



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

Universidad de la República  
Facultad de Ciencias



FACULTAD DE  
CIENCIAS

Nitroalquenos de síntesis como  
potenciales agentes antioxidantes  
Evaluación bioquímica y en cultivo celular

Tesis de Licenciatura en Bioquímica

Claudio Carabio Costa

Tutoras: Laura Celano  
Leonor Thomson

Diciembre 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar les quiero agradecer a mis tutoras Laura y Leo, por sus enseñanzas, buena disposición, por permitirme y ayudarme en la realización de esta tesina y por integrarme al laboratorio.

También quiero agradecer a todos mis amig@s y compañer@s de carrera y del laboratorio (Alejandro, Floto, Gabi, Wilson, Ernest, Flora, Lia, Lucia, Flor S), por los momentos compartidos, por sus colaboraciones y por hacer del ambiente de trabajo un lugar agradable.

Quiero agradecerle de manera especial a Mari y a toda su familia, por la paciencia, cariño, ayuda y apoyo brindado principalmente en los momentos más difíciles.

Por último, quiero dar las gracias a toda mi familia (padres, herman@s, ti@s, prim@s y abuelo@s), por la confianza depositada en mí, la motivación y apoyo inquebrantable de todos los días.

## ABREVIATURAS

$\bullet\text{NO}_2$	Dióxido de nitrógeno
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxilo
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
4-HDA	4-hidroxi-alquenos
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
8-OHG	8-hidroxi-guanina
ABAP	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
ATP	Adenosintrifosfato
$\text{Cu}^+$	Ión cuproso
DAF-FM DA	4,5-diaminofluoresceína diacetato
DHR	1,2-dihidrorodamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
$e^-$	Electrón
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FAD	Flavínadenínucleótido
$\text{Fe}^{2+}$	Ión ferroso
FL	Fluoresceína
FMN	Flavinmononucleótido
GPx	Glutatión peroxidasa
GR	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
$\text{HO}_2\bullet$	Radical hidroperóxido
HOCl	Ácido hipocloroso
HONOO	Ácido Peroxinitroso

IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
INF- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPS	Lipopolisacárido
MDA	Malondialdehído
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrógeno
NADH	Nicotinamidaadenín-dinucleótido
NADPH	Nicotinamidaadenín-dinucleótido fosfato reducido
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
Nnos	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO <sup>-</sup>	Anión nitroxilo
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
NO <sup>+</sup>	Catión nitrosonio
NOS	Óxido nítrico sintasa
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical anión superóxido
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	Anión peróxido
ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PMA	Acetato de forbolmiristato
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator activity receptor $\gamma$
Prx	Peroxirredoxinas
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
ROO <sup>•</sup>	Radical peroxilo
SBF	Suero bovino fetal
SOD	Superóxido dismutasa
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromanocarboxílico
XO	Xantina Oxidasa

## RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno se producen en procesos metabólicos normales, como mecanismos de defensa y disparadores de mecanismos de señalización celular, siendo rápidamente inactivadas por los sistemas de defensa antioxidante del organismo. Sin embargo, un desbalance entre las especies prooxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras, genera un estado capaz de alterar la estructura y funcionalidad de las moléculas biológicas que se encuentra en la base etiopatogénica de diferentes enfermedades. En la búsqueda de agentes antioxidantes con potencial aplicación terapéutica, se estudiaron las propiedades antioxidantes de 14 nitroalquenos, centrándonos en la capacidad *in vitro* de atrapar radicales peroxilo y radicales derivados del peroxinitrito. Los compuestos más eficientes, el (Z)-N,N-dimetil-4-(2-nitrovinil)bencenamina (B1), (Z)-N,N-dimetil-4-(2-nitroprop-1-enil)bencenamina (B2), (Z)-5-(2-nitrovinil)benzo[d][1,3]dioxol (G1), y (Z)-5-(2-nitroprop-1-enil)benzo[d][1,3]dioxol (G2), fueron seleccionados para evaluarlos como atrapadores de las especies reactivas generadas por macrófagos activados. Macrófagos J774A.1 fueron activados para la producción de anión superóxido, óxido nítrico y ambos, en consecuencia peroxinitrito. La reactividad con óxido nítrico se estudió mediante la capacidad de inhibir la oxidación de la sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato. Los 4 nitroalquenos (10  $\mu$ M) protegieron a la sonda de la oxidación en más del 35 %. El compuesto B2 fue el más eficaz, con una protección del 74 %. Los compuestos fueron testeados (10 y 20  $\mu$ M) como atrapadores de anión superóxido mediante reducción de citocromo  $c^{3+}$  inhibible por SOD. En ambas concentraciones todos fueron capaces de inhibir la reducción del citocromo c, siendo el compuesto G2 el más efectivo (72 % a 20  $\mu$ M). La reactividad con peroxinitrito se evaluó como la capacidad de inhibir la oxidación de dihidrorodamina. Todos los compuestos fueron buenos atrapadores de radicales derivados del anión peroxinitrito, siendo B1 y B2 los más eficaces. Para descartar posibles efectos citotóxicos de los compuestos sobre los macrófagos, se utilizó la técnica de reducción de MTT. La viabilidad celular fue cercana al 90 % a las concentraciones y períodos ensayados, por lo que no presentan citotoxicidad importante. La presencia del motivo dimetilamino, dador de electrones, confiere en términos generales mayor eficiencia, siendo los compuestos B1 y B2 buenos candidatos para estudios posteriores.

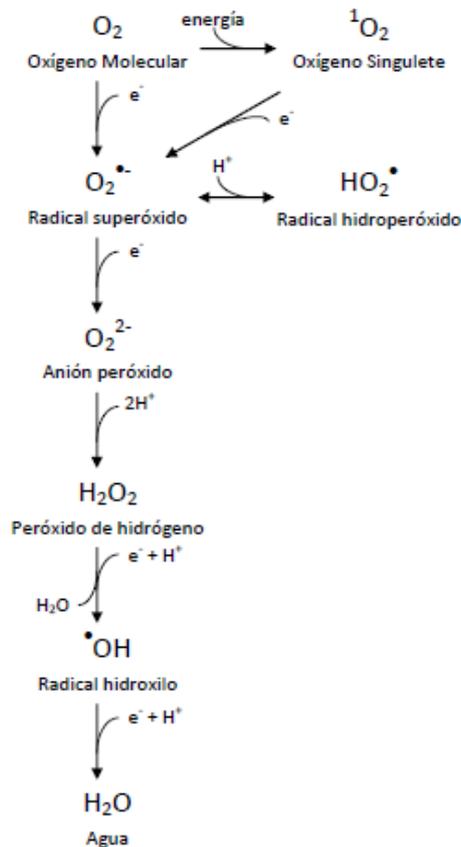
# CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Especies reactivas del oxígeno.....	1
1.2	Especies reactivas del nitrógeno.....	4
1.3	Origen de las especies reactivas en los seres vivos.....	6
1.4	Estrés y daño oxidativo .....	11
1.5	Antioxidantes.....	15
1.6	Nitroalquenos.....	21
1.7	Usos de antioxidantes en patologías .....	21
2.	OBJETIVOS .....	23
2.1	Objetivo General.....	23
2.2	Objetivos específicos .....	23
3.	MATERIALES y MÉTODOS .....	24
3.1	Nitroalquenos de síntesis .....	24
3.2	Ensayos bioquímicos.....	24
3.3	Ensayos en cultivo celular.....	26
3.4	Ensayo de viabilidad celular.....	28
3.5	Estadística.....	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
4.1	Nitroalquenos como antioxidantes.....	29
4.2	Reactividad frente a radicales derivados del peroxinitrito. ....	32
4.3	Ensayos en cultivo celular .....	34
5.	CONCLUSIONES .....	41
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Especies reactivas del oxígeno

En los organismos aerobios, la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) se da principalmente a partir del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Un átomo de oxígeno posee 16 electrones distribuidos en los orbitales moleculares, 10 enlazantes y 6 anti enlazantes. El oxígeno molecular es considerado un bi-radical ya que posee 2 electrones desapareados en dos orbitales antienlazantes, lo que le da carácter paramagnético a la molécula. Su reactividad, sin embargo, es inferior a la esperada ya que estos electrones presentan espines con direcciones paralelas [1].



**Figura 1.** Reducción del oxígeno molecular.

Las ERO pueden ser radicalares o no radicalares. Desde el punto de vista biológico las de mayor interés son el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), radical hidropéroxido ( $HO_2^{\bullet}$ ), radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Fig. 1).

Un radical libre es una especie química (átomo o molécula) capaz de existir en forma independiente que posee uno o varios electrones ( $e^-$ ) desapareados en su orbital más externo. Presenta una vida media muy corta, ya que es capaz de reaccionar con una gran diversidad de moléculas, captando o cediendo electrones para compensar su deficiencia electrónica. Esto puede generar un nuevo radical e iniciar reacciones en cadena que afectan la funcionalidad de las moléculas biológicas y por tanto de las células de las que forman parte. En concentraciones fisiológicas las especies reactivas en general y los radicales libres en particular actúan como mediadores y reguladores, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos [1-4].

Las especies reactivas pueden ser de origen endógeno o exógeno, y si bien en este trabajo nos centraremos en los derivados del oxígeno y del nitrógeno por su importancia en los sistemas biológicos, existen otros centrados en átomos como el azufre, carbono, cloro y bromo [1, 4].

### 1.1.1 Radical hidroxilo

El radical hidroxilo se forma cuando el  $O_2$  es reducido por  $3 e^-$  (Fig. 1). Es la especie derivada del oxígeno más reactiva, capaz de reaccionar directamente con casi cualquier molécula biológica [1, 5]. Posee una vida media muy corta ( $\sim 10^{-9}$  s) y su gran reactividad determina que difunda distancias muy cortas [1, 6]. Puede generarse *in vivo* a través de diferentes procesos. Por ejemplo, a partir de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet -}$  mediante las reacciones de Fenton (Ec. 2) y Haber-Weiss (Ec. 1 y 2) [1, 7].



Aunque la velocidad de estas reacciones es demasiado baja para ser de importancia fisiológica, los iones de metales de transición como ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y cuproso ( $Cu^+$ ), pueden actuar como catalizadores [1]. El radical hidroxilo también puede generarse por descomposición del anión peroxinitrito, por la ruptura homolítica de moléculas de agua como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ), o ruptura fotolítica del  $H_2O_2$ , ya que si bien la luz UV no tiene suficiente

energía para escindir una molécula de agua, puede dividir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 2 moléculas de  $\cdot\text{OH}$  [1].

### 1.1.2 Radical superóxido

El radical anión superóxido se genera a partir de la reducción monovalente del  $\text{O}_2$  [1, 5] (Fig. 1) y son muy variados los sistemas enzimáticos y no enzimáticos en los que se produce. La mayor producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  de las células no fagocíticas ocurre en la cadena respiratoria mitocondrial, donde 0.1-0.2 % del oxígeno consumido es parcialmente reducido a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y la NADPH deshidrogenasa. También se forma  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durante el estallido respiratorio de las células fagocíticas y como producto de reacciones enzimáticas de deshidrogenasas flavoproteínicas, oxidasas e hidroxilasas. Otra posible fuente de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  son las reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína o la riboflavina [1, 2, 8, 9, 10].

En comparación con otras ERO, es una especie poco reactiva pero potencialmente tóxica, ya que es la principal fuente de formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , precursor del  $\cdot\text{OH}$  [1, 11, 12]. El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  también puede reaccionar con  $\cdot\text{NO}$  y formar el anión peroxinitrito [1, 12]. La eliminación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en la célula, se realiza por los diferentes tipos de superóxido dismutasa (SOD), que catalizan su conversión a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El  $\text{HO}_2^{\cdot}$  se genera por la protonación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (pKa 4.7) (Fig. 1). Es un oxidante mucho más potente y liposoluble que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , resultando un potente iniciador de la peroxidación lipídica en membranas biológicas [13].

### 1.1.3 Radical peroxilo

La producción del radical peroxilo en los sistemas biológicos se da principalmente durante el proceso de peroxidación lipídica [1]. Son parte fundamental del mismo ya que son capaces de iniciar y propagar la reacción. El  $\text{ROO}^{\cdot}$  en comparación con el  $\cdot\text{OH}$  presenta una reactividad menor, aunque superior a la del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , siendo su vida media del orden de 1 s [1, 14].

### 1.1.4 Peróxido de hidrógeno

Cuando el  $\text{O}_2$  gana 2  $e^-$  se produce el anión peróxido ( $\text{O}_2^{2-}$ ), cuya forma protonada es el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 1) [5]. Se puede originar a partir de diversas fuentes:

reducción directa de  $O_2$  por  $2 e^-$  [11]; por dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  a través de la SOD; como producto de reacción de enzimas como la glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa, uricasa, y por reacciones químicas de autooxidación [1, 14]. El  $H_2O_2$  presenta una reactividad inferior a la del  $\bullet OH$  pero más específica y participa en numerosas reacciones que generan radicales libres. Por ejemplo, mediante la reacción de Haber-Weiss ya mencionada, el  $H_2O_2$  se puede convertir en  $\bullet OH$ , [1, 7]. Además su facilidad para atravesar membranas biológicas le permite reaccionar en puntos de la célula alejados del sitio de producción. Fisiológicamente el  $H_2O_2$  se remueve por acción de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), catalasa y peroxirredoxinas (Prx) [1, 15].

### 1.1.5 Oxígeno singulete

El oxígeno singulete se origina cuando uno de los  $2 e^-$  desapareadas del  $O_2$  es excitado y cambia de giro e inmediatamente se aparea con el otro electrón libre (Fig. 1). Puede formarse *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de  $O_2$ , o en el transcurso de diferentes reacciones enzimáticas. El  $^1O_2$  es una forma excitada del oxígeno que reacciona fácilmente con otras moléculas, transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Su vida media es de  $10^{-6}$  s, genera daños en el ADN, en membranas celulares y causa modificaciones en los aminoácidos [1, 16].

