

NITRACIÓN Y OXIDACIÓN DE TIROSINA POR PEROXINITRITO MEDIADA POR METALES DE TRANSICIÓN

Mecanismos de Reacción y Relevancia Biológica

Nicolás Campolo Halty
Orientador: Dr. Rafael Radi
Co-orientador: Dra. Silvina Bartesaghi

Centro de Investigaciones Biomédicas
Facultad de Medicina – Universidad de la República
Diciembre de 2013, Montevideo, Uruguay

Índice General

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. La tirosina: propiedades fisicoquímicas, metabolismo y funciones biológicas	3
2.2. Nitración de tirosina como modificación oxidativa postraduccional	5
2.2.1. Antecedentes	5
2.2.2. Propiedades de la 3-nitrotirosina y consecuencias biológicas de su formación	8
2.2.3. Niveles de nitración de tirosina y su relación con enfermedades	12
2.3. Agentes oxidantes y nitrantes de relevancia biológica	14
2.3.1. Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	15
2.3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	16
2.3.3. Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)	17
2.3.4. Óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)	17
2.3.5. Dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$)	18
2.3.6. Peroxinitrito (ONOO^-)	19
2.4. Mecanismos de nitración y oxidación de tirosina	22
2.5. Metales de transición en biología	27
2.5.1. Hierro	28
2.5.2. Cobre	30
2.5.3. Manganeseo	31
2.6. Bioquímica redox del grupo hemo	33
2.7. Complejos metálicos de relevancia farmacológica	36
3. Objetivos	40
4. Materiales y Métodos	40
4.1. Materiales	40
4.2. Métodos	41
4.2.1. Síntesis y cuantificación de peroxinitrito	41

4.2.2. Síntesis de 3,3'-ditirosina.....	41
4.2.3. Preparación de complejos metálicos.....	41
4.2.4. Reacciones de oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito	43
4.2.5. Análisis y cuantificación de productos de oxidación y nitración de tirosina por HPLC.....	44
4.2.6. Estudio cinético de la reacción entre el ONOO^- y el complejo metálico FeEDTA.....	45
4.2.7. Preparación de Hemina-Albúmina (HemHSA)	45
4.2.8. Tratamiento de HSA y HemHSA con ONOO^-	46
4.2.9. Determinación de NO_2Tyr en muestras de HSA y HemHSA tratadas con ONOO^- por Dot-Blot.....	46
5. Resultados.....	47
5.1. Análisis por HPLC de productos de oxidación y nitración de tirosina.	47
5.2. Efecto de la concentración de ONOO^- y de tirosina sobre la formación de productos.....	48
5.3. Nitración y oxidación de tirosina por ONOO^- en presencia de distintos complejos metálicos de bajo peso molecular	51
5.4. Estudio de la cinética de reacción entre el complejo FeEDTA y el ONOO^-	60
5.5. Efecto del pH sobre la formación de productos de nitración y oxidación de tirosina por ONOO^-	61
5.6. Formación de NO_2Tyr y DiTyr por ONOO^- en presencia de Hemina- Albúmina.....	65
5.7. Nitración de HSA y HemHSA por ONOO^-	68
6. Discusión	70
7. Conclusiones	94
8. Agradecimientos.....	95
9. Referencias	95

Índice de Cuadros e Ilustraciones

Figura 2.1. Estructura y propiedades espectrofotométricas de la tirosina.....	4
Figura 2.2. Estructura de la 3-nitrotirosina y propiedades espectrofotométricas.....	9
Figura 2.3. Inactivación de la MnSOD por nitración de la tirosina 34.....	11
Tabla I. Ejemplo de proteínas que cambian su actividad tras experimentar nitración de residuos de tirosina.....	12
Figura 2.4. Incremento en los niveles de NO_2Tyr en arterias coronarias ateroscleróticas.....	14
Figura 2.5. Reacciones entre el peroxinitrito y las hemoproteínas.....	20
Figura 2.6. Principales vías de reacción del peroxinitrito.....	21
Figura 2.7. Mecanismos radicalares de oxidación y nitración de tirosina.....	25
Tabla II. Constantes de velocidad de las principales reacciones implicadas en la nitración y oxidación de tirosina.....	26
Figura 2.8. Estructura del grupo hemo.....	29
Figura 2.9. Estructura de las metaloporfirinas.....	38
Figura 2.10. Descomposición catalítica de peroxinitrito por parte de porfirinas de manganeso y hierro.....	39
Figura 4.1. Estructura de las porfirinas de manganeso empleadas.....	42
Figura 4.2. Estructura de los complejos Metal-EDTA y Hemina.....	43
Figura 5.1. Análisis cromatográfico de productos de oxidación de la tirosina.....	48
Figura 5.2. Efecto de la concentración de ONOO^- y de tirosina sobre la nitración y dimerización de tirosina.....	50
Tabla III. Formación de productos de oxidación y nitración en presencia de diversos complejos metálicos de bajo peso molecular.....	52

Figura 5.3. Nitración y dimerización de Tyr por ONOO ⁻ en presencia de distintas concentraciones de FeCl ₃ , FeCit, FeGlut y CuEDTA.....	53
Figura 5.4. Curva dosis-respuesta para nitración y oxidación de tirosina por ONOO ⁻ en presencia de FeEDTA.....	54
Figura 5.5. Nitración y dimerización de tirosina por ONOO ⁻ en presencia de distintas concentraciones de MnTBAP	56
Figura 5.6. Efecto del complejo MnTE-2-PyP sobre la nitración y dimerización de tirosina por ONOO ⁻	58
Figura 5.7. Curva dosis-respuesta para nitración y dimerización de tirosina por ONOO ⁻ en presencia de Hemina.....	59
Figura 5.8. Determinación de la constante de velocidad de reacción entre FeEDTA y el ONOO ⁻	61
Figura 5.9. Formación de productos de oxidación y nitración de tirosina por ONOO ⁻ a distintos valores de pH.....	62
Figura 5.10. Efecto del pH sobre la nitración y dimerización de tirosina por ONOO ⁻ en presencia de complejos metálicos.....	63
Figura 5.11. Formación de DOPA a valores de pH ácido en presencia de complejos metálicos.....	65
Figura 5.12. Caracterización espectrofotométrica de la formación del complejo Hemina-Albúmina.....	66
Figura 5.13. Formación de NO ₂ Tyr y DiTyr por reacción entre tirosina y ONOO ⁻ en presencia de HemHSA y HSA.....	67
Figura 5.14. Formación de NO ₂ Tyr en muestras de HSA y HemHSA tratadas con ONOO ⁻	69
Figura 6.1. Estructura cristalográfica de la albúmina humana con hemina como ligando.....	90
Figura 6.2. Mecanismos implicados en la toxicidad de la hemina libre durante hemólisis intravascular severa.....	93

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
BTBE	<i>N</i> - <i>t</i> -BOC <i>tert</i> -butil éster L-tirosina
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
Cit	Citrato
CO_2	Dióxido de carbono
$\text{CO}_3^{\bullet-}$	Anión radical carbonato
Cu	Cobre
DiTyr	3,3'-ditirosina
DMT-1	Transportador de metales divalentes 1
DOPA	3-hidroxitirosina (3,4-dihidroxifenilalanina)
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fe	Hierro
$\text{Fe}^{4+}=\text{O}$	Oxo-ferrilo
Glut	Glutamato
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
H_2O	Agua
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteína de alta densidad
Hem	Hemina
HemHSA	Hemina-Albúmina
His	Histidina
HSA	Albúmina sérica humana
KPi	Buffer fosfato de potasio
LDL	Lipoproteína de baja densidad
$\text{LO}^{\bullet}$	Radical alcóxido lipídico
$\text{LOO}^{\bullet}$	Radical peróxido lipídico
Lys	Lisina
$\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$	Complejo oxo-metálico
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
MnP	Porfirina de manganeso

MnTBAP	Mn(III) tetrakis(4-Ácido benzoico) porfirina
MnTE-2-PyP	Mn(III) <i>meso</i> -tetrakis(N-etil-2-piridil)porfirina
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
•NO	Óxido nítrico
•NO ₂	Dióxido de nitrógeno
-NO ₂	Grupo nitro
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₂ ⁺	Nitronio
NO ₂ Tyr	3-nitrotirosina
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ^{•-}	Anión radical superóxido
•OH	Radical hidroxilo
OH ⁻	Ion hidroxilo
-OH	Grupo hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOOCO ₂ ⁻	Nitrosoperoxocarboxilato
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PC	Fosfatidilcolina
p-HPA	Ácido <i>para</i> -hidroxifenilacético
Prx	Peroxirredoxina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
-S ⁻	Grupo tiolato
-SH	Grupo sulfhidrilo
SOD	Superóxido dismutasa
-SOH	Grupo ácido sulfénico
-S-S-	Enlace disulfuro
TNM	Tetranitrometano
Tyr	Tirosina
Tyr [•]	Radical tirosilo
Zn	Zinc

1. Resumen

La nitración de residuos de tirosina proteicos a 3-nitrotirosina (NO_2Tyr) es una modificación postraducciona oxidativa relativamente selectiva que ocurre *in vivo* por acción de especies reactivas del nitrógeno formadas como productos secundarios del metabolismo del óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) en presencia de oxidantes. La generación basal de especies oxidantes y nitrantes resulta en la presencia de niveles bajos de proteínas nitradas bajo condiciones normales; sin embargo, en situaciones patológicas asociadas con estrés nitro-oxidativo, como en desórdenes inflamatorios, existe un incremento muy significativo en los niveles de NO_2Tyr detectados. El principal interés de esta modificación postraducciona radica en que es capaz de alterar la estructura y función de las proteínas, pudiendo llevar a una pérdida o a una ganancia de función.

