Effect of dexamethasone palmitate-low density lipoprotein complex on cholesterol ester accumulation in aorta of atherogenic model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 925–9 (2001).
  101. Nicolas, J. M., Pirson, P., Leclef, B. & Trouet, A. Acetylated low-density lipoprotein as a vehicle for anti-infectious drugs: preparation and antileishmanial activity of Ac-LDL containing ketoconazole oleate. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **84**, 325–336 (1990).