## 1.2 Especies reactivas del nitrógeno

Además de las ERO mencionadas anteriormente, existen especies reactivas del nitrógeno (ERN). Pueden ser radicalares o no radicalares, siendo las de mayor interés desde el punto de vista biológico el óxido nítrico ( $\bullet NO$ ), el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el dióxido de nitrógeno ( $\bullet NO_2$ ), el catión nitrosonio ( $NO^+$ ) y el anión nitroxilo ( $NO^-$ ).

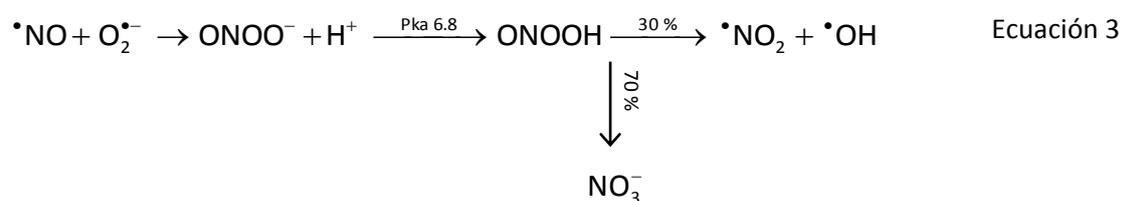
### 1.2.1 Óxido nítrico

El  $\bullet NO$  es considerado uno de los radicales más importantes del nitrógeno y se genera en numerosos tipos celulares por la acción de distintas isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que veremos más adelante. Es una molécula sin carga, de bajo peso molecular, capaz de moverse libremente a través de la bicapa lipídica y por el citoplasma de las células, siendo su vida media de 1 a 5 s [17, 18]. El  $\bullet NO$  participa en numerosos procesos fisiológicos, actuando como regulador del flujo sanguíneo local,

como inhibidor de la agregación y adhesión plaquetaria, como neuromodulador y contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria cuando es generado por macrófagos activados [19]. También puede reaccionar con el grupo hemo de proteínas intracelulares inactivándolas; o con ácidos nucleicos, dando lugar a mutaciones y roturas del ADN. El  $\bullet\text{NO}$  presenta un doble efecto antiinflamatorio y proinflamatorio a la vez [19, 20, 21]. Se piensa que los efectos reguladores antiinflamatorios del  $\bullet\text{NO}$  ocurren a concentraciones bajas, mientras que los efectos adversos se producen a concentraciones altas en situaciones de inflamación [22]. Su citotoxicidad se debe principalmente a los metabolitos derivados de él, especialmente cuando reacciona con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para dar lugar al  $\text{ONOO}^-$ , un potente oxidante [1, 12, 19].

### 1.2.2 Peroxinitrito

El  $\text{ONOO}^-$  se produce *in vivo* principalmente a partir de una reacción muy rápida entre el  $\bullet\text{NO}$  y el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Ec.3), cuya constante cinética es entre  $4\text{-}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [19, 23]. No es un radical libre pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse, formando ácido peroxinitroso ( $\text{HONOO}$ ,  $\text{pKa} = 6.8$ ). Éste se descompone rápidamente (vida media =  $0.9 \text{ s}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{pH } 7.4$ ) en un 30 % por homólisis en los radicales  $\bullet\text{NO}_2$  y  $\bullet\text{OH}$ , mientras que el resto isomeriza a ión nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Ec.3) [19, 24].



El  $\text{ONOO}^-$  es un oxidante muy potente y puede reaccionar con un amplio número de moléculas. Es capaz de inducir la peroxidación lipídica, oxidar grupos tiol, nitrar residuos de tirosina, nitrar y oxidar guanosina, reaccionar con centros metálicos de proteínas, degradar carbohidratos, fragmentar el ADN y estimular diferentes procesos proinflamatorios. Las características antes mencionadas sugieren que el  $\text{ONOO}^-$  es una especie con efectos perjudiciales para la célula, dada su capacidad para inducir modificaciones en todos los niveles [19, 24, 25].

### 1.2.3 Otras especies reactivas del nitrógeno

El  $\bullet\text{NO}_2$  es un radical libre producido principalmente a partir de la oxidación del  $\bullet\text{NO}$  atmosférico o por descomposición del  $\text{ONOO}^-$ . Es un agente nitrante moderado, que interviene en la nitración de tirosinas y además es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica [6, 19, 26].

El anión nitroxilo se genera a partir de enzimas o metaloproteínas que contienen metales de transición coordinados en sus sitios activos, o ciertos oxidantes biológicos, los cuales pueden catalizar la reducción de  $\bullet\text{NO}$  a  $\text{NO}^-$ , como por ejemplo la SOD [27], el citocromo c [28], o la xantina oxidasa [29, 30].

El catión nitrosonio es la forma oxidada del  $\bullet\text{NO}$  y es la especie clave en el proceso de nitrosación, en el cual el  $\text{NO}^+$  es transferido a un centro nucleofílico, normalmente de azufre o nitrógeno [31].

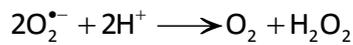
## 1.3 Origen de las especies reactivas en los seres vivos

### 1.3.1 Fuentes endógenas

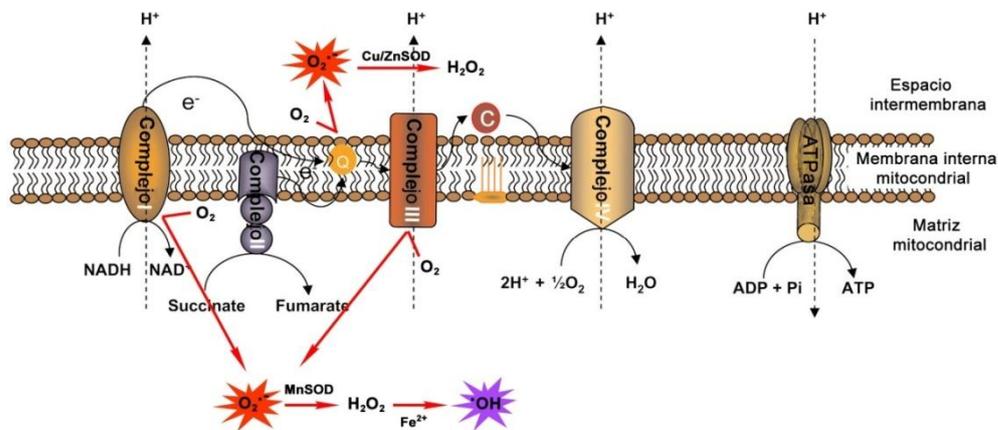
#### 1.3.1.1 Mitocondria

Los organismos aerobios consumen a nivel de la mitocondria entre 80 % y 95 % del  $\text{O}_2$  inspirado, siendo ésta la principal fuente de especies reactivas en la mayoría de las células [32]. Este fenómeno ocurre durante el transporte de electrones que genera un gradiente de protones que aporta la energía necesaria para formar adenosina trifosfato (ATP). La cadena de transporte electrónico está formada por complejos situados en la membrana interna mitocondrial, que se denominan del I al IV (Fig. 2). El complejo IV es capaz de mantener unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno, hasta que se complete la transferencia de 4  $e^-$  y 4 protones al  $\text{O}_2$  para formar dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , por lo que no genera especies reactivas. Sin embargo, las semiquinonas que se generan en los complejos I (NADH-coenzima Q reductasa) y III (citocromo c reductasa) tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al  $\text{O}_2$  generando  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que no siempre son capaces de retener y proporcionan una fuente constante de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (0.1-0.2 % del  $\text{O}_2$  consumido) [9, 19, 33, 34]. El  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismuta, espontáneamente ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) o en una reacción

catalizada por la SOD ( $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [19, 35], a peróxido de hidrógeno (Ec. 4), el cual es capaz de atravesar membranas y acceder al citoplasma, atacando directamente blancos moleculares o a través de la reacción con metales de transición, como en la reacción de Fenton (Ec. 2), formando radical hidroxilo [10, 19, 33, 34].



Ecuación 4

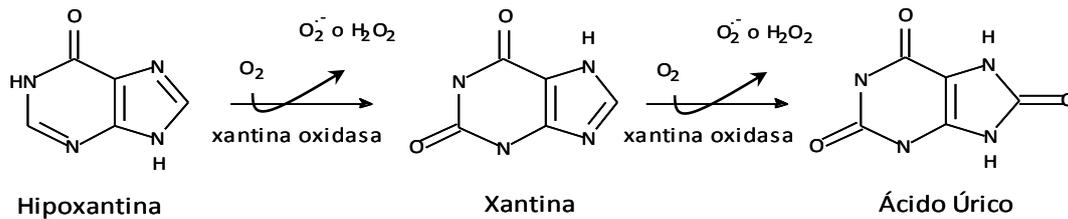


**Figura 2.** Formación de especies reactivas en la cadena de transporte de electrones (Imagen adaptada de Bayir H. y col. [35]).

### 1.3.1.2 Xantina oxidasa

La xantina óxidoreductasa es un enzima que se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos (desde las bacterias hasta el hombre). Se localiza principalmente en hepatocitos, células de Kupffer, enterocitos del yeyuno, macrófagos, mastocitos y riñón. Dentro de la célula se ubica en citosol y superficie externa de la membrana celular y cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos. Es sintetizada como xantina deshidrogenasa (XD, EC 1.1.1.204) y se mantiene mayoritariamente como tal en la célula. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, isquemia, y otras situaciones de déficit energético, puede convertirse rápidamente en la forma oxidasa (XO, EC 1.1.3.22), mediante la oxidación reversible de grupos sulfhidrilos, o mediante un proceso proteolítico irreversible catalizado por proteasas. Su principal función como oxidasa a nivel fisiológico, es la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico. Utiliza  $\text{O}_2$  como aceptor de electrones y genera como productos ácido úrico,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet -}$  (Fig.

3). Durante un periodo isquémico los niveles celulares de ATP disminuyen, tanto por el descenso en su producción como por su rápida desfosforilación a ADP. Éste es degradado vía adenosina e inosina, acumulándose hipoxantina. La depleción de ATP produce una desregulación de los canales ATP-dependientes y un aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular que activa proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  responsables de la conversión de la xantina deshidrogenasa a oxidasa. Durante la reperfusión y debido a la acumulación de hipoxantina y xantina oxidasa en los tejidos isquémicos, se inicia una cascada de reacciones, cuyo resultado es un gran aumento en la formación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  [36-38].

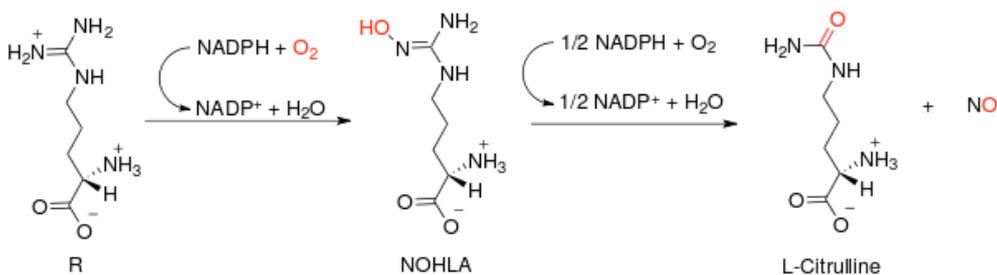


**Figura 3.** Formación de especies reactivas como subproductos de la degradación de purinas, catalizada por xantina oxidasa.

### 1.3.1.3 Óxido nítrico sintasa

La enzima óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39) cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina (Fig. 4), dando como producto óxido nítrico en numerosos tipos celulares. Existen 3 isoformas de NOS, producto de 3 genes distintos: tipo I o neuronal (nNOS), tipo II o inducible (iNOS) y tipo III o endotelial (eNOS). Las tipos I y III son constitutivas y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio, mientras que la tipo II es independiente del calcio y su expresión está regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. En esta regulación participan factores de transcripción sensibles al estado redox como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) o las quinasas activadas por mitógenos (MAPk). Por ejemplo, la iNOS se expresa en macrófagos cuando éstos son estimulados por citoquinas, lipopolisacáridos u otros antígenos [39, 40, 41]. Todas son homodímeros y presentan un dominio con actividad reductasa en el extremo carboxilo, donde se localizan los sitios de unión a los cofactores flavin mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD) y nicotinamida adenindinucleotido fosfato reducido (NADPH). Además poseen un

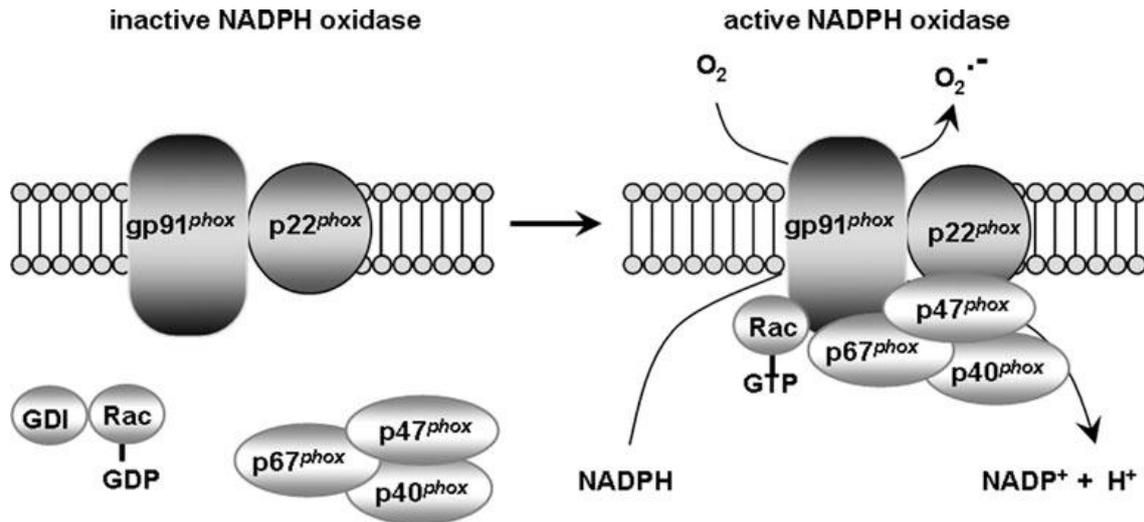
dominio con actividad oxigenasa en el extremo amino, donde se localiza un grupo hemo, un sitio de unión a tetrahidrobiopterina y uno a L-arginina [42]. Ambos dominios se hallan separados por un sitio de unión para la calmodulina. Las flavinas FAD y FMN son las responsables del transporte de electrones desde el cofactor NADPH hacia el grupo hemo, para la síntesis de  $\bullet\text{NO}$ . La transferencia de electrones requiere la fijación de calmodulina a la NOS. En ciertas condiciones, los electrones transportados entre ambos dominios son desviados hacia el  $\text{O}_2$ , en lugar de hacia la L-arginina generando  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , fenómeno conocido como desacoplamiento de la NOS [42].