Uno de los principales agentes biológicos responsables de la nitración de tirosina *in vivo* es el peroxinitrito (ONOO^-), un potente oxidante formado por la reacción controlada por difusión entre el $\bullet\text{NO}$ y el radical anión superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$). Este oxidante es capaz de llevar a la formación de NO_2Tyr a través de la generación de especies oxidantes secundarias, como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el radical carbonato ($\text{CO}_3\bullet^-$), complejos oxo-metálicos ($\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$), que son capaces de oxidar a la tirosina por un electrón a radical tirosilo ($\text{Tyr}\bullet$), que luego podrá recombinar con el $\bullet\text{NO}_2$ para producir NO_2Tyr . Con esta recombinación compite la reacción entre dos $\text{Tyr}\bullet$ para formar el producto secundario 3,3'-ditirosina (DiTyr) o la formación de 3-hidroxitirosina (DOPA) por acción del $\bullet\text{OH}$.

En este trabajo se evaluó la capacidad de diversos complejos de bajo peso molecular de metales de transición (Fe^{3+} , Mn^{3+} y Cu^{2+}) de promover la oxidación y nitración de tirosina por ONOO^- en solución acuosa. En presencia de distintas concentraciones de los complejos FeEDTA , MnTBAP , MnTE-2-PyP y Hemina, los niveles de NO_2Tyr formada tras la reacción entre la Tyr y el ONOO^- presentaron un incremento importante, alcanzando rendimientos máximos de un 45%. En todo momento, se detectaron niveles importantes de DiTyr , indicando que la catálisis mediada por el metal ocurre por una vía radicalar; además, en presencia de dichos complejos metálicos, se inhibió la formación de DOPA a pH ácido, indicando un mecanismo de nitración independiente de la formación de $\bullet\text{OH}$. Por lo tanto, la capacidad de dichos metales de favorecer la nitración y oxidación de tirosina implica la generación de las especies $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$ y $\bullet\text{NO}_2$ por reacción directa entre el ONOO^- y el metal, que median la generación de $\text{Tyr}\bullet$ que luego reaccionará con el $\bullet\text{NO}_2$ para generar la NO_2Tyr , en rendimientos mayores que

los obtenidos a partir de radicales derivados de la homólisis espontánea del ONOO⁻.

De los complejos metálicos mencionados, se destaca por su relevancia biológica la hemina, que en fase acuosa produjo un aumento de los rendimientos de nitración de un 9% a un 17% en fase acuosa. Dicho efecto fue mucho menos marcado cuando la hemina se encontraba unida a la albúmina humana. Resultados previos demostraron que en liposomas de fosfatidilcolina el efecto de la hemina es aun más pronunciado, incrementando los rendimientos de nitración de un 3% a un 15%. Este efecto constituiría un nuevo mecanismo de toxicidad de la hemina libre, particularmente relevante en situaciones patológicas que cursan con la liberación de grandes cantidades de hemina al plasma tales como anemias hemolíticas o hemorragias, procesos asociados a daño nitro-oxidativo.

2. Introducción

2.1. La tirosina: propiedades fisicoquímicas, metabolismo y funciones biológicas

La tirosina (Tyr; Y) es uno de los veinte aminoácidos estándar encontrados en las proteínas (Figura 2.1). Posee una cadena lateral aromática (grupo fenol), lo que resulta en que el aminoácido sea relativamente apolar y pueda participar en interacciones hidrofóbicas. A su vez, el grupo hidroxilo del grupo fenol puede formar puentes de hidrógeno y constituye un grupo funcional importante en algunas enzimas. Además de poseer los grupos funcionales ionizables característicos de los aminoácidos (grupos α -amino y α -carboxilo), el grupo fenol de su cadena lateral puede desprotonarse y encontrarse como fenolato, aportando una carga negativa extra. El alto valor de pK_a de este grupo (aproximadamente 10,1 para la tirosina libre, puede variar en el contexto de una proteína) determina que en condiciones biológicas prácticamente no se encuentre ionizado. Su presencia en las proteínas es de aproximadamente un 3,2 %. Posee un índice hidropático de -1,3 (un valor negativo predice la tendencia de los aminoácidos a buscar un ambiente acuoso), lo que determina que dentro de las proteínas, los residuos de tirosina puedan encontrarse tanto expuestos al solvente como en zonas menos expuestas. Debido a su cadena lateral aromática, la tirosina absorbe luz ultravioleta, con un valor máximo de absorción a longitudes de onda cercanas a los 280 nm; contribuye así, junto al triptófano, a la fuerte absorción de luz característica de las proteínas a dicha longitud de onda (Figura 2.1) [1].

El grupo fenol le otorga a la tirosina dos roles especiales que contribuyen a la funcionalidad de varias proteínas: en primer lugar, puede recibir grupos fosfato por medio de las proteínas quinasa específicas de tirosina; por otro lado, los residuos de tirosina pueden participar en procesos de transferencia electrónica, en donde se forma como intermediario un radical tirosilo ($\text{Tyr}^\bullet$) tras la oxidación monoelectrónica del aminoácido ($E^\circ_{\text{TyrO}^\bullet/\text{TyrOH}} = + 0,94 \text{ V}$ a pH 7) [2]. La respuesta celular a numerosas proteínas de señalización extracelulares involucra la fosforilación de residuos de tirosina de ciertas proteínas. Ejemplos de esto son las vías de señalización desencadenadas por factores tales como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros. Los receptores de membrana de estos mensajeros poseen dominios intracelulares con actividad tirosina quinasa (se llaman por esto receptores

tirosina quinasa), que derivan en la fosforilación de residuos de tirosina del propio receptor tras la unión del ligando. El reconocimiento de dichos residuos de tirosina fosforilados por proteínas especializadas continúa con el proceso de señalización [3]. El radical tirosilo ha sido identificado como el sitio catalítico o el cofactor de ciertas enzimas, como son el fotosistema II, la ribonucleótido reductasa, la prostaglandina H sintasa y la DNA fotoliasa [4].

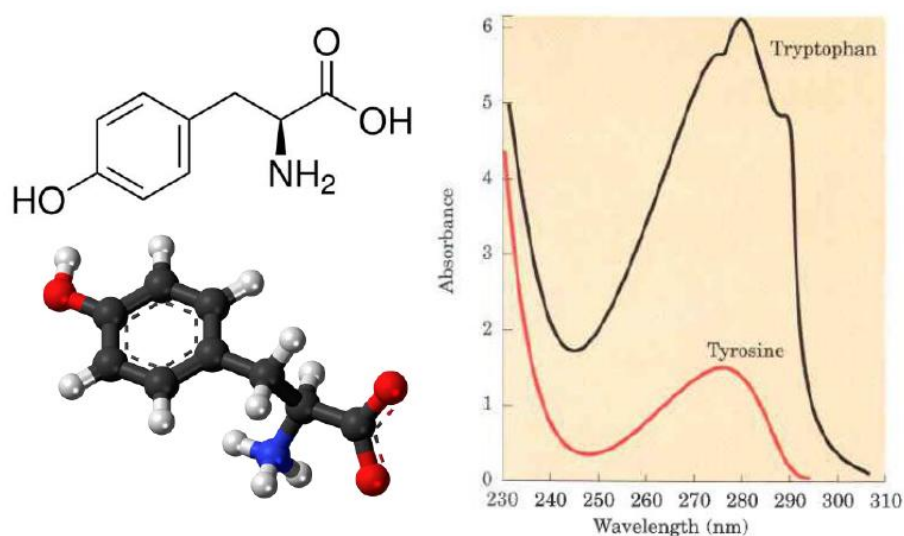


Figura 2.1. Estructura y propiedades espectrofotométricas de la tirosina. Se muestra a la izquierda la estructura de la tirosina en representación bidimensional (arriba) y tridimensional en la forma zwitteriónica (abajo). Se representa en gris los átomos de carbono, en blanco los átomos de hidrógeno, en rojo los átomos de oxígeno y en azul los átomos de nitrógeno. A la derecha se representa la absorción de luz UV por parte de los aminoácidos tirosina y triptófano a pH 6,0 [1].

La tirosina se sintetiza endógenamente a partir de la fenilalanina mediante la reacción catalizada por la fenilalanina hidroxilasa. Así, mientras la fenilalanina es un aminoácido nutricionalmente esencial, la tirosina no lo es (siempre que la dieta aporte cantidades adecuadas de fenilalanina). La reacción de biosíntesis involucra la incorporación de un átomo de oxígeno molecular en la posición *para* del anillo aromático de la fenilalanina, mientras que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua. El poder reductor provisto en última instancia por NADPH, es inmediatamente aportado en forma de tetrahidrobiopterina. Las vías de degradación del esqueleto carbonado de la tirosina generan como producto final acetyl-CoA [5].