**Figura 4. Reacción catalizada por la NOS.** Se muestra la formación del intermediario  $N^{\omega}$ -hidroxi-L-arginine (NOHLA). Imagen extraída de Liu, Q. y col. [43].

#### 1.3.1.4 NAD(P)H oxidasa

La NAD(P)H oxidasa (EC 1.6.3.1) es una enzima asociada a la membrana plasmática, que utiliza el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o NADPH como fuente de electrones y  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones, dando como producto  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Fig. 5) [44]. Existen diversos tipos de NAD(P)H oxidasa, siendo la mejor caracterizada la que está presente en los fagocitos activados donde, junto a la mieloperoxidasa, juega un papel fundamental en la actividad bactericida a través de la producción de especies reactivas. Al encontrarse con un agente infeccioso, los fagocitos experimentan un “estallido respiratorio” o incremento en el consumo de  $\text{O}_2$ . Éste es transformado en  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y puede dismutar por acción de la SOD a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , precursor de  $\bullet\text{OH}$  [32, 44].



**Figura 5. Ensamblaje del complejo NADPH oxidasa.** Cuando la NADPH oxidasa está inactiva, las subunidades gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> se encuentran unidas a la membrana, mientras que las subunidades p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y Rac están en el citosol. Durante la activación de los fagocitos ocurre la migración de los componentes citoplasmáticos de la enzima hacia la membrana plasmática, generando la activación de la enzima. Imagen extraída de Massaad C.A. y col. [45].

### 1.3.1.5 Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO, EC 1.11.2.2) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, producida fundamentalmente por neutrófilos y monocitos. La MPO, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) forma ácido hipocloroso (HOCl) (Ec. 5). El ácido hipocloroso es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos. Sin embargo, esta función defensiva también tiene su contrapartida, ya que estos radicales pueden atacar y dañar los tejidos sanos vecinos, hecho que se ha relacionado en la etiopatogenia de algunas enfermedades [46, 47].

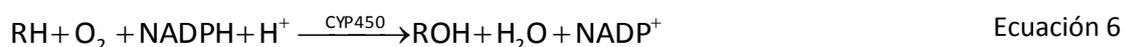


En los leucocitos a partir del ácido hipocloroso se forman una serie de productos como cloro, cloraminas, radical hidroxilo y oxígeno singulete con potente acción microbicida [46, 47].

### 1.3.1.6 Citocromos P<sub>450</sub>

Los citocromos P<sub>450</sub> son una familia de hemoproteínas ampliamente distribuida en los seres vivos, cuya función es metabolizar moléculas exógenas y endógenas para

favorecer su eliminación [5, 10, 32]. En el hombre, están presentes en todo el organismo, pero principalmente en retículo endoplásmico y mitocondrias de células hepáticas e intestinales. Salvo excepciones, los citocromo P<sub>450</sub> catalizan reacciones en las que utiliza O<sub>2</sub> y NADPH para oxidar al sustrato (Ec. 6).



Un átomo de oxígeno es incorporado al sustrato (RH), mientras que el otro es reducido a H<sub>2</sub>O, por lo que se denominan monooxigenasas u oxidasas de función mixta. El NADPH aporta los electrones requeridos por el citocromo P<sub>450</sub>, a través del complejo llamado NADPH-citocromo P<sub>450</sub> reductasa, pero en ocasiones son cedidos por el NADH mediante el complejo NADH-citocromo b<sub>5</sub> reductasa. El producto de reacción es una molécula hidroxilada (ROH) más hidrosoluble que favorece su eliminación por orina y bilis. Las especies reactivas en este sistema se producen por autooxidación de la NADPH-citocromo P<sub>450</sub> reductasa o por desacoplamiento del ciclo catalítico del citocromo P<sub>450</sub>, provocando un desvío del flujo de electrones hacia el O<sub>2</sub> para producir O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sin formación de metabolitos oxidados [32, 48, 49].

### 1.3.2 Fuentes exógenas

Las fuentes exógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno son algunos agentes antineoplásicos y antibióticos que poseen la capacidad de reducir el oxígeno a anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. También lo son, las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones) y los factores ambientales, como pesticidas, humo de cigarro, solventes e hidrocarburos aromáticos, entre otros. Estos agentes, poseen radicales libres o se convierten en ellos durante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación a nivel hepático [50, 51].

### 1.4 Estrés y daño oxidativo

El estrés oxidativo es una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, dando lugar a una alteración de la señalización redox y el control y/o daño molecular [52]. Dicho desbalance puede

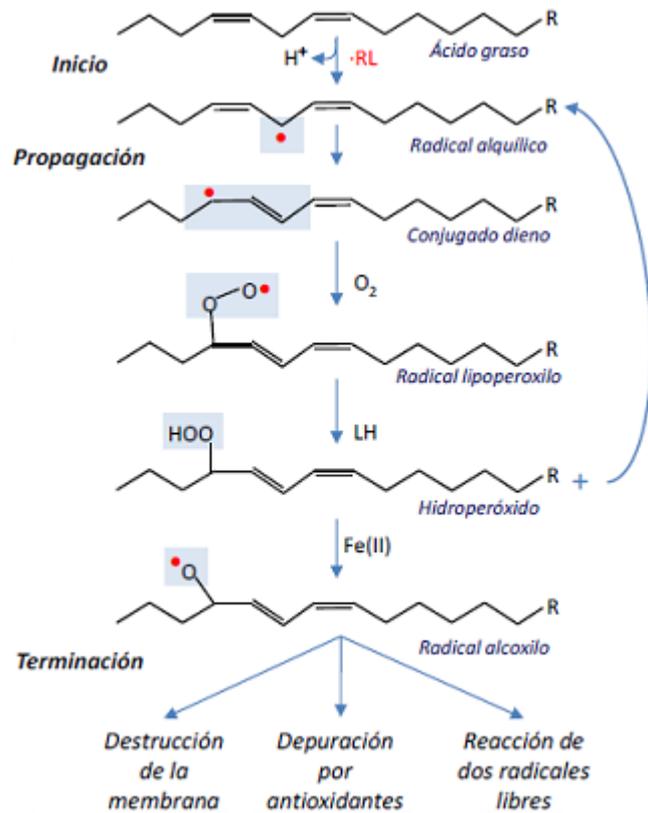
originarse por exceso de sustancias prooxidantes, por deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos. El daño oxidativo producido por las especies reactivas puede afectar lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN. Produce lesiones celulares estructurales y/o funcionales relacionadas con la patogenia de diversas enfermedades en el ser humano, como artritis reumatoidea, cáncer, diabetes, Parkinson, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, entre otras [53-56]. Las consecuencias patológicas dependen del tipo de constituyente celular que se vea más dañado.

#### **1.4.1 Daño oxidativo en lípidos**

Los lípidos, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), son las biomoléculas más susceptibles al ataque por especies reactivas. Esto resulta relevante debido a que todas las células se encuentran rodeadas por una membrana celular, cuya estructura básica es una bicapa lipídica que funciona como barrera con permeabilidad selectiva y además contiene enzimas, canales, receptores y antígenos que juegan un rol vital en la interacción de la célula con otras células, hormonas y otros agentes reguladores que se encuentran en el líquido extracelular. A éste tipo de lesión oxidativa se le denomina peroxidación lipídica o lipoperoxidación [57].

La lipoperoxidación se desarrolla en tres pasos denominados iniciación, propagación y terminación (Fig. 6). Comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, extrayendo un átomo de hidrógeno. Los PUFAs presentes en la membrana plasmática son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, porque contienen carbonos contiguos a dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. A su vez, los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace del acilo, formando dienos conjugados. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el  $O_2$  y forma un radical peroxilo lipídico ( $ROO^\bullet$ ). El nuevo  $ROO^\bullet$  formado es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar un hidroperóxido ( $ROOH$ ) y un nuevo radical lipídico ( $R^\bullet$ ), éste se combina con otra molécula de oxígeno, estableciéndose así la propagación del daño oxidativo. La propagación sólo termina cuando se agotan los sustratos ( $O_2$  o PUFAs), cuando los radicales lipídicos reaccionan entre sí o cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes. Los

productos finales del proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, destacándose el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA) [13, 57].



**Figura 6.** Proceso de lipoperoxidación iniciada por el radical libre  $\cdot RL$  (Adaptado de Henkel R. y col. [58]).

### 1.4.2 Daño oxidativo en proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas son susceptibles de ser oxidados, pero presentan mayor predisposición los aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina, además de la histidina, la cisteína y la metionina. Su alteración puede producir cambios estructurales y conformacionales, provocando entrecruzamientos, fenómenos de agregación y modificación o pérdida de la función proteica. Los enlaces peptídicos también pueden ser blanco de los radicales libres produciendo fragmentación de la proteína por ruptura de estos enlaces. Por otro lado, los radicales pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas, por ejemplo, el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical  $O_2^{\cdot-}$  o el

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar metahemoglobina. Como consecuencia del daño oxidativo, puede aparecer acumulación intracelular de proteínas oxidadas, pérdida de actividad enzimática y alteraciones de funciones celulares como la producción de energía. A nivel de la membrana plasmática se puede ver afectada la estructura de transportadores, canales proteicos, receptores o proteínas reguladoras [15, 59].

### **1.4.3 Daño oxidativo en ácidos nucleicos**

Tanto el ADN como el ARN pueden sufrir modificaciones químicas en las bases nitrogenadas y/o los azúcares al reaccionar con especies reactivas, especialmente con el  $\bullet$ OH. Cuando es afectada una desoxirribosa se produce una ruptura en una de las hebras. Sin embargo, la hebra complementaria intacta puede mantener juntos los dos extremos de la hebra dañada, hasta su reparación mediante enzimas. Este tipo de daño no es crítico para la célula, a menos que produzca una rotura cercana en las dos cadenas. La oxidación de las bases del ADN es la consecuencia más común de su reacción con especies reactivas y da lugar a una gran variedad de productos derivados. La oxidación de la desoxiguanosina a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) es la modificación más frecuente y es reparada por una glicosilasa o una endonucleasa, eliminando la base nitrogenada 8-hidroxiguanina (8-OHG) o el nucleósido (8-OHdG), respectivamente. La base y/o el nucleósido es excretado por la orina y se utilizan como indicador de daño oxidativo del ADN *in vivo*. Este tipo de alteraciones reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico [60].

El ADN mitocondrial generalmente presenta mayor daño oxidativo que el nuclear. El genoma mitocondrial posee características que lo hacen más susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN; el sistema de reparación es poco efectivo y se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, que como se mencionó anteriormente es uno de los sistemas principales de producción de ERO. Además, el ADN mitocondrial no posee intrones y entonces la modificación de cualquier base afecta una zona de ADN codificante, por lo tanto su repercusión es siempre importante [10, 61].

El daño oxidativo asociado a proteínas y ADN no debe considerarse de manera independiente, ya que la acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar el daño oxidativo en el ADN, potenciando su efecto.

#### **1.4.4 Daño oxidativo a carbohidratos**

Los monosacáridos glucosa, manosa y manitol actúan como agentes protectores de las células capturando los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2\cdot^-$ . El daño oxidativo a los glúcidos adquiere relevancia cuando se trata de polisacáridos con función estructural, ya que éstos pueden ser despolimerizados. Por ejemplo, el ácido hialurónico, cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial, en presencia de especies reactivas se fragmenta, provocando la desestabilización del tejido conectivo y la pérdida de viscosidad del fluido, como ocurre en la artritis reumatoidea [62, 63].

### **1.5 Antioxidantes**

El  $\text{O}_2$  es vital para la existencia de los seres vivos que lo utilizan para generar energía, pero es inherentemente tóxico dada su capacidad de formación de especies reactivas. Para sobrevivir, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante, diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres [1, 15, 64].

Los antioxidantes son sustancias endógenas o exógenas al organismo, que en bajas concentraciones con respecto a un sustrato oxidable (biomoléculas), son capaces de disminuir o prevenir su oxidación. En términos bioquímicos, un antioxidante es un dador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción y tiene diferentes modos de acción. Pueden actuar previniendo la formación de especies reactivas o interceptando el ataque de las mismas, secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de radicales libres, facilitando la reparación del daño causado por radicales libres o manteniendo un ambiente favorable para que actúen otros antioxidantes [65, 66].

Los antioxidantes han sido clasificados de diferentes maneras. Desde un punto de vista bioquímico se clasifican como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

### 1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

#### 1.5.1.1 Superóxido dismutasa

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuidas en los seres vivos. La enzima superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) cataliza la reacción que transforma el  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$ , con una constante de reacción del orden de  $10^9 M^{-1}s^{-1}$  (Ec. 7). Es una de las primeras líneas de defensa al daño oxidativo, que puede causar tanto el  $O_2^{\bullet-}$ , como las especies reactivas derivadas de él [12, 33, 34].