Además de su papel como aminoácido constituyente de las proteínas (donde algunas de sus funciones especiales ya fueron mencionadas), en mamíferos, la

tirosina es un precursor de moléculas bioactivas de funcionalidad diversa, como son las catecolaminas, las melaninas y las hormonas tiroideas. Las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) son aminos biógenas derivadas de la descarboxilación de la tirosina que actúan como hormonas y neurotransmisores. Las melaninas son polímeros de catabolitos de la tirosina que constituyen unos de los principales pigmentos presentes en animales. Las hormonas tiroideas (triiodotironina y tiroxina) regulan la expresión génica, la diferenciación celular y el desarrollo general, y son sintetizadas a partir de los múltiples residuos de tirosina de una proteína llamada tiroglobulina, que actúan como sitios de incorporación de yodo [1, 5].

2.2. Nitración de tirosina como modificación oxidativa postraduccional

2.2.1. Antecedentes

Durante la primera mitad del siglo XX, diversos estudios fueron realizados acerca de la reacción de proteínas con el reactivo nitrante tetranitrometano (TNM), en los cuales se observó un efecto en las propiedades biológicas de las proteínas estudiadas tras la reacción. Sin embargo, en ese entonces no se había identificado aun que grupos funcionales de las proteínas podrían reaccionar y cuál sería la naturaleza de los productos formados. Hacia la década de los 60', trabajos realizados por Riordan, Sokolovsky y Vallee examinaron la reacción del TNM con tirosina y demostraron la introducción de un residuo nitro en al anillo aromático en posición *orto* respecto al grupo hidroxilo fenólico, formándose 3-nitrotirosina ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$). Habiendo demostrado entonces que los residuos de tirosina son los afectados, establecieron las condiciones óptimas para la nitración de los residuos de tirosina en proteínas por TNM como método de estudio para especificar la participación de los residuos de tirosina en la estructura y función de las proteínas [6].

Un hallazgo sorprendente a mediados de la década de 1980 fue el papel del radical libre óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), previamente conocido principalmente como un contaminante atmosférico, como un importante mensajero biológico, tanto en animales como en plantas. Esta sencilla sustancia gaseosa difunde fácilmente a través de las membranas, pero sólo actúa localmente debido a que en el espacio extracelular su vida media es muy corta (entre 5 a 10 segundos) transformándose en nitrato y nitrito al combinarse con oxígeno y agua. El $\bullet\text{NO}$ participa en los seres humanos en una amplia gama de procesos fisiológicos, dentro de los que se incluyen la neurotransmisión, la coagulación sanguínea y el

control de la presión sanguínea. Su mecanismo de acción implica su interacción con un átomo de hierro del sitio activo de la enzima guanilato ciclasa, estimulándola para producir el mediador intracelular GMP cíclico. La síntesis del $\bullet\text{NO}$ ocurre a partir del aminoácido arginina, en una reacción dependiente de NADPH catalizada por la óxido nítrico sintasa. La reacción es una oxidación de cinco electrones [1,3]. Estos descubrimientos se iniciaron a partir de la identificación de que el $\bullet\text{NO}$ era el llamado factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), nombre que se le había dado al mediador químico liberado por el endotelio responsable de producir la relajación del músculo liso asociado a los vasos sanguíneos. En estudios previos, un hecho notable que se había observado era la influencia de la tensión de oxígeno en la estabilidad del EDRF: altos niveles de oxígeno facilitaban su inactivación, mientras que a bajas tensiones de oxígeno su estabilidad se veía aumentada. Este efecto del oxígeno fue atribuido al radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), pues su generación aumenta cuando los niveles de oxígeno son mayores, porque resultados similares de inactivación del EDRF se obtuvieron en experimentos en que se utilizó Pyrogallol, un generador de superóxido a partir de oxígeno en soluciones acuosas y finalmente porque la vida media del EDRF se veía aumentada cuando se incluía en los experimentos la enzima superóxido dismutasa (SOD), para acelerar la dismutación del superóxido [7]. Una vez que la naturaleza química del EDRF fue elucidada, pudo proponerse una explicación para el efecto observado del $\text{O}_2^{\bullet-}$ sobre la vida media del mencionado factor. Unos pocos años antes, estudios de química inorgánica habían demostrado que el $\bullet\text{NO}$ y el $\text{O}_2^{\bullet-}$, especies radicalares conteniendo un electrón desapareado, podían reaccionar para formar el anión peroxinitrito (ONOO^-), mediante una reacción de acoplamiento radical-radical que genera un producto diamagnético [8]. De esta manera, era a través de esta reacción que la vida media del EDRF se veía disminuida frente a la adición de $\text{O}_2^{\bullet-}$, al tiempo que frente al agregado de SOD, su vida media se prolongaba.

A comienzos de la década de 1990, empezaron a realizarse una serie de investigaciones centradas en este nuevo producto de formación endógena, que pusieron pronto en evidencia su gran potencial citotóxico. Inicialmente fue estudiada la descomposición por homólisis del ácido peroxinitroso (ONOOH , forma protonada del ONOO^-), la cual resultó en la producción aparente de radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), capaz de oxidar sustratos como el dimetilsulfóxido o la desoxirribosa, así como también en la producción del radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$). Con estos resultados, comenzó a pensarse en el ONOO^- como un posible partícipe del daño endotelial [9]. Posteriormente, se demostró que el ONOOH era capaz de iniciar reacciones de peroxidación lipídica en liposomas, sin

requerir para esto de hierro [10], así como también la capacidad del ONOO^- para oxidar grupos sulfhidrilo ($-\text{SH}$) de proteínas o no proteicos, con constantes de velocidad tres órdenes de magnitud mayores que las reportadas para la reacción de sulfhidrilos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a pH fisiológico [11]. Poco más de un año después, uno de los efectos de mayor relevancia producidos por el ONOO^- fue descubierto. Mientras estudiaban las reacciones de $\bullet\text{NO}$ con $\text{O}_2\bullet^-$ en presencia de cobre, zinc-superóxido dismutasa (Cu, Zn SOD) bovina, Ischiropoulos y colaboradores encontraron que se formaba un aducto amarillo estable de la SOD a valores de pH neutro a alcalino. La cristalización de dicho aducto reveló por difracción de rayos X un aumento claro en la densidad electrónica en la posición *orto* del residuo de tirosina 108 de la enzima, localizado a 18 Å del átomo de Cu en el sitio activo. Mediante diversos enfoques experimentales, demostraron que dicho aumento en la densidad electrónica se debía a la incorporación de un residuo nitro ($-\text{NO}_2$) en la posición orto del anillo fenólico de la tirosina, llevando a la formación de 3-nitrotirosina. Además de causar la nitración de residuos de tirosina de la Cu, Zn SOD, encontraron también que el ONOO^- era capaz de causar la nitración de otras metaloenzimas, como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y la hierro superóxido dismutasa (FeSOD), las cuales resultaban además inactivadas tras la reacción con ONOO^- . Vieron también que la nitración de la Cu, Zn SOD estaba inhibida en presencia de fenol, el cual resultaba nitrado en su lugar, indicando que el ONOO^- también era capaz de nitrar otros compuestos fenólicos [12]. Junto con dichos descubrimientos, el mismo grupo de investigadores publicó en simultáneo otros resultados relacionados y de gran relevancia. En uno de ellos, continuaron profundizando sobre las reacciones de nitración por ONOO^- catalizada por Cu, Zn SOD, encontrando también que complejos metálicos de bajo peso molecular (Fe^{3+} EDTA) también eran capaces de catalizar la nitración de un gran número de compuestos fenólicos, incluyendo los residuos de tirosina en proteínas. Además, determinaron las constantes de velocidad de la reacción entre ONOO^- con ambos compuestos catalizadores y propusieron que la reacción de nitración observada estaría mediada por un mecanismo no radicalar [13]. En el otro trabajo relacionado, utilizan los conocimientos obtenidos en las publicaciones ya mencionadas para demostrar la formación de peroxinitrito en macrófagos alveolares de rata estimulados, consiguiendo así la primera evidencia de la formación de ONOO^- en un sistema biológico. Dado que ya se conocía que los macrófagos estimulados podían generar simultáneamente superóxido y óxido nítrico, los autores propusieron que se formaría en dichos tipos celulares ONOO^- , lo cual consiguieron probar al ver como los macrófagos estimulados eran capaz

de nitrar al ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA, un compuesto fenólico que ya habían visto que se nitraba por ONOO⁻) en presencia de Cu, Zn SOD [14].