Se han identificado varias isoenzimas de la SOD. Las más relevantes en seres humanos, de acuerdo al ion metálico que actúa como su cofactor y su ubicación celular son Cu/Zn-SOD citosólica, Cu/Zn-SOD extracelular y Mn-SOD mitocondrial. Las distintas SOD son productos de diferentes genes, aunque catalizan la misma reacción [12]. La Cu/Zn-SOD citosólica está formada por dos subunidades y cada una contiene un centro activo constituido por iones de cobre (II) y zinc (II). Se transcribe a partir del ADN nuclear, se expresa constitutivamente y su actividad es relativamente independiente del pH. La Cu/Zn-SOD extracelular es una glicoproteína hidrofóbica de aproximadamente 135 KDa, que contiene un átomo de Cobre (II) y otro de zinc (II) en cada subunidad y se ubica fundamentalmente unida a la matriz extracelular [12, 33]. Se encuentra en forma de homotetrámero, aunque ocasionalmente se ha encontrado en forma de dímero. Su función es evitar el daño causado por el  $O_2^{\bullet-}$  liberado desde neutrófilos y macrófagos al ejercer su función [11, 12]. La Mn-SOD mitocondrial es un homotetrámero con un átomo de manganeso en su sitio activo y se expresa en la mayoría de los tipos celulares. Su presencia en la matriz mitocondria es de gran importancia, puesto que como se ha mencionado anteriormente, la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de especies

reactivas en las células. La acción de la SOD sin embargo debe ser complementada con sistemas que eliminen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [12].

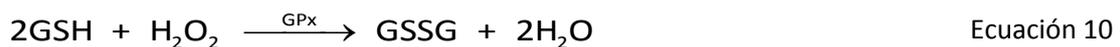
### 1.5.1.2 Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) se encuentra ampliamente distribuida en organismos pluricelulares y se localiza fundamentalmente en peroxisomas, aunque también en mitocondrias de algunos órganos. También se encuentra en hongos y algunos microorganismos aerobios. Esta enzima tienen un peso molecular de entre 210-280 kDa y es una metaloproteína tetramérica con subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Posee dos actividades enzimáticas; la actividad catalasa (Ec. 8) que cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar agua y oxígeno; y la actividad peroxidasa (Ec. 9), que cataliza la oxidación de dadores de protones como el metanol, etanol y fenoles, a expensas de peróxidos orgánicos. La actividad catalítica se desarrolla sobre todo cuando en el medio existen concentraciones elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [34, 67].



### 1.5.1.3 Glutati6n peroxidasa

La glutati6n peroxidasa (EC 1.11.1.9) cataliza tanto la reducci6n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua (Ec. 10), e hidroper6xidos orgánicos a alcohol (Ec. 11), utilizando el glutati6n reducido (GSH) como dador de electrones [68].



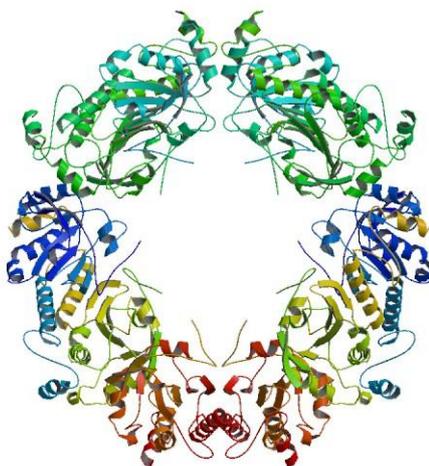
Existen al menos 7 tipos de GPx que se ubican en citosol, mitocondria y membrana celular, lo que las convierte en una barrera de protecci6n importante contra el daño oxidativo a nivel celular. Algunas son dependientes de selenio y otras no, todas las isoformas catalizan la oxidaci6n del glutati6n reducido a glutati6n oxidado (GSSG), que es nuevamente reducido por la enzima glutati6n reductasa (GR)

en presencia de NADPH (Ec. 12) impidiendo así que se agoten las reservas celulares de GSH. A diferencia de la catalasa que actúa en presencia de altas concentraciones de  $H_2O_2$ , la GPx actúa a bajas concentraciones [64, 68, 69].

#### 1.5.1.4 Peroxiredoxinas

Las peroxiredoxinas (EC 1.11.1.15) son enzimas antioxidantes dependientes de tioles, presentes en todos los organismos. En su mayoría se localizan en el citosol, aunque también existen en la mitocondria, asociadas al núcleo y a la membrana. Su función biológica es catalizar la reducción de  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$  y peróxidos orgánicos a expensas de glutatión o tiorredoxina. Todas las Prx poseen en la región amino terminal un residuo de cisteína conservado y esencial para la catálisis. También pueden contener otra cisteína adicional y por este motivo se clasifican en Prx 1-Cys y Prx 2-Cys (Fig. 7) [34, 70-73].

El ciclo catalítico, para la actividad peroxidasa en todas las Prx, puede simplificarse en 3 pasos: peroxidación, resolución y reciclado. La peroxidación se produce en el sitio activo completamente plegado, el cual contiene cuatro residuos conservados: la cisteína peroxidática, arginina, treonina y prolina. El anión tiolato ataca el peróxido, para generar agua (o alcohol) y ácido Cys-sulfénico en el sitio activo. La resolución ocurre cuando la cisteína resolutive ataca al ácido Cys-sulfénico, para liberar agua y formar un enlace disulfuro intercatenario. El ciclo catalítico se completa, cuando el enlace disulfuro es reciclado [73-75].

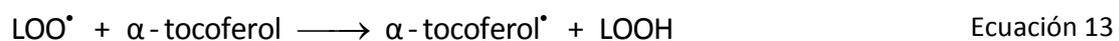


**Figura 7. Peroxiredoxina de 2 cisteínas típica.** Peroxiredoxina 4 humana, en su forma reducida. Imagen extraída de Wang, X. y col. [76].

## 1.5.2 Antioxidantes no enzimáticos

### 1.5.2.1 Vitamina E

Es la vitamina antioxidante liposoluble más ampliamente distribuida en la naturaleza. Bajo la denominación de vitamina E se incluye un conjunto de nutrientes liposolubles esenciales que tienen como estructura base el tocoferol o el tocotrienol. El más activo y frecuente es el  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 8), que puede reaccionar directamente con los radicales  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$  y  $\text{HO}_2\cdot$ . Por su naturaleza liposoluble se asocia a membranas ricas en lípidos, como la membrana mitocondrial, membrana plasmática y lipoproteínas plasmáticas. Su principal función es proteger las membranas biológicas del daño oxidativo, inhibiendo la fase de propagación en la lipoperoxidación mediante la formación del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo (Ec. 13) [77, 78].



El radical  $\alpha$ -tocoferoxilo se puede reducir dando lugar a la forma activa de la vitamina E, en reacciones con la vitamina C o con el GSH [77, 79].

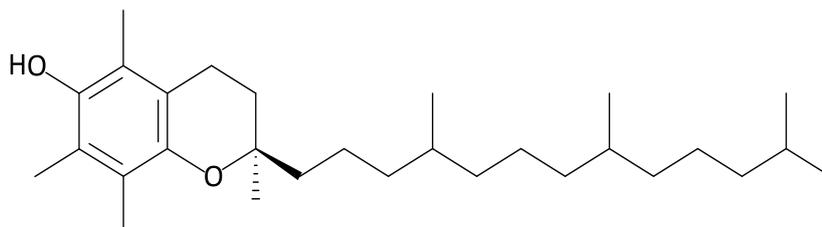
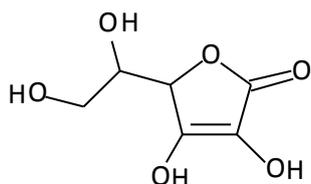


Figura 8.  $\alpha$ -tocoferol

### 1.5.2.2 Vitamina C

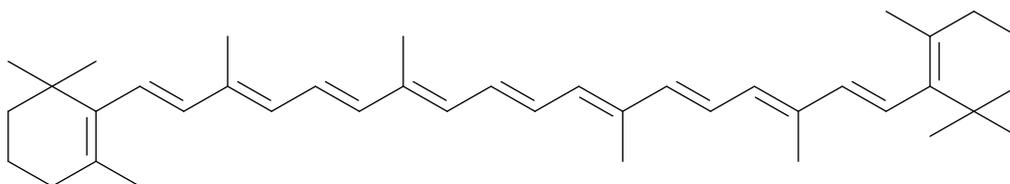
La vitamina C o ácido ascórbico (Fig. 9) es una molécula hidrosoluble que se encuentra intra y extracelularmente en la mayor parte de los sistemas biológicos. Se caracteriza por ceder con facilidad 2 e<sup>-</sup>, generando el ácido dehidroascórbico. Cuando la forma reducida de la vitamina C se encuentra a bajas concentraciones, puede reaccionar directamente las ERO y ERN, oxidándose a dehidroascorbato, que se recicla a ácido ascórbico por la enzima dehidroascorbato reductasa. También es capaz de evitar la lipoperoxidación, regenerando y aumentando la actividad de la vitamina E [77, 79, 80].



**Figura 9.** Vitamina C

### 1.5.2.3 Carotenoides

Los carotenoides son una familia de pigmentos aislados de frutas y verduras, casi todos poseen actividad antioxidante, pero el más frecuente e importante es el  $\beta$ -caroteno (Fig. 10). Las propiedades antioxidantes de los carotenoides residen en la estructura de largas cadenas con dobles enlaces conjugados. Estos pueden reaccionar con diversas ERO como el  $O_2^{\bullet-}$ , el  $^1O_2$  o los radicales peroxilo. Su naturaleza lipofílica y su localización en las membranas biológicas, hace que sean efectivos en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidores de reacciones de oxidación en cadena; complementando la acción de la vitamina E [79-81].

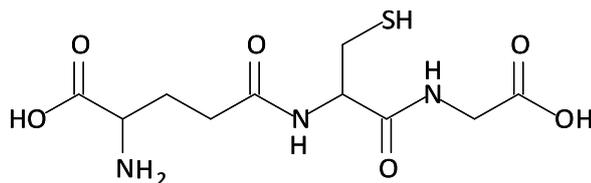


**Figura 10.**  $\beta$ -caroteno

### 1.5.2.4 Glutati3n

El glutati3n es un trip3ptido end3geno constituido por 3cido glut3mico, ciste3na y glicina. Seg3n su estado de 3xido-reducci3n, puede encontrarse como GSH (Fig. 11) o como GSSG. 3ste 3ltimo est3 compuesto por 2 mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las ciste3nas. Su estructura le otorga ciertas caracter3sticas que hacen que el GSH tenga una variada e importante funcionalidad en la c3lula. Una de ellas es la de proteger a la c3lula contra las ERO y ERN, pudiendo reaccionar directamente con 3stas sin necesidad de intervenci3n enzim3tica o mediante la glutati3n peroxidasa. En presencia de un oxidante, el GSH cede un prot3n y se oxida a GSSG por medio de la reacci3n catalizada por la glutati3n peroxidasa (Ec. 10 y 11). El GSSG formado es

inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima GR, que requiere NADPH como cofactor (Ec. 12). También participa de numerosas funciones como detoxificación de xenobióticos, transporte de Cys, biosíntesis de leucotrienos y prostaglandinas, mantenimiento de función y estructura de varias proteínas y regulación de la actividad enzimática y regeneración de otros antioxidantes, como el ascorbato. El glutatión entonces es capaz de potenciar la eficacia en la protección llevada a cabo por otros mecanismos endógenos [34, 77, 82-84].



**Figura 11.** Glutatión reducido o GSH.

## 1.6 Nitroalquenos

Recientemente se ha descrito un grupo de nitrolípidos derivados de diferentes ácidos grasos (nitrolinoleato, colesteryl nitrolinoleato, nitrooleato), que fueron caracterizados y cuantificados en plasma, eritrocitos y orina de personas normolipémicas e hipercolesterolémicas [85-87]. Estos ácidos grasos nitrados son electrófilos aceptores de Michael, que reaccionan con nucleófilos como el tiolato de cisteína, el anillo imidazol de la histidina y el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. Pueden además extraer electrones de manera reversible o irreversible [88]. Además, se cree que estos nitroalquenos poseen actividad antiinflamatoria. Por ejemplo, el nitrolinoleato y nitrooleato son capaces de unirse con gran afinidad al receptor nuclear PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activity receptor  $\gamma$ ), modulando de esta forma la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria [85, 89]. También se ha observado que algunos de ellos son capaces de inactivar el factor NF $\kappa$ B, modulando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias [90, 91].

## 1.7 Usos de antioxidantes en patologías

La participación de las ERO y ERN en patologías como artritis reumatoidea [53], diabetes, aterosclerosis [92], Parkinson [55] y Alzheimer está ampliamente documentada [56].

Existen evidencias de que el consumo de suplementos antioxidantes, principalmente vitamina C y vitamina E, es capaz de disminuir el riesgo de enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos [93, 94]. Por ejemplo, se ha demostrado que el consumo de vitamina C y vitamina E previene el deterioro de la función pulmonar y las patologías asociado a la contaminación ambiental como por ejemplo el asma [95]. También se ha visto que el uso de estas vitaminas en forma conjunta con selenio ayudan al tratamiento de pacientes con enfermedades cardíacas, y complicaciones cardiovasculares asociadas a la diabetes [96]. Se ha observado además que altos niveles sanguíneos de vitamina C previenen algunos tipos de cáncer (laringe, faringe, esófago, pulmón, estómago, colon y recto) [97, 98]. En estudios sobre la enfermedad de Alzheimer, donde se utilizaron suplementos antioxidantes conformado por vitaminas C y E, se observó una disminución del riesgo tanto de incidencia como de prevalencia. Estos resultados sin embargo no se verificaron cuando las personas consumieron por separado alguna de las vitaminas [99], por lo que existen resultados contradictorios respecto a la efectividad de la suplementación con antioxidantes exógenos [98, 100].