A partir de ese momento, comenzó a establecerse el concepto de que intermediarios oxidantes producidos endógenamente podrían promover la nitración *in vivo* de distintas biomoléculas [15], reconociéndose así una modificación postraducciona oxidativa adicional en proteínas [2]. Dado que a principios del siglo XX se apreció que la reacción de proteínas con TNM resultaba en una alteración de las propiedades biológicas de las mismas (lo que Sokolovsky *et al.* demostraron más tarde que se debía a la nitración de residuos de tirosina) [6], esta modificación postraducciona comenzó a atraer un interés considerable al ser capaz de alterar la función de proteínas, pudiendo asociarse a estados de enfermedades agudos y crónicos y funcionar como un indicador de riesgo de enfermedad [15]. Comenzaron por esto a realizarse un gran número de estudios relacionados a esta modificación de residuos de tirosina, que llevaron a la caracterización de los mecanismos que llevan a la misma, a la identificación de un gran número de proteínas que resultan nitradas *in vitro* e *in vivo*, así como también a la asociación de esta modificación postraducciona con diversos estados fisiopatológicos.

2.2.2. Propiedades de la 3-nitrotirosina y consecuencias biológicas de su formación

La incorporación de un grupo nitro (-NO₂) en el carbono 3 del anillo fenólico de la tirosina produce cambios en ciertas propiedades clave de dicho aminoácido. Un efecto muy importante que genera la nitración es un descenso considerable en el valor de pKa del grupo -OH fenólico, de aproximadamente tres unidades de pH (desde entre 10-10,3 a 7,2-7,5 para tirosina libre y 3-nitrotirosina en agua, respectivamente). Estos valores varían en mayor o menor medida para residuos de tirosina y nitrotirosina dentro de proteínas, donde la polaridad del medio y los aminoácidos próximos en la proteína tienen un efecto directo sobre el pKa del hidroxilo fenólico. La nitración también aumenta la hidrofobicidad del residuo de tirosina, lo que hace del residuo de tirosina nitrado más propenso a moverse hacia regiones más hidrofóbicas dentro de la estructura de la proteína. Este aumento en la hidrofobicidad puede verse atenuado debido a que, al disminuir el pKa del -OH fenólico a aproximadamente 7.5, aumentará la cantidad de grupos fenol que se encuentren disociados (en forma de fenolatos) a pH fisiológico, aportando esto una carga negativa extra a la molécula de

nitrotirosina. Además de estos efectos mencionados, la incorporación de un grupo nitro puede adicionar restricciones estéricas no presentes en el residuo de tirosina, dado que el grupo nitro constituye un grupo relativamente voluminoso (el área superficial del grupo fenol es de unos $30 \text{ \AA}^2$, mientras que el del anillo nitrado es de unos $50 \text{ \AA}^2$). En conjunto, la nitración del anillo fenólico de la tirosina puede crear restricciones estéricas locales, disparar cambios conformacionales de la proteína e impedir la fosforilación de la tirosina. Además, el potencial de reducción estándar del par radical nitrotirosilo/nitrotirosina es unos 0.2 a 0.3 V más positivo que el del par radical tirosilo/tirosina, lo que es capaz de alterar los procesos de transferencia electrónica intramoleculares dependientes de tirosina en proteínas [2, 16]. Las propiedades espectroscópicas de la tirosina también se ven afectadas tras la nitración. La nitrotirosina presenta a valores de pH ácidos ($\text{pH} < 6$) un máximo relativo de absorción a 357-360 nm; dicho máximo se desplaza a 427-430 nm en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 8$), dándole un color amarillo [17]. La Figura 2.2 muestra la estructura de la 3-nitrotirosina, la disociación del grupo fenol y las propiedades espectrales de la misma.

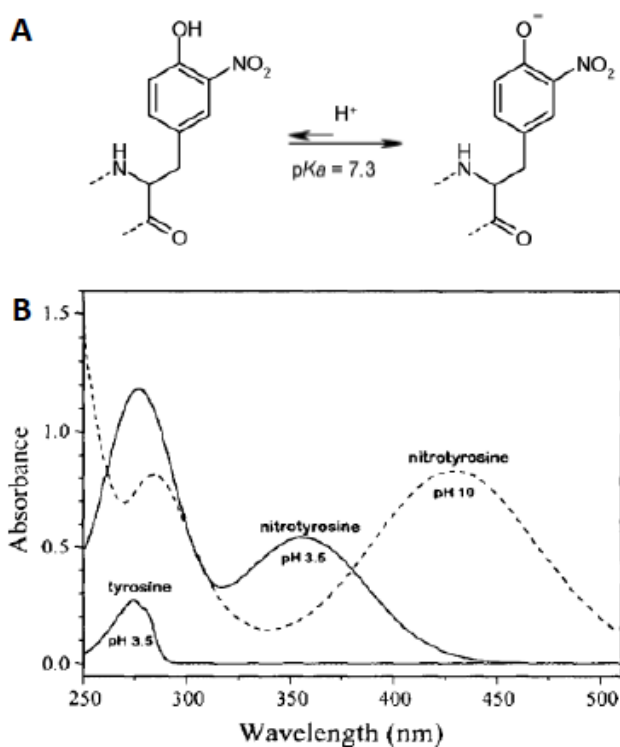


Figura 2.2. Estructura de la 3-nitrotirosina y propiedades espectrofotométricas. (A) Se muestra la estructura de la NO_2Tyr , así como la disociación de su grupo fenol, que presenta un valor de pK_a de 7,3 aproximadamente [2]. (B) Espectros en el intervalo UV-Visible de la NO_2Tyr a pH ácido y alcalino, y su comparación con el espectro de la tirosina a pH ácido [18].

Como consecuencia de la nitración de tirosina, pueden presentarse tres efectos principales sobre la función de las proteínas: (1) que no ocurran efectos en la función de la proteína, (2) que ocurra una pérdida de función, y (3) que se presente una ganancia de función. Los ejemplos reportados en la literatura acerca de la primera opción son escasos; algunos casos identificados son el de las proteínas plasmáticas α 1-antiquimotripsina y la transferrina, cuya función no resulta modificada apreciablemente tras la nitración de tirosina. La pérdida de función de proteínas tras experimentar nitración en alguno de sus residuos de tirosina ha sido ampliamente estudiada, existiendo en la literatura un gran número de ejemplos de estos casos. Un ejemplo destacado constituye la inactivación de la MnSOD por nitración de un residuo de tirosina clave de la misma [16]. A pesar de que dicha enzima contiene nueve residuos de tirosina por monómero (la proteína es un homotetrámero), su nitración dependiente de peroxinitrito ocurre de manera sitio-específica en la tirosina 34, que se ubica a 5 Å del sitio activo, mediante un proceso catalizado por el átomo de manganeso. La nitración de la tirosina 34 lleva a la inactivación de la enzima al generar una gran barrera energética para la entrada del $O_2^{\bullet-}$ al sitio activo de la misma, debido tanto a la restricción estérica que impone el grupo $-NO_2$ como a la carga negativa que se origina tras la disociación del $-OH$ fenólico de la tirosina luego de su modificación a nitrotirosina (Figura 2.3) [2]. Si bien en el caso de la MnSOD está claramente identificado que la pérdida de función ocurre por la nitración de la tirosina 34, hay que tener en cuenta que la presencia de residuos de 3-nitrotirosina en una proteína no es necesariamente la causa de la pérdida de función, dado que todos los agentes nitrantes biológicos son también capaces de oxidar otros residuos de las proteínas, como la cisteína y la metionina [16].

Una perspectiva alternativa a la mencionada anteriormente es la ganancia de función que ciertas proteínas experimentan luego de la nitración de residuos de tirosina. Esto implica el aumento o la aparición de una cierta función luego de que la proteína resulta nitrada y permitiría potencialmente que una pequeña fracción de proteína nitrada tenga un efecto biológico significativo. Algunos ejemplos reportados de esta situación incluyen al citocromo c, al fibrinógeno, la proteína quinasa C ϵ , glutatión S-transferasa 1 microsomal y α -sinucleína. En su estado nativo, el citocromo c experimenta una transición alcalina que rompe el sexto enlace de coordinación que forma el grupo hemo con un residuo de metionina a valores de pH alcalinos (por encima de pH 9). En cambio, las especies mono-nitradas del citocromo c desarrollan una transición alcalina temprana a valores de pH neutro, obteniendo de esta manera una actividad peroxidasa en condiciones fisiológicas. De este modo, unas pocas moléculas de

citocromo c nitrado podrían tener un gran impacto en el estado redox celular al poder inducir la oxidación de fosfolípidos de membrana u otros componentes mitocondriales [16]. Ejemplos de algunas proteínas que cambian su actividad luego de sufrir la nitración de residuos de tirosina se presentan en la Tabla 1.

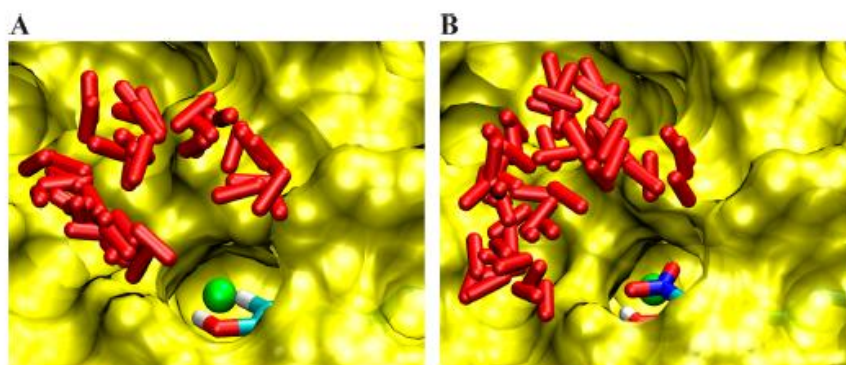


Figura 2.3. Inactivación de la MnSOD por nitración de la tirosina 34. La imagen representa una vista esquemática del canal de acceso del superóxido (bastones rojos) al sitio activo de la enzima, donde se ubica el átomo de manganeso (verde) y la Tyr34 (representada en bastones). La superficie de la enzima se muestra en amarillo. **(A)** En estado nativo, el superóxido puede acceder al átomo de manganeso a través del canal. **(B)** Cuando la tirosina 34 de la MnSOD se encuentra nitrada, el grupo $-\text{NO}_2$ bloquea el canal de acceso al átomo de manganeso, al tiempo que favorece la ionización del grupo hidroxilo fenólico de la tirosina a pH fisiológico; esto impide la entrada del superóxido al sitio activo por restricciones estéricas y repulsión electrostática [19].

El efecto de la nitración de tirosina sobre las cascadas de fosforilación de tirosina aún no se encuentra claramente detallado. Por un lado, se demostró en estudios que la nitración de tirosina de sustratos de tirosina quinasas disminuyó la tasa de fosforilación. Esto fue atribuido al hecho de que las tirosina quinasas utilizan como sustrato el grupo fenol de la tirosina en estado neutro, y tras la nitración, producto del descenso del pK_a , la tirosina se encuentre con mayor frecuencia como fenolato. Sin embargo, en estudios a nivel celular, se obtuvieron resultados que demuestran lo contrario: la fosforilación de tirosina es potenciada luego del tratamiento con peroxinitrito. Otra consecuencia que podría provocar la nitración de residuos de tirosina de una cierta proteína es la generación de una respuesta inmunológica dirigida contra dicha proteína modificada. De hecho, se han identificado inmunoglobulinas contra 3-nitrotirosina en plasma de pacientes con lesión pulmonar aguda postraumática [16].

Tabla I. Ejemplo de proteínas que cambian su actividad tras experimentar nitración de residuos de tirosina [16].

Proteína	Función Normal	Efecto de la Nitración	Ref.
Citocromo c	Transferencia de electrones y Apoptosis	Actividad peroxidasa aumentada; disminución de la activación del apoptosoma	[20, 21] [22]
Fibrinógeno	Coagulación	Mayor agregación	[23]
Proteína quinasa C ϵ	Quinasa de Serina/Treonina	Translocación y activación	[24]
Glutathión S-transferasa 1	Actividad GSH peroxidasa	Mayor actividad	[25]
α -Sinucleína	Proteína presináptica	Mayor agregación	[26]
Neurofilamento L	Estructura Axonal	Inhibición del ensamblaje del neurofilamento	[27]
Factor de crecimiento nervioso	Factor Neurotrófico	Apoptosis neuronal	[28]
Prostaciclina sintasa	Síntesis de prostaciclina	Disminución de la actividad	[29]
Tirosina hidroxilasa	Síntesis de L-DOPA	Disminución de la actividad	[30]
PGH sintasa	Síntesis de PGH ₂	Disminución de la actividad	[31]
Glutamina sintetasa	Condensación de glutamato y amonio	Inhibición similar a la enzima adenilada	[32]
Ribonucleótido reductasa	Reducción de ribonucleótidos	Disminución de la actividad	[33]
Glutathión reductasa	Reducción de GSSG	Disminución de la actividad	[34]
Citocromo P450 2B1	Metabolismo de xenobióticos	Disminución de la actividad	[35]
Ornitina descarboxilasa	Síntesis de putrescina	Disminución de la actividad	[36]
Proteína quinasa C	Quinasa de Serina/Treonina	Disminución de la actividad	[37]
Succinil-CoA:3-oxoácido CoA-transferasa	Formación de Acetoacetyl-CoA	Disminución de la actividad	[38]

2.2.3. Niveles de nitración de tirosina y su relación con enfermedades

Estudios basados en proteómica han revelado que ciertas proteínas son preferencialmente nitradas *in vivo*, y que dentro de dichas proteínas uno o como mucho unos pocos residuos de tirosina son nitrados. Aun no se han establecido completamente los determinantes de estos fenómenos, pero dependen de tres factores principales: a) la estructura proteica, b) el mecanismo de nitración, y c) el ambiente en el cual se localiza la proteína. En particular, respecto a la estructura de la proteína, la información disponible indica que algunos factores que favorecen la nitración son la presencia de un aminoácido ácido cercano a la tirosina, la localización de un residuo de tirosina en una estructura en lazo y la presencia cercana de centros de metales de transición y sitios de unión para hemoperoxidasas. La presencia de aminoácidos como cisteína, metionina y triptófano, que compiten por las especies nitrantes, podrían ser inhibidores de la nitración de residuos de tirosina [39].

En condiciones normales, es posible detectar bajos niveles de 3-nitrotirosina libre o unida a proteínas, lo cual refleja el bajo estado estacionario de especies oxidantes y nitrantes producidas bajo condiciones basales. En situaciones patológicas asociadas con estrés nitro-oxidativo, hay un aumento significativo en los niveles de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$. Algunas de las condiciones patológicas en las que se han identificado niveles elevados de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ incluyen desórdenes inflamatorios, neurodegenerativos y cardiovasculares, entre otros [16]. Un claro ejemplo de esto y de gran importancia biomédica lo constituye el caso de la Apolipoproteína A-I (apoA-I), la principal proteína presente en la lipoproteína de alta densidad (HDL). La HDL juega un rol principal en el transporte reverso de colesterol y niveles elevados de la misma poseen un carácter protector contra ciertas enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se ha propuesto que la HDL carece de dichos efectos cardioprotectores o se encuentra disfuncional en sujetos con aterosclerosis, lo que podría deberse a la modificación oxidativa de la HDL en la pared arterial. De hecho, estudios *in vitro* demostraron que la apoA-I pierde su actividad tras sufrir modificaciones como nitración y cloración de residuos de tirosina. En plasma de pacientes sanos, se observó la formación basal de 3-nitrotirosina en diversos residuos de tirosina de la apoA-I, alcanzando unos niveles totales de nitración de aproximadamente $19 \mu\text{mol NO}_2\text{-Tyr/mol Tyr}$. Sin embargo, se encontraron niveles de nitración notablemente mayores de la apoA-I en HDL aislada de muestras de tejido aterosclerótico humano; en dichas muestras, los niveles de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ totales presentes en la apoA-I fueron unas trece veces más elevados que los niveles totales encontrados en la apoA-I de plasma de pacientes. Algo similar se observó para la cloración (incorporación de un átomo de cloro en el anillo aromático de la tirosina, en posición orto respecto al $-\text{OH}$ fenólico) de residuos de tirosina de la apoA-I, cuyos niveles fueron cuatro veces mayores en HDL aislada de tejido aterosclerótico respecto a las HDL plasmáticas de sujetos sanos. Esto apoya la propuesta de que la modificación oxidativa por nitración y cloración de residuos de tirosina de la apoA-I en la pared arterial privaría a la HDL de sus capacidades cardioprotectoras, contribuyendo así al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis [40]. De igual modo, se han encontrado niveles elevados de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ en diversas situaciones fisiopatológicas, como en el fluido cerebroespinal de pacientes que han experimentado stroke lacunar [41] o a nivel sérico en sujetos que presentan encefalopatía hepática mínima secundaria a cirrosis hepática, situación en la cual además la propia medida de los niveles séricos de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ podría ser de utilidad para la identificar pacientes con dicha patología, la cual hasta ahora no puede ser detectada por los análisis de rutina [42]. La Figura 2.4

muestra cómo los niveles de residuos de NO₂Tyr en proteínas se encuentran elevados en cortes de arteria coronaria de pacientes con placas ateroscleróticas respecto a muestras de arteria coronaria no ateroscleróticas [43], lo que constituye un ejemplo de un fenómeno observado en diversas situaciones patológicas.

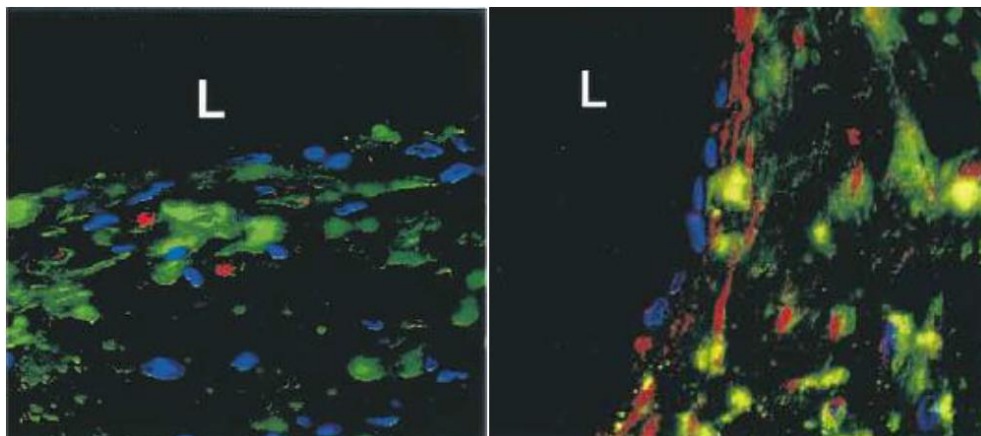


Figura 2.4. Incremento en los niveles de NO₂Tyr en arterias coronarias ateroscleróticas.