Considerando todos los aspectos presentados hasta aquí investigamos las propiedades antioxidantes de 14 nitroalquenos aromáticos sintéticos, sintetizados y proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal (Facultad de Ciencias) en condiciones *in vitro*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar una serie de nitroalquenos sintéticos como atrapadores de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar la capacidad *in vitro* de 14 nitroalquenos aromáticos sintéticos de atrapar radicales peroxilo y derivados de peroxinitrito.
- Evaluar en cultivo celular los nitroalquenos más prometedores de acuerdo a la capacidad de atrapar radicales peroxilo y derivados del peroxinitrito, utilizando macrófagos J774A.1 activados para la producción de especies reactivas.

## 3. MATERIALES y MÉTODOS

### 3.1 Nitroalquenos de síntesis

Los nitroalquenos utilizados en este trabajo fueron sintetizados y provistos por el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias. Para la síntesis de los compuestos 1-(2-nitro-1Z-etenil) benceno 4-sustituídos (A1 a G1), en términos generales el correspondiente benzaldehído sustituido se mezcló con nitrometano (2:1), *n*-butilamina (0.14 mL) y etanol (5.6 mL) y se calentó a reflujo durante 5 horas. El solvente fue destilado en vacío y el producto se filtró y lavó con hexano hasta obtener el correspondiente nitroalqueno. Para la síntesis de los compuestos 1-(2-nitro-1Z-propenil) benceno 4-sustituídos (compuestos A2 a G2), el correspondiente benzaldehído sustituido se mezcló, con nitroetano (2:1), *n*-butilamina (0.14 mL) y etanol (5.6 mL) y se calentó a reflujo durante 10 - 15 horas. El solvente fue destilado en vacío y el producto se filtró y lavó con hexano hasta obtener el correspondiente nitroalqueno [101].

### 3.2 Ensayos bioquímicos

#### 3.2.1 Atrapamiento de radicales peroxilo

Los nitroalquenos fueron probados como atrapadores de radicales peroxilo utilizando el método ORAC (del inglés: oxygen radical absorbance capacity). Esta técnica se basa en el decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína, en presencia de ROO<sup>•</sup> originados por la descomposición de un azocompuesto a 37 °C [102]. Como especie generadora de estos radicales se utilizó el 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP, 30 mM) preparado en el día y como sonda fluorescente la fluoresceína (FL, 7.5 nM). Todas las soluciones fueron preparadas en amortiguador fosfato de sodio 75 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM.

Se ensayaron diferentes concentraciones de nitroalquenos (1.5-13 μM) en placas negras para fluorescencia de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhaysen, Alemania), en cuyo diseño se incluyó siempre la curva de calibración y los controles correspondientes. Para realizar la curva de calibración, se utilizó el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromanocarboxílico (Trolox<sup>®</sup>, 1.5-24 μM) como antioxidante de

referencia. Como controles se incluyó el blanco (FL + ABAP) y controles de estabilidad de la FL en presencia de DMSO, en presencia de los nitroalquenos (13  $\mu\text{M}$ ) y en amortiguador.

La mezcla de reacción conteniendo el nitroalqueno o el Trolox<sup>®</sup>, FL y amortiguador fosfato, se equilibró a 37 °C durante 20 minutos, adicionándose luego el ABAP que da comienzo a la reacción. Los valores de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}}$  485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  512 nm), se registraron cada 2 minutos durante 140 minutos, utilizando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo, Vantaa, Finland).

Se calculó el área bajo la curva (ABC) de decaimiento fluorescente para cada compuesto, a las diferentes concentraciones de trabajo (Ec. 14) [102].

$$ABC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 \dots f_n/f_0 \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde  $f_0$  es la fluorescencia medida a tiempo cero y  $f_n$  la fluorescencia medida a tiempo  $n$ . Para cada compuesto ensayado se calculó el ABC neta (Ec. 15).

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{compuesto}} - ABC_{\text{blanco}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Posteriormente, se obtuvo la ecuación de regresión entre el ABCneta y las concentraciones finales de cada compuesto. Para calcular el valor relativo de ORAC se comparó la pendiente de la ecuación obtenida para los compuestos, con la pendiente obtenida para el patrón de referencia Trolox<sup>®</sup> (Ec. 16). Los valores de ORAC se expresaron como equivalentes de Trolox<sup>®</sup> (Eq. Trolox<sup>®</sup>/mol) [103].

$$\text{Valor relativo de ORAC} = \frac{\text{Pendiente compuesto}}{\text{Pendiente Trolox}} \quad \text{Ecuación 16}$$

### 3.2.2 Atrapamiento de radicales derivados de la descomposición homolítica del peroxinitrito

La capacidad de los nitroalquenos de atrapar los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$ , productos de la descomposición homolítica del  $\text{ONOO}^-$ , se estudió utilizando 123-dihidrorodamina (DHR) como blanco. La DHR en presencia de estos radicales es capaz de oxidarse a rodamina, que posee un máximo de absorbancia a 500 nm ( $\epsilon_{500} = 78 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [104, 105]. Las soluciones conteniendo los nitroalquenos (20-300  $\mu\text{M}$ ), se

incubaron durante 2 minutos a 37 °C en amortiguador fosfato de sodio 75 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM, en presencia de 50 μM de DHR y luego se agregó un bolo de ONOO<sup>-</sup> (50 μM) bajo agitación continua. La concentración final de rodamina se determinó mediante la medida de absorbancia a 500 nm. La concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>), se determinó ajustando los valores a la función logística que se muestra a continuación:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2, \text{ donde } 10^{x_0} = IC_{50}$$

### 3.3 Ensayos en cultivo celular

#### 3.3.1 Cultivo de macrófagos

Para la evaluación de los nitroalquenos como atrapadores de especies reactivas en un sistema biológico, se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774A.1. Los macrófagos fueron cultivados a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) conteniendo: glucosa (4.5 g/L), piruvato de sodio (110 mg/L), NaHCO<sub>3</sub> (3.7 g/L), L-glutamina (0.6 g/L), estreptomina (100 μg/mL), penicilina (100 U/mL) y suero bovino fetal de complementado (SBF, 10 %). Los experimentos en cultivo celular se realizaron en confluencia celular en placas de 24 pocillos, en Dulbecco's PBS (dPBS: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.45 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM) suplementado con glucosa 5.5 mM y L-arginina 1 mM.

#### 3.3.2 Activación de macrófagos para la producción de especies reactivas

**Producción de •NO.** La expresión de la iNOS en los macrófagos se indujo mediante la exposición de las células a interferón-γ (IFN-γ, 400 U/mL) y lipopolisacárido (LPS, 8 μg/mL) durante 5 horas, en DMEM a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> [105].

**Producción de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>.** El ensamblaje de la NADPH oxidasa en la membrana plasmática de macrófagos, se promovió mediante el agregado de acetato de forbolmiristato (PMA, 4 μg/mL), que desencadena la producción inmediata del radical O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> durante 90 a 120 minutos [105].

**Generación de ONOO<sup>-</sup>**. Para la producción de ONOO<sup>-</sup> se estimuló en forma simultánea la producción de <sup>•</sup>NO y el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, mediante la inducción de la iNOS (IFN-γ 400 U/mL, LPS 8 μg/mL) y la posterior activación de la NADPH oxidasa (PMA, 4 μg/mL), produciéndose de este modo un flujo constante de peroxinitrito [105].

### **3.3.3 Estudio de la reactividad con <sup>•</sup>NO**

Con el fin de analizar la reactividad de los nitroalquenos con el <sup>•</sup>NO, se evaluó su capacidad de inhibir la oxidación de la sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-FM DA, λ<sub>exc</sub>= 485 nm y λ<sub>em</sub>= 520 nm). Ésta se oxida a una molécula fluorescente en presencia de trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), un intermediario formado por la descomposición aeróbica del <sup>•</sup>NO [106].

Luego de la inducción de la iNOS en macrófagos, se sustituyó el medio de cultivo por una solución de DAF-FM DA (5 μM) en dPBS y se incubó durante media hora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, para permitir su desacetilación intracelular. El ensayo se realizó en ausencia y presencia de nitroalquenos (2.5-10 μM). La oxidación del DAF-FM DA se registró durante 1 hora en lector de placa (Varioskan flash Thermo, Vantaa, Finlandia).

### **3.3.4 Estudio de la reactividad con O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**

La capacidad de los nitroalquenos de reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se evaluó mediante la técnica de reducción de citocromo c inhibible por SOD. La reducción de citocromo c Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> por el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se siguió a 550 nm (ε<sub>550nm</sub>= 21 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) por 2 horas en lector de placa [105]. Las células tratadas con PMA (4 μg/mL) se incubaron durante 1 hora con una solución de citocromo c<sup>3+</sup> (20 μM) en dPBS a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, en ausencia y en presencia de los nitroalquenos (10 y 20 μM). Se incluyó una condición control con macrófagos activados en presencia de citocromo c<sup>3+</sup> (20 μM) y SOD (600 U/mL).

### **3.3.5 Estudio de la reactividad con radicales derivados de peroxinitrito**

En presencia de los radicales <sup>•</sup>OH y <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> (productos de la descomposición homolítica de peroxinitrito) la sonda fluorescente dihidrorodamina se oxida a rodamina (λ<sub>exc</sub>= 485 nm, λ<sub>em</sub>= 520 nm) [104, 105]. Luego de la inducción de los macrófagos para la producción simultánea de <sup>•</sup>NO y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, fueron incubados en ausencia

y en presencia de nitroalquenos (10  $\mu\text{M}$ ) y DHR (15  $\mu\text{M}$ ). La oxidación de DHR fue seguida por fluorescencia durante 1 hora en lector de placa.

### **3.4 Ensayo de viabilidad celular**

Para evaluar la citotoxicidad de los nitroalquenos, se utilizó un marcador de actividad metabólica celular. El ensayo se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido [107].

Por un lado se realizó un estudio de la citotoxicidad a largo plazo (24 horas) con un amplio rango de concentraciones (5-100  $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, se evaluó la toxicidad de los compuestos durante el tiempo (2 horas) y las concentraciones ensayadas (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) en los diferentes experimentos. Luego de transcurrido el tiempo correspondiente (2 o 24 horas), el medio de cultivo fue sustituido por una solución de MTT (0.1 mg/mL) en dPBS, durante 3 horas a 37 °C y con 5 % de  $\text{CO}_2$ . La producción de formazán fue determinada a 560 nm, en presencia de una solución reveladora conteniendo DMSO (90 % v/v) y amortiguador glicina (0.1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 M glicina, pH 10.5) para MTT (10 % v/v).

### **3.5 Estadística**

En todos los casos se utilizó un mínimo de 3 muestras para los cálculos y los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  desvío estándar. Para la medida del grado de significancia de los datos obtenidos, se utilizó el test ANOVA, considerando diferencias significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

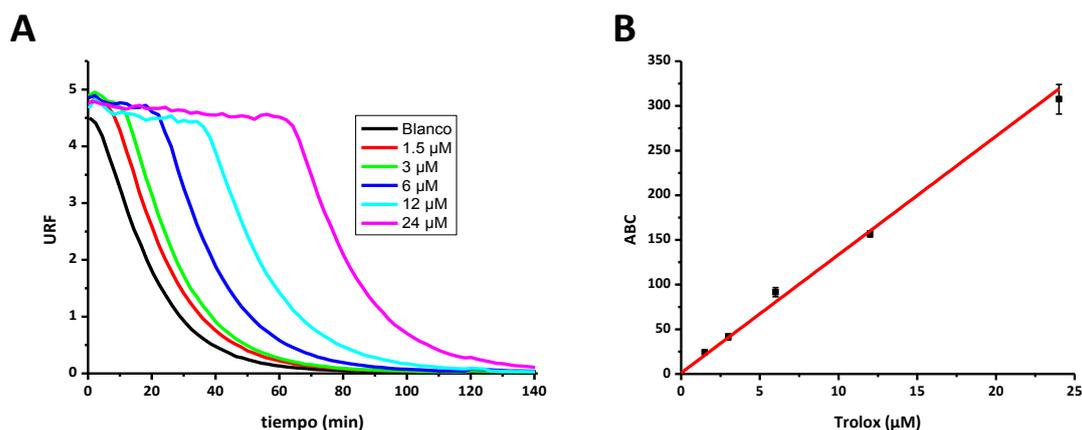
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Nitroalquenos como antioxidantes

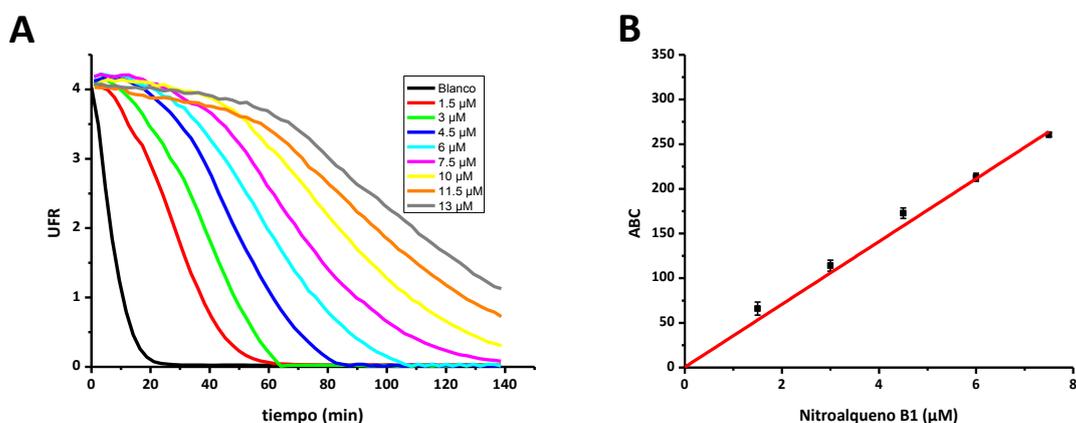
La capacidad antioxidante de 14 nitroalquenos aromáticos de síntesis, (Tabla 1) se determinó *in vitro* utilizando un método que valora la capacidad de atrapar radicales peróxido, originados por la descomposición térmica de un azocompuesto (ABAP), denominado ORAC. Esta técnica entrega información sobre la capacidad de una sustancia para ceder el protón lábil presente en su estructura, llamado mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). En presencia de fluoresceína como sonda fluorescente, las ERO generadas por el ABAP oxidan a la sonda, provocando un descenso en su fluorescencia. Al adicionar un compuesto antioxidante, que reaccione rápidamente con esos radicales, se retarda la oxidación del fluoróforo.