Detección por inmunohistoquímica de proteínas con residuos de NO₂Tyr en secciones de arteria coronaria sana (izquierda) y con placa aterosclerótica estable (derecha). Se observa en verde la fibronectina (una glicoproteína de la matriz extracelular del tejido conjuntivo), en rojo la tinción para NO₂Tyr mientras que en azul se ven los núcleos celulares (teñidos con DAPI); en amarillo se representa la superposición de las tinciones para fibronectina y NO₂Tyr. La letra “L” marca la ubicación del lumen del vaso. Se aprecia notablemente como, en arterias coronarias sanas, la inmunoreactividad para NO₂Tyr es apenas detectable, mientras que en arterias con placas ateroscleróticas se detectan niveles importantes de NO₂Tyr [43].

2.3. Agentes oxidantes y nitrantes de relevancia biológica

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas reactivas derivadas del oxígeno molecular que se forman como un subproducto natural del metabolismo aerobio. Actualmente, es ampliamente aceptado el hecho de que las ROS juegan un papel fisiológico crucial no solo en varios estados patológicos sino también en la homeostasis celular. Bajo condiciones normales, las concentraciones de ROS se encuentran estrechamente controladas por moléculas antioxidantes, manteniéndolas en niveles que les permiten participar como segundos mensajeros en la transducción de señales. Sin embargo, cuando se producen excesivamente, o cuando los niveles de antioxidantes se encuentran agotados,

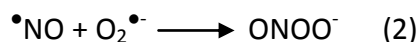
las ROS pueden causar daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las ROS pueden ser tanto de naturaleza radicalar como no radicalar [44].

2.3.1. Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

La formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede considerarse como el paso inicial para la formación subsecuente de otras ROS. Es generado por la reducción monoelectrónica del oxígeno molecular (O_2), y en comparación con otros radicales libres, es una especie poco reactiva. Puede actuar como un agente oxidante ($E^{\circ'}_{\text{O}_2^{\bullet-}, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2} = + 0,94 \text{ V}$) así como también como un agente reductor ($E^{\circ'}_{\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}} = - 0,33 \text{ V}$). Al ser una especie cargada en condiciones fisiológicas ($\text{pK}_a = 4,8$), no puede atravesar libremente las membranas biológicas, aunque puede hacerlo a través de canales aniónicos. El destino del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a nivel celular está determinado principalmente por la actividad de varias enzimas sitio-específicas: la familia de las superóxido dismutasas (SOD), que convierten al superóxido en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [45] (Ec. 1).



La dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\bullet-}$ (es decir, no enzimática) ocurre en medios acuosos a pH neutro con una constante de velocidad del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [46], mientras que la reacción catalizada por las SOD tiene una constante de velocidad de $1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Si bien la constante de velocidad de la dismutación catalizada por las SOD es muy elevada y haría pensar que prácticamente todo el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es consumido por esta reacción, la ya mencionada reacción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ con $\bullet\text{NO}$ posee una constante de velocidad aun mayor (aprox. $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), por lo que el óxido nítrico podría competir en ciertas ocasiones con las SOD por el superóxido [15] (Ec. 2).

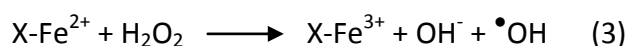


A pesar de ser estas las principales vías de consumo del superóxido, existen otras reacciones directas entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y distintos blancos celulares, capaces de producir daño a biomoléculas. Se destaca dentro de estas la reacción con los centros ferro-sulfurados [4Fe-4S] de deshidratasas como la 6-fosfogluconato deshidratasa y la aconitasa. La oxidación de estas enzimas produce su inactivación y la liberación de un átomo de hierro, capaz también de proseguir con reacciones oxidativas. No obstante, es dando lugar a otros oxidantes más potentes (como H_2O_2 y ONOO^-) que ocurren los principales efectos citotóxicos del superóxido [47].

Los dos sitios principales de formación de superóxido a nivel biológico son la mitocondria y los fagosomas. A nivel mitocondrial, el $O_2^{\bullet-}$ se genera por la reducción monoelectrónica del oxígeno molecular por componentes de la cadena transportadora de electrones. Se da así una producción basal de $O_2^{\bullet-}$, la cual puede incrementarse notablemente bajo una variedad de condiciones patológicas. Dentro de los fagosomas, la producción de superóxido ocurre durante la fagocitosis de un microorganismo invasor por un macrófago o un neutrófilo a través del ensamblaje y activación del complejo NADPH oxidasa (NOX). Este complejo enzimático cataliza la producción de $O_2^{\bullet-}$ a partir de NADPH (que se oxida a $NADP^+$) y O_2 [48].

2.3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 es una ROS pequeña, no radicalar y neutra. A diferencia del $O_2^{\bullet-}$, puede difundir libremente a través de membranas celulares [49]. Es un agente oxidante relativamente débil, con un potencial de reducción estándar de 1.76 V para su reducción por dos electrones a H_2O ($E^{\circ}_{H_2O_2/H_2O} = +1,76$ V). Dado que el enlace O-O se polariza fácilmente, el H_2O_2 posee un cierto carácter electrofílico [50]. A nivel biológico, el peróxido de hidrógeno es capaz de oxidar tioles (-SH), tanto de bajo peso molecular como proteicos, a su respectivo grupo sulfénico (-SOH), capaz de formar rápidamente enlaces disulfuro (-S-S-) en presencia de más grupos -SH [51]. Es también capaz de oxidar metales de transición como hierro (Fe) y manganeso (Mn) en distintos estados de oxidación, formando así especies oxidantes secundarias. Por ejemplo, el H_2O_2 oxida por dos electrones al hierro férrico (Fe^{3+}) de grupos hemo (presentes en hemoproteínas), formando un intermediario oxo-ferrilo ($Fe^{4+}=O$) más un catión radical centrado en la porfirina. En presencia de un estado reducido de dichos metales de transición (ej. Fe^{2+}), el H_2O_2 puede actuar como oxidante por un electrón, descomponiéndose de este modo a un ion hidroxilo (OH^-) más un radical hidroxilo ($\bullet OH$). Esta reacción del H_2O_2 con metales de transición reducidos se conoce como reacción de Fenton (Ec. 3) [15].



Existen diversos mecanismos de descomposición del H_2O_2 a nivel intracelular; las principales vías son las mediadas por catalasas (CAT), peroxirredoxinas (Prx) y glutatión peroxidasa (GPx). Mientras que las primeras catalizan la descomposición de dos moléculas de H_2O_2 a H_2O y O_2 sin necesidad de otros sustratos, las Prx y GPx reducen el peróxido de hidrógeno a H_2O , quedando en un

estado oxidado y precisando de otros sustratos para reducirse a su estado inicial [52]. Además de su papel como oxidante biológico participando en reacciones capaces de generar daño oxidativo, existe evidencia creciente de que a bajos niveles, el H_2O_2 también funciona como un agente señalizador dentro de vías de transducción de señales [53].

2.3.3. Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

El radical hidroxilo es una especie extremadamente reactiva que oxida componentes celulares a través de adición directa, abstracción de átomos de hidrógeno y transferencia electrónica. Un gran número de compuestos biológicamente relevantes exhiben constantes de velocidad de reacción con el $\bullet\text{OH}$ del orden de 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que constituye esencialmente una reactividad limitada por difusión [54]. Es la molécula más oxidante presente en sistemas biológicos ($E^{\circ'}_{\bullet\text{OH}, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}} = + 2,31 \text{ V}$) [55]. Es capaz de oxidar al ácido desoxirribonucleico (ADN), ya sea mediante reacción con las bases nitrogenadas o con el azúcar del nucleótido, pudiendo ocasionar mutaciones genéticas y alteraciones en la transcripción. De igual modo, puede inducir la oxidación lipídica y de proteínas, ya sea a nivel del esqueleto polipeptídico o de las cadenas laterales de los aminoácidos [56]. La gran reactividad del $\bullet\text{OH}$ con la mayoría de las biomoléculas y su mínima capacidad de difundir hacen que no sea selectivo para la modificación de proteínas, salvo que se genere de manera sitio específica dentro de sitios de unión a metales [15].

2.3.4. Óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)

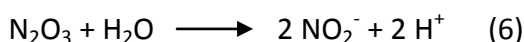
El $\bullet\text{NO}$ es producido por una gran variedad de tipos celulares mediante las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas e inducibles, y como ya fue mencionado, cumple diversos roles fisiológicos como la regulación del tono vascular, neurotransmisión y la modulación de procesos inflamatorios. Sin embargo, la producción excesiva de $\bullet\text{NO}$ es capaz de producir daño tisular. A pesar de ser un radical libre, el óxido nítrico tiene una reactividad selectiva, reaccionando predominantemente con otras especies paramagnéticas como hierro férrico o ferroso en hemoproteínas o centros ferro-sulfurados, oxígeno molecular, anión radical superóxido y radicales lipídicos o proteicos. Su auto-oxidación por reacción con O_2 resulta en la formación de nitrito (NO_2^-) como principal producto final, aunque este no tiende a acumularse debido a que es oxidado a nitrato (NO_3^-) [57]. A pesar de reaccionar directamente con ciertos blancos intracelulares, su principal potencial citotóxico radica en la formación de

especies de mayor reactividad durante su oxidación, principalmente peroxinitrito y radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) [15].

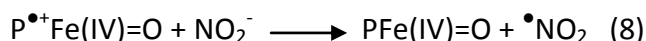
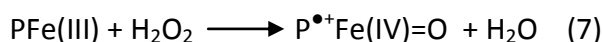
2.3.5. Dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$)

El radical dióxido de nitrógeno es una especie reactiva del nitrógeno que experimenta una variedad de reacciones, que incluyen la recombinación con otras especies radicalares, la adición a dobles enlaces, la transferencia electrónica y la abstracción de átomos de hidrógeno de enlaces carbono-hidrógeno de compuestos insaturados, fenoles y tioles. Las constantes de velocidad de las reacciones de recombinación del $\bullet\text{NO}_2$ con un gran número de radicales libres están cercanas a la limitación por difusión ($k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$); son de particular relevancia las reacciones de recombinación del $\bullet\text{NO}_2$ con radicales lipídicos y proteicos para producir lípidos y proteínas nitradas [58].

El dióxido de nitrógeno puede formarse directamente a partir de la auto-oxidación del $\bullet\text{NO}$, que en última instancia produce nitrito (Ecs. 4-6). Este mecanismo sería fisiológicamente importante solo bajo condiciones de una producción excesiva de $\bullet\text{NO}$, aunque se encuentra significativamente aumentado en entornos hidrofóbicos debido a la mayor solubilidad del óxido nítrico y el oxígeno en dichos ambientes. Otro intermediario reactivo importante que se forma durante estas reacciones es el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), que es considerado como el principal responsable de la nitrosación de biomoléculas mediada por óxido nítrico.



Otro mecanismo de formación de $\bullet\text{NO}_2$ es a partir de la oxidación monoelectrónica del NO_2^- catalizada por diversas hemoperoxidasas en presencia de H_2O_2 (ej. mieloperoxidasa y peroxidasa del eosinófilo) o por sistemas de Fenton (producción de $\bullet\text{OH}$) (Ecs. 7-9 y 10).



Por último, también puede generarse en sistemas biológicos $\bullet\text{NO}_2$ a partir de la descomposición por homólisis del ONOO^- , ya sea mediante su protonación o tras reacción con dióxido de carbono (CO_2) o metales de transición [58].

2.3.6. Peroxinitrito (ONOO^-)

El peroxinitrito es una especie oxidante de corta vida que, como ya se mencionó, se produce por la reacción controlada por difusión entre el $\bullet\text{NO}$ y el $\text{O}_2\bullet^-$ (Ec. 2). El anión ONOO^- es la base conjugada del ácido peroxinitroso (ONOOH); dado que el pK_a para el ONOOH es de 6.8, ambas especies coexisten a pH fisiológico. Tanto el ONOO^- como el ONOOH pueden participar directamente en oxidaciones por uno y dos electrones con biomoléculas, en particular con metales de transición y tioles. Uno de los blancos principales del ONOO^- en sistemas biológicos es el CO_2 , que lleva a la formación del aducto nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO_2^-). Dicho compuesto decae espontáneamente a NO_3^- y CO_2 con la producción de radical anión carbonato ($\text{CO}_3\bullet^-$) y $\bullet\text{NO}_2$ con un rendimiento de aproximadamente 35%, capaces de participar en procesos de oxidación por un electrón. Alternativamente, el ONOOH puede experimentar una ruptura homolítica del enlace O-O (homólisis catalizada por protón del ONOO^-) generando $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ con un rendimiento del 30%, decayendo el resto (70%) a NO_3^- . Sin embargo, esta reacción es lenta ($k = 0.9 \text{ s}^{-1}$ a 37°C y pH 7.4) en comparación con las reacciones directas del ONOO^- y el ONOOH con otros blancos presentes en sistemas biológicos, constituyendo un componente menos relevante de la reactividad *in vivo* del peroxinitrito [59].

Los tioles, tanto de bajo peso molecular como proteicos, son uno de los principales blancos del peroxinitrito. La reacción directa entre estas especies implica un ataque nucleofílico de la forma aniónica del grupo tiol (tiolato, S^-) sobre el ONOOH , que deriva en la reducción de este último por dos electrones a NO_2^- , y transformando al tiol a su respectivo ácido sulfénico (-SOH). Las peroxirredoxinas (Prx), un tipo de peroxidasas dependientes de tioles, presentan las constantes de velocidad de reacción con ONOOH más elevadas; la peroxirredoxina 5 humana, por ejemplo, presenta una constante de velocidad de $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Además de los tioles, los metales de transición también reaccionan rápidamente de manera directa con el peroxinitrito, pudiendo ser oxidados tanto por uno como por dos electrones, con la consecuente reducción del ONOO^- a $\bullet\text{NO}_2$ o a NO_2^- , respectivamente. Son en particular relevantes dentro de este tipo de reacciones las del ONOO^- con hemoproteínas, las cuales son diversas y

difícilmente predecibles. Algunas hemoperoxidasas presentan constantes de velocidad de reacción con peroxinitrito que están dentro de las más elevadas para proteínas ($> 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), pero a pesar de ser proteínas funcionalmente relacionadas, los productos de la reacción son variables (Figura 2.5). Por ejemplo, la enzima prostaglandina endoperoxido H sintasa-1 es oxidada por dos electrones por el peroxinitrito, generando el compuesto I de la peroxidasa (intermediario oxo-ferrilo más un catión radical de la porfirina) y nitrito; sin embargo, la oxidación de la mieloperoxidasa por ONOO⁻ produce el compuesto II de la peroxidasa (intermediario oxo-ferrilo de la porfirina) y radical dióxido de nitrógeno. Algunas hemoproteínas, como la oxihemoglobina y la metahemoglobina, catalizan la isomerización del peroxinitrito a NO₃⁻; incluso, hay algunas hemoproteínas que no reaccionan directamente con el ONOO⁻, como la catalasa y el citocromo c oxidado [48].

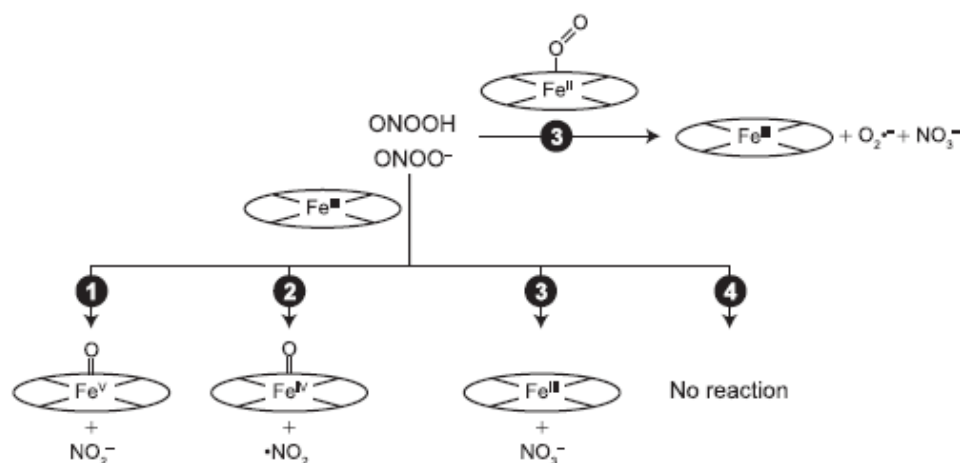


Figura 2.5. Reacciones entre el peroxinitrito y las hemoproteínas. El peroxinitrito es capaz de oxidar por dos electrones (1) o por un electrón (2) a ciertas hemoproteínas. Por el contrario, otras hemoproteínas catalizan la isomerización del peroxinitrito (3), mientras que otras no presentan reacción con el ONOO⁻ a velocidades detectables (4) [48].