A partir de las curvas obtenidas para el decaimiento de la fluorescencia se calculó el área bajo la curva para las concentraciones de nitroalquenos cuyos valores de fluorescencia se aproximaron a 0 al transcurrir 140 minutos.

La figura 12 muestra una curva típica de calibración con el antioxidante de referencia Trolox<sup>®</sup>, donde se observa un aumento proporcional del área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia con la concentración del mismo. A continuación se muestra como ejemplo las curvas características de fluorescencia obtenidas en presencia del nitroalqueno B1 (Fig. 13). Los valores ORAC, expresados como equivalentes de Trolox<sup>®</sup>/mol de compuesto, obtenidos para los 14 nitroalquenos estudiados se resumen en la Tabla 1.



**Figura 12. Curva de calibración con Trolox®.** A) El decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína (7.5 nM) frente a ABAP (30 μM), en ausencia (blanco) y en presencia de Trolox® (1.5-24 μM), se siguió por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  485 nm,  $\lambda_{em}$  512 nm) a 37 °C en amortiguador fosfato (75 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM), utilizando un lector de placas Varioskan Flash plate reader (Thermo, Vantaa, Finland). B) Gráfico de área bajo curva vs concentración de Trolox® ( $y = 1.0968 + 13.2465x$ ,  $r^2 = 0.9998$ ).



**Figura 13. Determinación de la capacidad antioxidante del nitroalqueno B1 por ORAC.** A) La capacidad de inhibir la oxidación de fluoresceína (7.5 nM) en presencia de ABAP (30 μM) por B1 (1.5-13 μM) en amortiguador fosfato (75 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) a 37 °C, se midió por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  485 nm,  $\lambda_{em}$  512 nm) cada 2 minutos durante 140 minutos, utilizando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo, Vantaa, Finland). B) Gráfico de área bajo curva en función de la concentración de nitroalqueno ( $y = 0.4641 + 35.1354x$ ,  $r^2 = 0.9985$ ).

Se observó que la capacidad antioxidante de los nitrocompuestos, se encuentra asociada a las características electrónicas de los sustituyentes a nivel del anillo aromático. La mayoría de los compuestos presentaron valores ORAC menores a 1 Eq. Trolox®/mol, siendo los compuestos sin sustituyentes (A1 y A2) los que mostraron los

valores inferiores. Los compuestos G1 y G2, que poseen un un anillo dioxol mostraron una capacidad antioxidante similar al Trolox<sup>®</sup> ( $0.71 \pm 0.01$  y  $1.6 \pm 0.2$  Eq. Trolox<sup>®</sup> respectivamente). En cambio, para B1 y B2 que presentan un grupo electrón dador (N,N-dimetilamino), la capacidad antioxidante fue muy superior al estándar Trolox<sup>®</sup> ( $4.21 \pm 0.08$  y  $5.4 \pm 0.1$  Eq. Trolox<sup>®</sup>/mol respectivamente). Los altos valores de ORAC obtenidos para el grupo N,N dimetilamino y en menor medida para el grupo dioxol, podría deberse a una mejor estabilización de las cargas para este tipo de grupos [108].

Los nitroderivados que presentan un grupo metilo en posición *alfa* con respecto al grupo nitro poseen mayores valores de ORAC en relación a sus respectivos análogos con un hidrógeno en dicha posición.

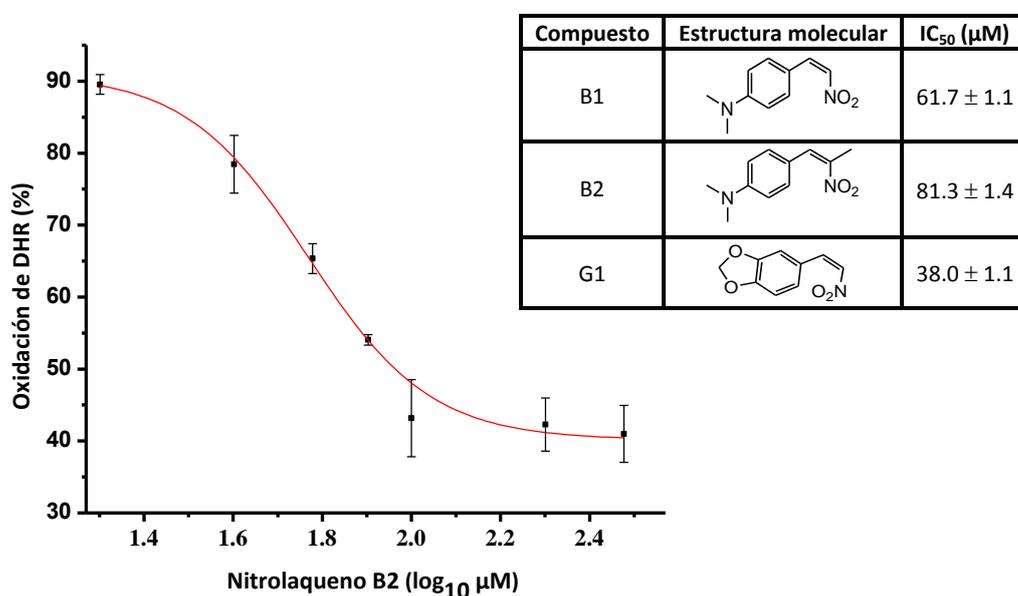
**Tabla 1.** Capacidad antioxidante de 14 nitroalquenos sintéticos, determinada por el método ORAC.

Compuesto	Estructura	Nombre	P.M. (g/mol)	ORAC (eq. Trolox)
A1		(Z)-1-(2-nitrovinil)benzeno	149	0.29 ± 0.01
A2		(Z)-1-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	163	0.37 ± 0.06
B1		(Z)-N,N-dimetil-4-(2-nitrovinil)benzenamina	192	<b>4.21 ± 0.08</b>
B2		(Z)-N,N-dimetil-4-(2-nitroprop-1-enil)benzenamina	206	<b>5.4 ± 0.1</b>
C1		(Z)-1-cloro-4-(2-nitrovinil)benzeno	184	0.44 ± 0.01
C2		(Z)-1-cloro-4-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	198	0.39 ± 0.02
D1		(Z)-1-bromo-4-(2-nitrovinil)benzeno	237	0.44 ± 0.04
D2		(Z)-1-bromo-4-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	251	0.45 ± 0.06
E1		(Z)-1-metoxi-4-(2-nitrovinil)benzeno	179	0.46 ± 0.03
E2		(Z)-1-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	193	0.46 ± 0.02
F1		(Z)-2-(2-nitrovinil) tiofeno	155	0.43 ± 0.07
F2		(Z)-2-(2-nitroprop-1-enil) tiofeno	169	0.54 ± 0.01
G1		(Z)-5-(2-nitrovinil)benzo[d][1,3]dioxol	193	<b>0.72 ± 0.01</b>
G2		(Z)-5-(2-nitroprop-1-enil)benzo[d][1,3]dioxol	208	<b>1.6 ± 0.2</b>

## 4.2 Reactividad frente a radicales derivados del peroxinitrito.

En ensayos previos, los 14 nitroalquenos (400  $\mu\text{M}$ ) fueron evaluados como atrapadores de radicales derivados del  $\text{ONOO}^-$ . A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron los compuestos B1, B2 y G1, por proteger en más del 40 % la oxidación de DHR (50  $\mu\text{M}$ ) (comunicación personal con Laura Celano), para determinar su

concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>). Se utilizó DHR (50 μM), ya que es capaz de oxidarse a rodamina en presencia de los radicales  $\bullet\text{OH}$  y  $\bullet\text{NO}_2$ , productos de la descomposición homolítica del ONOO<sup>-</sup> (50 μM) en ausencia de blancos.



**Figura 14. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de los nitroalquenos para radicales de ONOO<sup>-</sup>.** La oxidación de DHR (50 μM) a rodamina por los radicales del ONOO<sup>-</sup> (50 μM) se siguió por absorbancia ( $\epsilon_{500 \text{ nm}} = 78.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), en ausencia y en presencia de los nitroalquenos (20-300 μM) en amortiguador fosfato (75 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM) a 37 °C, en un lector de placa (Varioskan flash Thermo, Vantaa, Finlandia). El gráfico muestra un ejemplo de ajuste a la función logística ( $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$ ), para la oxidación de DHR en presencia de diferentes concentraciones de nitroalqueno B2. **Inserto.** La tabla muestra los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para los nitroalquenos luego del ajuste a la función.

Ninguno de los nitroalquenos fue capaz de proteger 100 % a la mayor concentración ensayada (300 μM), alcanzando su máxima protección (~ 60 %) a 100 μM. Esto podría deberse a que los nitrolaquenos presenten un atrapamiento selectivo de uno de los radicales  $\bullet\text{OH}$  o  $\bullet\text{NO}_2$ , de modo que el radical que escapa continúa oxidando a la DHR. Otra causa, podría ser la existencia de una concentración máxima activa para los compuestos, donde el efecto es máximo y por encima de ella no se obtiene mayor protección.

El compuesto G1 fue el mejor atrapador de los radicales derivados del  $\text{ONOO}^-$ , presentando una  $\text{IC}_{50}$  de  $38.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$ . Por otra parte, el compuesto B1 fue más eficiente que su análogo metilado B2 ( $61.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$  vs  $81.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ , respectivamente). Los resultados obtenidos para todos los compuestos y un ajuste típico para el compuesto B2 se muestran en la figura 14.

La protección obtenida en la oxidación de DHR, podría deberse tanto a la reactividad de los nitroalquenos con los radicales, como con el peroxinitrito directamente. Para responder esta duda se podría estudiar la reactividad directa entre los nitroderivados y  $\text{ONOO}^-$ , mediante un ensayo de competencia donde se utilice una molécula que reaccione directamente con el  $\text{ONOO}^-$ , como por ejemplo el citocromo c reducido ( $\text{cit c}^{2+}$ ) [109].

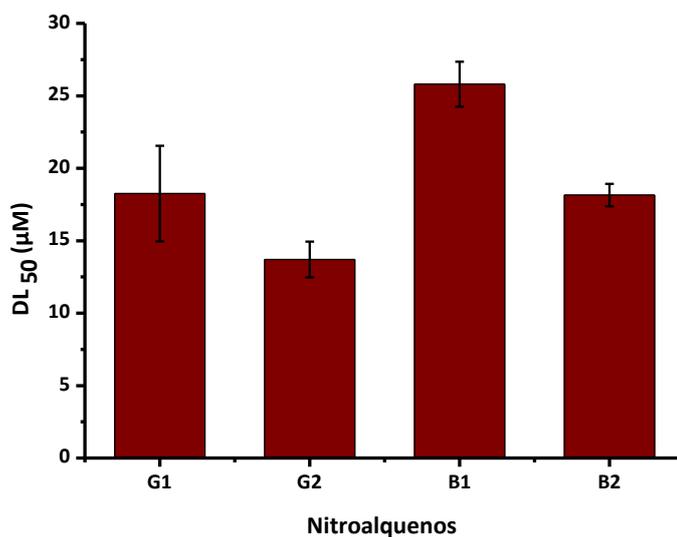
### **4.3 Ensayos en cultivo celular**

Los resultados obtenidos hasta el momento son producto de la adición en bolo de peroxinitrito. En un medio biológico en cambio, la formación de peroxinitrito ocurre a partir de la producción simultánea de sus moléculas precursoras  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\bullet\text{NO}$ , como un flujo continuo. Es por este motivo que los nitroalquenos con sustituyentes N,N dimetilamino (B1 y B2) y con anillo dioxol (G1 y G2) que mostraron ser más efectivos como atrapadores de radicales peroxilo y derivados del peroxinitrito, fueron seleccionados para estudiar su capacidad de atrapar especies reactivas generadas por macrófagos activados.

#### **4.3.1 Citotoxicidad**

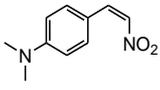
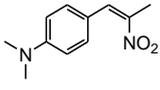
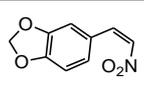
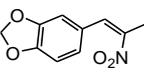
El efecto de los nitroalquenos sobre la viabilidad celular se estudió por la técnica de MTT, ya que existe una relación proporcional entre la cantidad de células vivas y el formazán generado. Los macrófagos J774A.1 en confluencia fueron expuestos a concentraciones crecientes (5-100  $\mu\text{M}$ ) de los nitroalquenos (B1, B2, G1, G2) durante 24 horas y luego incubadas con MTT. Se cuantificó la producción de formazán por absorbancia a 560 nm y se determinó la dosis letal 50 ( $\text{DL}_{50}$ ) para los diferentes nitroalquenos (Fig. 15). Los derivados N,N dimetilamino fueron menos

tóxicos que sus pares dioxol, siendo el compuesto B1 el menos tóxico ( $DL_{50} = 25.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ) y G2 ( $DL_{50} = 13.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ) el más tóxico. Estos resultados fueron preocupantes, ya que los valores obtenidos de  $IC_{50}$  para los nitroalquenos como atrapadores de los radicales derivados del  $ONOO^-$ , se encuentran entre 38 y 81  $\mu\text{M}$  (Fig. 14). Por lo que decidimos evaluar la sobrevida durante el tiempo y las concentraciones a las que se desarrollaron los experimentos con los macrófagos activados, se realizó el ensayo de viabilidad de 2 horas para los 4 compuestos a 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Los macrófagos expuestos a una concentración de nitroalquenos de 10  $\mu\text{M}$  mostraron una sobrevida entre 94 y 100 %, mientras que a 20  $\mu\text{M}$  la viabilidad se ubicó entre 86 y 94 %. Se observaron diferencias significativas entre las concentraciones sólo para los compuestos B1 y G2 (\* =  $p < 0.05$ ). Por su parte, los derivados metilados (G2 y B2) fueron levemente menos tóxicos que sus pares no metilados (Tabla 2). Por lo tanto estos nitroalquenos no presentaron citotoxicidad importante para esta línea celular, a las concentraciones y período ensayados.



**Figura 15. Efecto de los nitroalquenos sobre la viabilidad celular en 24 horas.** Los macrófagos J774A.1 en confluencia se incubaron 24 horas, en ausencia y en presencia de nitroalquenos (5-100  $\mu\text{M}$ ). Luego se sustituyó el medio de cultivo por MTT (0.1 mg/mL) y se incubó 3 horas a 37 °C en atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ . La producción de formazán fue medida a 560 nm en presencia de la solución reveladora (DMSO, glicina 90:10) en lector de placas Varioskan Flash plate reader (Thermo, Vantaa, Finland). Se muestra un experimento representativo de 3, los datos se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de triplicados.

**Tabla 2. Citotoxicidad de los nitroalquenos en 2 horas.** Los macrófagos murinos J774 fueron expuestos a los nitroalquenos (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas. .

Compuesto	Estructura	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidad (%)**
B1		10	98 $\pm$ 9 *
		20	86 $\pm$ 5 *
B2		10	101 $\pm$ 11
		20	94 $\pm$ 10
G1		10	94 $\pm$ 11
		20	87 $\pm$ 11
G2		10	97 $\pm$ 7 *
		20	89 $\pm$ 7 *

(\*) Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambas concentraciones para B1 y G2.

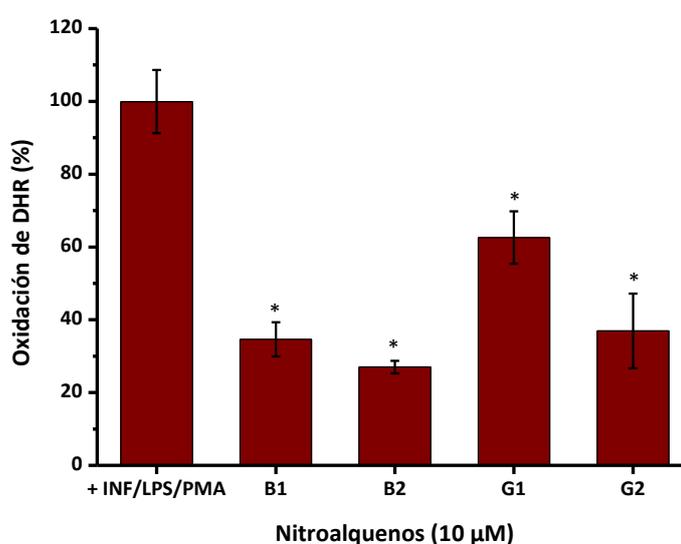
(\*\*) Los resultados se expresan como porcentaje de células viables con respecto al control en ausencia de compuestos

#### 4.3.2 Reactividad con radicales derivados del $\text{ONOO}^-$

El  $\text{ONOO}^-$  en cultivo fue generado a partir de la producción simultánea de los radicales  $\bullet\text{NO}$  y el  $\text{O}_2\bullet^-$ . La formación de  $\bullet\text{NO}$  ocurre luego de la inducción de la enzima iNOS, mediada por citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  y LPS, iniciando una producción sostenida de  $\bullet\text{NO}$  que alcanza su máximo luego de 4 o 5 horas de exposición a las mismas. Por otro lado, la formación de  $\text{O}_2\bullet^-$  depende del ensamblaje de la NADPH oxidasa en membrana plasmática. Esta se activa *in vitro* por el agregado de PMA y comienza la producción de  $\text{O}_2\bullet^-$  en forma inmediata y sostenida en el tiempo durante 90 a 120 minutos. El  $\bullet\text{NO}$  es capaz de difundir a través de la membrana plasmática hacia el exterior de la célula, donde reacciona con el  $\text{O}_2\bullet^-$  y genera un flujo constante de  $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$  [105]. Se estudió entonces la capacidad de los nitroalquenos (10  $\mu\text{M}$ ) de proteger la oxidación de la DHR (15  $\mu\text{M}$ ) mediada por los radicales  $\bullet\text{OH}$  y  $\bullet\text{NO}_2$ , productos de la homólisis del peroxinitrito.

Todos los compuestos fueron capaces de inhibir parcialmente la oxidación de DHR con respecto al control (\*, =  $p < 0.05$ ) (Fig. 16). Sin embargo no se observaron

diferencias entre los nitroalquenos relacionados (B1 vs B2 y G1 vs G2). Los compuestos sustituidos con el grupo N,N dimetilamino (B1 y B2), fueron más eficientes evitando la oxidación de la DHR en  $65,4 \pm 4.7 \%$  y  $73,0 \pm 1.7 \%$ , respectivamente. Cabe resaltar, que estos resultados no coinciden con los que se obtuvieron en los ensayos donde se adicionó un bolo de  $\text{ONOO}^-$  (Fig. 14), en el cual el compuesto G1 resultó ser el más efectivo. Esto podría deberse a que la producción de  $\text{ONOO}^-$  en cultivo celular ocurre a partir de la generación de sus precursores  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , por lo que se investigó la reactividad de los nitroalquenos con cada radical.



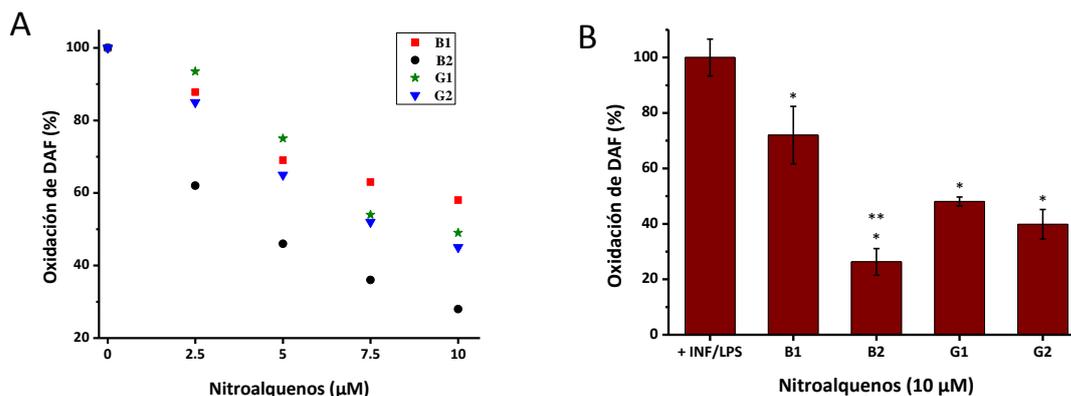
**Figura 16. Inhibición de la oxidación de DHR en cultivo celular.** Los macrófagos murinos J774A.1 fueron estimulados para la producción simultánea de  $\cdot\text{NO}$  (IFN- $\gamma$  400 U/mL y LPS 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (PMA, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dando lugar a la formación de  $\text{ONOO}^-$ . La oxidación de DHR (15  $\mu\text{M}$ ) se siguió por fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}}$  485 nm y  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm) durante 1 hora, en un lector de placa (Varioskan flash Thermo, Vantaa, Finlandia) a 37 °C. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  sd de triplicados de un experimento representativo de 4. Se observaron diferencias significativas entre las condiciones en ausencia y en presencia de nitroalquenos (10  $\mu\text{M}$ ), \*,  $p < 0.05$  (n=4).

### 4.3.3 Oxidación de DAF-FM DA

En presencia de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , producto de oxidación del  $\cdot\text{NO}$ , el DAF-FM DA se oxida a una molécula fluorescente ( $\lambda_{\text{exc}}$  485 nm/  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm), por lo que siguiendo su fluorescencia se puede determinar la eficiencia de los compuestos como atrapadores de óxido nítrico y/o su derivado  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Luego de la inducción de la iNOS (IFN- $\gamma$ , 400 U/mL, LPS 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), los macrófagos fueron expuestos a diferentes concentraciones de

nitroalquenos (2.5-10  $\mu\text{M}$ ). Los compuestos ensayados mostraron una respuesta dependiente de la dosis para la protección de la oxidación de DAF-FM DA (Fig. 17.A). Todos fueron capaces de reaccionar con  $\cdot\text{NO}$  y/o su derivado  $\text{N}_2\text{O}_3$ , disminuyendo la oxidación de DAF-FM DA en forma significativa (\*,  $p < 0.05$ ) con respecto al control en ausencia de nitroalquenos (Fig. 17.B). El nitroalqueno B2 fue significativamente más eficiente que su par no metilado B1 (\*\*,  $p < 0.05$ ), evitando la oxidación de DAF-FM DA en un  $73.7 \pm 4.8 \%$  contra un  $28.0 \pm 10.3 \%$  para B1. El par G1 y G2 presentaron un efecto similar ( $51.9 \pm 1.6 \%$  y  $60.1 \pm 5.3 \%$ , respectivamente).

Los compuestos B2 y G1 mostraron una respuesta similar para los ensayos de oxidación de DHR y DAF-FM, lo cual sugiere que la baja producción de  $\cdot\text{NO}$  alcanzada en presencia de aquellos es lo que en definitiva se traduce en una menor producción de  $\text{ONOO}^-$  y en un efecto protector mayor de la oxidación de DHR por esta fuente de peroxinitrito que cuando se agregó en bolo, como mostramos en la figura 14.



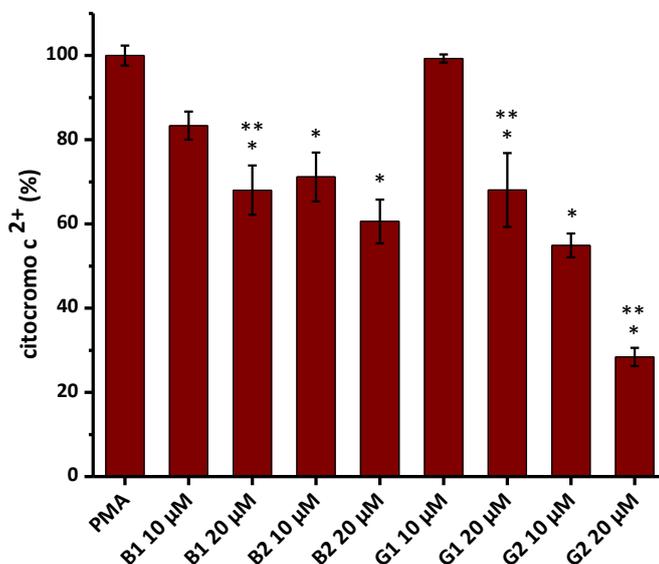
**Figura 17. Protección de la oxidación de DAF-FM DA.** **A.** Los macrófagos fueron expuestos a los inductores de iNOS (IFN- $\gamma$ , 400 U/mL y LPS, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 5 horas en DMEM. El curso temporal de la oxidación de DAF-FM DA (5  $\mu\text{M}$ ) se siguió por fluorescencia en un lector de placa (Varioskan flash Thermo, Vantaa, Finlandia), durante 1 hora a 37  $^{\circ}\text{C}$ . El ensayo se realizó en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de nitroalquenos (2.5-10  $\mu\text{M}$ ). **B.** Efecto de los nitroderivados a 10  $\mu\text{M}$ . Los datos se expresan como promedio  $\pm$  sd de triplicados de un experimento representativo de 4. Se observan diferencias significativas en ausencia y en presencia de nitroalquenos (10  $\mu\text{M}$ ) (\*,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ ) y entre los nitroalquenos B1 y B2 (\*\*,

$p < 0.05$ ,  $n = 4$ ).

#### 4.3.4 Reactividad con $O_2^{\bullet-}$

Se evaluó la capacidad de los nitroalquenos de reaccionar con el  $O_2^{\bullet-}$ , el otro radical precursor de peroxinitrito, mediante la reducción de citocromo  $c^{3+}$  inhibible por SOD. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  en macrófagos ocurre a partir del ensamblaje de la NADPH oxidasa en membrana plasmática, inducido por PMA (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de reducir el hierro del grupo hemo del citocromo  $c$  a  $Fe^{2+}$ , que absorbe a 550 nm ( $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El registro cinético de formación de citocromo reducido se registró en un lector de placas durante 1 hora en ausencia y en presencia de los nitroalquenos (10 y 20  $\mu\text{M}$ ).

En la figura 18 se observa que los nitroalquenos B2 y G2 (10  $\mu\text{M}$ ) mostraron una protección significativa con respecto al control sin compuesto (\*,  $p < 0.05$ ), en particular, G2 fue el más eficiente (45.1  $\pm$  2.8 %). En cambio, a 20  $\mu\text{M}$  los 4 compuestos fueron capaces de disminuir sensiblemente la reducción del citocromo  $c$  inhibible por SOD, siendo el compuesto G2 nuevamente el más efectivo, inhibiendo la reducción en 71.6  $\pm$  2.1 %.



**Figura 18. Nitroalquenos como atrapadores de  $O_2^{\bullet-}$ .** Los macrófagos J774A.1 en confluencia fueron estimulados para la producción de  $O_2^{\bullet-}$  mediante el ensamblaje de la NADPH oxidasa, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

inducido por PMA (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubados con citocromo  $\text{c}^{3+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos en dPBS a 37 °C, en atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ . La reducción de citocromo  $\text{c}^{3+}$  se siguió a 550 nm, en un lector de placa (Varioskan flash Thermo, Vantaa, Finlandia) durante 2 horas. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  sd de triplicados de un experimento representativo de 6. Se observaron diferencias significativas en ausencia y presencia de los compuestos \*,  $p < 0.05$  (n=6), y entre 10 y 20  $\mu\text{M}$  para cada compuesto \*\*,  $p < 0.05$  (n=6).

## 5. CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante de los nitroalquenos estudiados se encuentra asociada a las características electrónicas de los sustituyentes a nivel del anillo aromático. La presencia del grupo electrón dador dimetilamino, presente en los compuestos B1 y B2, les confiere una mayor capacidad antioxidante, que los destaca dentro de la serie de nitroalquenos estudiados. Ambos mostraron ser buenos atrapadores tanto del radical peroxilo, como de los radicales derivados de la descomposición homolítica del  $\text{ONOO}^-$ .

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en cultivo muestran que los nitroalquenos B1, B2 y G2 fueron buenos inhibidores de la oxidación de la DHR (Fig. 16), sugiriendo que son buenos secuestradores del  $\text{ONOO}^-$  o sus radicales derivados. Sin embargo, a pesar de la similitud estructural de los compuestos mostraron cierta especificidad respecto a los oxidantes con los cuales reaccionaron. En particular, el compuesto G2 (20  $\mu\text{M}$ ) mostró una reactividad importante con el anión radical superóxido, al inhibir la reducción del citocromo  $c^{3+}$  por este radical en más de un 70 % (Fig. 18). Por su parte, el compuesto B2 que mostró una reactividad moderada con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , mostró una reactividad preferencial con el  $\bullet\text{NO}$ , evitando la oxidación de DAF-FM DA en un 74 % (Fig. 17). Esto explicaría por qué B2, que fue un atrapador relativamente pobre de los radicales derivados de la descomposición homolítica de  $\text{ONOO}^-$  resultara altamente efectivo para prevenir la oxidación de la DHR por los mismos radicales, cuando el  $\text{ONOO}^-$  fue generado a partir de NO y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sintetizados enzimáticamente por el cultivo celular. Por otro lado, es probable que la reactividad del compuesto B1 se relacione directamente al  $\text{ONOO}^-$  o sus radicales de descomposición  $\bullet\text{NO}_2$  y  $\bullet\text{OH}$ , ya que fue efectivo previniendo la oxidación de DHR, sin embargo no fue un buen atrapador de  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  generados separadamente.

A partir de los ensayos de viabilidad celular, se determinó que durante 24 horas los compuestos presentan cierta toxicidad. En cambio, los ensayos realizados durante 2 horas mostraron que ninguno de los compuestos es citotóxico para el tiempo y

concentraciones en que se desarrollaron los experimentos con los macrófagos activados.

Por lo dicho anteriormente, los compuestos B1 y B2 son buenos candidatos para desarrollos ulteriores y estudios exhaustivos de su potencial como fármacos protectores durante procesos inflamatorios en los que se producen altos niveles de especies reactivas, como las mencionadas anteriormente.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Augusto O., and Miyamoto S., (2012). Radicals and related species. In: Principles of free radical biomedicine, (Eds. Pantopoulos K., and Schipper H.). Nova Biomedical, New York, Vol. 1, cap. 2.
2. Fridovich I., (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*; 201: 875-880.
3. Boots A.W., G.R. Haenen, and A. Bast., (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585(2-3): 325-337.
4. Halliwell B., (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141: 312-322.
5. Beckman K.B., Ames B.N., (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2): 547-581.
6. Radi R., (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(12): 4003-4008.
7. Haber F. & Weiss J., (1934). The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London*, 147: 332-351.
8. Vina J., et al., (1983). The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem J*, 212(1): 39-44.
9. Tahara E.B., Navarete F.D., Kowaltowski A.J., (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*, 46(9):1283-1297
10. Ames B.N., Shigenaga M., Hagen T.M., (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7915-7922.
11. Fridovich I., (1997). Superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 272: 18515-18517.
12. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, 15(6): 1583-1606.
13. Kanner J., German J.B. and Kinsella J.E., (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 25: 317-364.
14. Rojkind M., Domínguez-Rosale J.A., Nieto N., Greenwel P., (2002). Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *CMLS Cell Mol Life Sci*, 59: 1-20.
15. Kohen R., Nyska A., (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30(6): 620-650.
16. Kanofsky J.R., (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chem Biol Interact*, 70: 1-28.
17. Bush P.A., González N.E. and Ignarro L.J., (1992). Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun*, 186: 308-314.
18. Beckman J.S. and W.H. Koppenol, (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271(5): 1424-1437.

19. Bartesaghi S., Romero N., and Radi R., (2012). Nitric oxide and derived oxidants, (Eds. Pantopoulos K., and Schipper H.). Nova Biomedical, New York, Vol. 1, cap. 3.
20. Grisham M.B., Jourdain D. and Wink D.A., (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*, 276: 315-321.
21. Bauer G, et al., (2008). Biologically Relevant Small Radicals. *Chimia*, 62(9): 704-712
22. Samuni Y., U. Samuni, and S. Goldstein, (2012). The mechanism underlying nitroxyl and nitric oxide formation from hydroxamic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1820(10): 1560-1566.
23. Jomova K., et al., (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*, 345(1-2): 91-104.
24. Ferrer-Sueta G. and R. Radi, (2009). Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol*, 4(3): 161-177.
25. Alvarez B., Radi R., (2003). Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*, 25: 295-311.
26. Radi R., et al., (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 288(2): 481-487.
27. Murphy M.E. and H. Sies, (1991). Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23): 10860-10864.
28. Zhao X.J., V. Sampath, and W.S. Caughey, (1995). Cytochrome c oxidase catalysis of the reduction of nitric oxide to nitrous oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 212(3): 1054-1060.
29. Saleem M. and H. Ohshima, (2004). Xanthine oxidase converts nitric oxide to nitroxyl that inactivates the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(2): 455-462.
30. Klotz L.O. and H. Sies, (2002). Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide. *Methods Enzymol*, 349: 101-106.
31. Williams D.L.H., (1988). Nitrosation. Cambridge University Press. Cambridge.
32. Martínez Cayuela M., (2005). Estrés oxidativo y mecanismo de defensa antioxidante. En: *Tratado de Nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*, (Ed. Gil Hernández A). Acción Médica, Madrid, tomo I: 626-657.
33. Genova M.L., Pich M.M., Bernacchia A., Bianchi C., Biondi A., Bovina C., Falasca A.I., Formiggini G., Castelli G.P. and Lenaz G., (2004). The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci*, 1011: 86-100.
34. Nilsen J., (2008). Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Front Neuroendocrinol*, 29(4): 463-475.
35. Bayir H. and V.E. Kagan., (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*, 12(1): 206.
36. Radi R., Tan S., Prodanov E., Evans R.A. and Parks D.A., (1992). Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochim Biophys Acta*, 1122: 178-182.
37. Carro, M.D., et al., (2009). Determination of xanthine oxidoreductase activity in broilers: effect of pH and temperature of the assay and distribution in tissues. *Poult Sci*, 88(11): 2406-2414.
38. Ichida, K., et al., (2012). Mutations associated with functional disorder of xanthine oxidoreductase and hereditary xanthinuria in humans. *Int J Mol Sci*, 13(11): 15475-15495.

39. Villanueva, C. and C. Giulivi (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*, 49(3): 307-316.
40. Thomas D.D., et al., (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*, 45(1): 18-31.
41. Nathan, C. and Q.W. Xie, (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269(19): 13725-13728.
42. Kone B.C., (2004). Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol*, 24: 299-315.
43. Liu Q. and S.S. Gross, (1996). Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol*, 268: 311-324.
44. Cascales M. (2005). Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.*, 71: 365-386
45. Massaad C.A. and E. Klann, (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*; 14(10): 2013-2054.
46. Rutgers, A., P. Heeringa, and J.W. Tervaert, (2003). The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Clin Exp Rheumatol*, 21: 55-63.
47. Panes J., (2001). Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand*, 173(1): 159-165.
48. Werck-Reichhart D. and Feyereisen R., (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*, 1(6): Reviews3003.
49. Ortiz de Montellano P.R. and De Voss J.J., (2002). Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Nat Prod Rep*, 19: 477-493.
50. Von Sonntag C., (1994). Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research. *Int J Radiat Biol*, 65: 19-26.
51. Finkel T. and N.J. Holbrook, (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809): 239-247.
52. Filippin L.I., et al., (2008) Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 152(3): 415-422.
53. McInnes I.B. and G. Schett, (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365(23): 2205-2219.
54. Stadler K., et al., (2008). Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med*, 45(6): 866-874.
55. Danielson S.R. and J.K. Andersen, (2008). Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 44(10): 1787-1794.
56. Sonnen J.A., et al., (2008). Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. *Free Radic Biol Med*, 45(3): 219-230.
57. Catalá A., (2012). Lipid peroxidation. In: *Principles of free radical biomedicine*, (Eds. Pantopoulos K., and Schipper H.). Nova Biomedical, New York, Vol. 1, cap. 7.
58. Henkel R.R., (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl*, 13(1): 43-52.

59. Davies K.J.A., (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem*, 262: 9895-9901.
60. Tchou J. & Grollman A.P., (1993). Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res*, 299: 277-287.
61. Giulivi C., (1998). Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J*, 332 (3): 673-679.
62. Albertini R., Rindi S., Passi A., Bardoni A., Salvini R., Pallavicini G. and De Luca G., (1996). The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 327: 209-214.
63. Grootveld M., Henderson E.B., et al., (1991). Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem. J*, 273: 459-467.
64. Fernández J. M., Da Silva M. E. y Tuñez I., (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deporte*, Vol. 2, Núm. 1.
65. Halliwell B., (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr*, 16: 33-50.
66. Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5): 1147-1150.
67. Fridovich, I. (2007). Antioxidant enzymes. *Redox biochemistry*. R. Banerjee. Michigan, Wiley-Interscience: 49-131.
68. Sies H., (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27(9-10): 916-921.
69. Papp L.V., et al., (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 9(7): 775-806.
70. Rhee S.G., H.Z. Chae, and K. Kim, (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*, 38(12): 1543-1552.
71. Chowdhury I., et al., (2009). Oxidant stress stimulates expression of the human peroxiredoxin 6 gene by a transcriptional mechanism involving an antioxidant response element. *Free Radic Biol Med*, 46(2): 146-153.
72. Trujillo M., et al., (2004). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem*, 279(33): 34175-34182.
74. Ogusucu R., D. Rettori, et al., (2007). Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic Biol Med*, 42(3): 326-334.
75. Poole L. B., (2007). The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell Biochem*, 44: 61-81.
73. Hall A., P. A. Karplus, et al., (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *Febs J*, 276(9): 2469-2477.
76. Wang X., L. Wang, et al., (2012). Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4. *Biochem J*, 441(1): 113-118.

77. Gomes, E.C., A.N. Silva, and M.R. de Oliveira, (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*, 2012: 756132.
78. McArdle F., et al., (2004). Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr*, 80(5): 1270-1275.
79. Stone, J. M. a. W., M.A., (2007). Antioxidants molecules and redox cofactors. *Redox biochemistry*. R. Banerjee. Michigan, Wiley-Interscience: 27-34.
80. Sies H., Stahl W., (1995). Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62: 1315-1321.
81. Uttara B., et al., (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol*, 7(1): 65-74.
82. Barycki, J. J. (2007). Antioxidant molecules and redox cofactors. *Redox biochemistry*. R. Banerjee. Michigan, Wiley Interscience: 11-21.
83. Giustarini D., et al., (2008). Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. *Blood Cells Mol Dis*, 40(2): 174-179.
84. Toppo S., et al., (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta*, 1790(11): 1486-1500.
85. Baker P.R., et al., (2005). Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*, 280(51): 42464-42475.
86. Baker P.R., et al., (2004). Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32): 11577-11582.
87. Lima ES, Di Mascio P., (2003). Abdalla DS: Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J Lipid Res*, 44(9): 1660-1666.
88. Liebler D.C., (2008). Protein damage by reactive electrophiles: targets and consequences. *Chem Res Toxicol*, 21(1): 117-128.
89. Rubbo H., et al., (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269(42): 26066-26075.
90. Cui T., et al., (2006). Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem*, 281(47): 35686-35698.
91. Ferreira A.M., et al., (2009). Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J*, 417(1): 223-234.
92. Barlovic D.P., A., (2011). Soro-Paavonen, and K.A. Jandeleit-Dahm, RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 121(2): 43-55.
93. Clark T.A., et al., (2010). Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease. *Int J Biomed Sci*, 6(3): 225-227
94. Afonso V., et al., (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4): 324-329.

95. Tashakkor A.Y., K.S. Chow, and C. Carlsten, (2011). Modification by antioxidant supplementation of changes in human lung function associated with air pollutant exposure: a systematic review. *BMC Public Health*, 11: 532.
96. Turan B., (2010). Role of antioxidants in redox regulation of diabetic cardiovascular complications. *Curr Pharm Biotechnol*, 11(8): 819-836.
97. Lee I.M., (1999). Antioxidant vitamins in the prevention of cancer. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(1): 10-15.
98. Stanner S.A., et al., (2004). A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr*, 7(3): 407-422.
99. Zandi P.P., et al., (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol*, 61(1): 82-88.
100. Rimm E.B., et al., (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 328(20): 1450-1456.
101. Merlino A., et al. (2007). 2-Benzyl-2-methyl-2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: Spectroscopic and theoretical study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 67(2): 540-549.
102. Ou B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem*, 4: 4619-4926.
103. Porcal W, (2007). Investigación y desarrollo de nitronas alicíclicas y cíclicas como agentes moduladores del estrés oxidativo. Facultad de Química, UdelaR.
104. Walrand S., et al. (2003). Flow Cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *ClinChimActa*, 331(1-2): 103-110.
105. Alvarez M.N., M. Trujillo, and R. Radi, (2002). Peroxynitrito formation from biochemical and celular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol*, 359: 353-366.
106. Kojima H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Hirata, Y., and Nagano, T. (1999). Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew's Chem*, 38: 3209-3212.
107. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
108. Morrison, R.T.; Boyd, R.N. (1998). *Química Orgánica.*, Addison Wesley Longman de México S.A., 898-899.
109. Thomson, L., et al., (1995). Kinetics of cytochrome  $c^{2+}$  oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys*, 319(2): 491-497.