Más allá de los blancos mencionados que reaccionan rápidamente de manera directa con el peroxinitrito, numerosas biomoléculas son oxidadas y/o nitradas por los radicales derivados del peroxinitrito, como son los residuos de tirosina, los tioles, el ADN y los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos. Estas modificaciones dependientes de radicales libres derivados del peroxinitrito suelen ser procesos de bajo rendimiento, debido al gran número de reacciones en las que pueden participar especies como el CO₃^{•-} y el •NO₂, y también debido a la existencia de moléculas atrapadoras de los mismos, principalmente de

glutación [59]. A pesar de lo mencionado recién, y a la existencia de numerosos blancos que reaccionan directamente con el peroxinitrito, este tipo de modificaciones por radicales derivados del ONOO^- ocurren *in vivo*. En primer lugar, es importante remarcar que no todas las reacciones directas del ONOO^- lo descomponen a formas no reactivas; tanto la reacción con CO_2 como la reacción con algunas hemoperoxidasas promueve la formación de agentes oxidantes secundarios y otras especies radicalares, capaces de llevar a cabo la modificación de diversas biomoléculas. Además, la mayoría de los blancos “benignos” del peroxinitrito (antioxidantes enzimáticos como las Prxs o no enzimáticos como el glutatión) son hidrofílicos y compartimentalizados, con lo que no pueden alcanzar compartimientos hidrofóbicos; dado que el peroxinitrito puede atravesar membranas biológicas con relativa facilidad, puede llegar a evitar este tipo de antioxidantes al abandonar los compartimientos donde ellos residen. Entonces, en compartimientos de baja concentración de antioxidantes como los fluidos extracelulares o los compartimientos hidrofóbicos, la reacción del ONOO^- con CO_2 e incluso la homólisis catalizada por protón podrían prevalecer, llevando a la formación de radicales oxidantes que producen los efectos ya mencionados [48]. La Figura 2.6 resume las principales vías de reacción del peroxinitrito que ya fueran mencionadas.

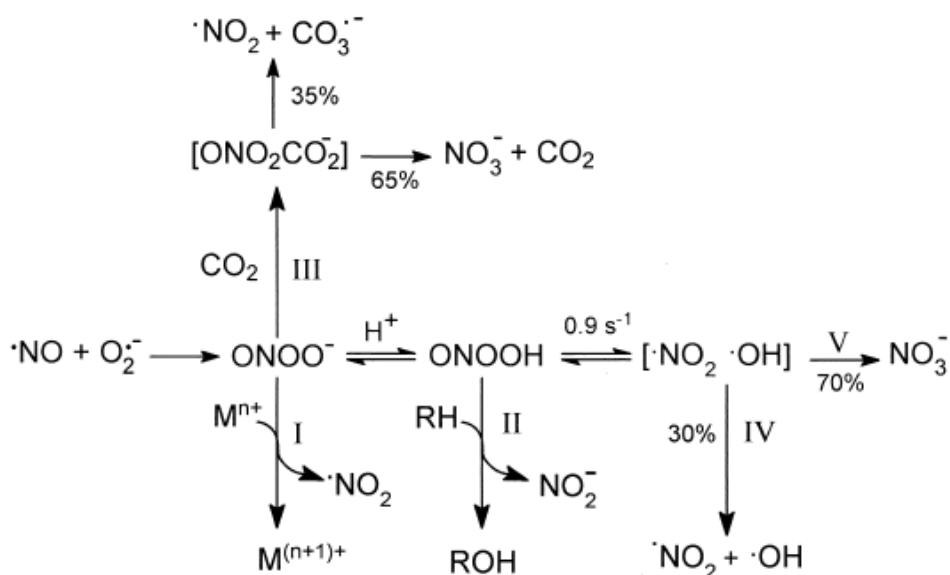


Figura 2.6. Principales vías de reacción del peroxinitrito. Se esquematizan los principales destinos del ONOO^- en sistemas biológicos, que incluyen reacciones directas con diversos blancos, como metales de transición (I), sulfhidrilos y otros grupos oxidables por dos electrones (II) y CO_2 (III), así como la homólisis del ONOOH a radicales secundarios (IV) o a NO_3^- (V) [60].

2.4. Mecanismos de nitración y oxidación de tirosina

Las modificaciones de nitración y oxidación de residuos de tirosina pueden ocurrir en condiciones biológicas por diversas rutas, basadas todas ellas en la química de radicales libres. Dentro de estas, los dos mecanismos de mayor relevancia son los dependientes de ONOO⁻ y los dependientes de hemoperoxidasas. La nitración de tirosina constituye un proceso de dos pasos: el paso inicial consiste en la oxidación del anillo fenólico de la tirosina para generar el producto de oxidación por un electrón, el radical tirosilo; el segundo paso implica la adición del $\bullet\text{NO}_2$ al Tyr $\bullet$ en una reacción de terminación radical-radical. El paso inicial de generación de radical tirosilo puede ser llevado a cabo por diversos oxidantes por un electrón producidos *in vivo*, como CO₃ $\bullet^-$, $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$ o complejos oxo-metálicos (Me⁽ⁿ⁺¹⁾⁺=O), como los generados tras la reacción del ONOO⁻ o el H₂O₂ con diversas hemoperoxidasas. En membranas biológicas o en lipoproteínas, especies oxidantes formadas durante los procesos de lipoperoxidación, como los radicales peroxilo y alcoxilo lipídicos (LOO $\bullet$ y LO $\bullet$), son también capaces de producir la oxidación de tirosina a radical tirosilo.

El ONOO⁻ no reacciona directamente con la tirosina, sino que son los radicales derivados del mismo los que lo hacen (Fig.2.6). Es mediante la generación de estas especies radicalares derivadas que el peroxinitrito es capaz de oxidar y nitrar a los residuos de tirosina, al producir tanto especies capaces de oxidar a la tirosina a radical tirosilo como $\bullet\text{NO}_2$ para reaccionar con el Tyr $\bullet$ generado. El principal mecanismo alternativo de nitración de tirosina es el dependiente de hemoperoxidasas (como la mieloperoxidasa y la peroxidasa del eosinófilo), en presencia de H₂O₂ y NO₂⁻. Como ya fue mencionado, la reacción de las hemoperoxidasas con H₂O₂ genera la oxidación del grupo hemo en el sitio activo al compuesto I de la peroxidasa. Este intermediario es capaz de oxidar por un electrón a la Tyr, generando Tyr $\bullet$, o al NO₂⁻, generando $\bullet\text{NO}_2$. Al llevar a cabo cualquiera de estas oxidaciones, el intermediario evoluciona al compuesto II de la peroxidasa, el cual también puede oxidar por un electrón a la tirosina o al nitrito, regenerándose en esta instancia la hemoperoxidasa en su estado inicial. El nitrito es oxidado más rápido que la tirosina por el compuesto I, mientras que lo contrario se cumple para el compuesto II. Es de este modo que diversas hemoperoxidasas, en presencia de H₂O₂ y NO₂⁻, generan de manera simultánea Tyr $\bullet$ y $\bullet\text{NO}_2$, llevando a la formación de 3-nitrotirosina.

Otra vía alternativa relevante que puede llevar a la nitración de residuos de tirosina, y que supone una alternativa a la adición de $\bullet\text{NO}_2$ que ocurre en el segundo paso de la reacción de nitración, es la reacción del radical tirosilo con

óxido nítrico, formándose el producto 3-nitrosotirosina. Este compuesto puede ser posteriormente oxidado a $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ a través de la formación de un radical iminoxilo, mediante un proceso de oxidación por dos electrones (a través de dos pasos de oxidación por un electrón de la nitrosotirosina), capaz de ser llevado a cabo por hemoperoxidasas y H_2O_2 . Este mecanismo de nitración podría ser muy relevante en condiciones biológicas al no depender de la reacción entre $\bullet\text{NO}_2$ y el radical tirosilo; el radical dióxido de nitrógeno reacciona rápidamente con reductores intracelulares como el glutatión (el cuál alcanza concentraciones del orden de milimolar dentro de las células), entre otros blancos posibles, lo que supone una limitante importante para que se forme el producto nitrado por reacción entre $\text{Tyr}^\bullet$ y $\bullet\text{NO}_2$. Por el contrario, el $\bullet\text{NO}$ es menos reactivo que el $\bullet\text{NO}_2$, no reacciona directamente con el glutatión y presenta una vida media biológica mucho más elevada (>100 ms contra 5-20 μs para el $\bullet\text{NO}_2$), lo cual favorecería su rápida reacción con radicales tirosilo frente a otras reacciones. Independientemente de cuál sea la vía, la nitración de residuos de tirosina *in vivo* siempre depende en última instancia de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}$, ya que los mismos o reaccionan entre sí para formar peroxinitrito o decaen a H_2O_2 y NO_2^- , actuando como sustratos de las hemoperoxidasas.

Además de la nitración de tirosina, reacciones laterales pueden desviar los radicales tirosilo generados de la adición de $\bullet\text{NO}_2$ y conducir a la formación de productos de oxidación secundarios. La más estudiada de estas reacciones es la dimerización a 3,3'-ditirosina (DiTyr). Implica la rápida reacción entre dos radicales tirosilo, y es detectable como subproducto aún en condiciones estequiométricas respecto a las concentraciones del agente oxidante inicial que genera el radical tirosilo y de $\bullet\text{NO}_2$. La proporción en que se forma respecto al evento de oxidación global de tirosina depende principalmente de las concentraciones relativas de Tyr, $\text{Tyr}^\bullet$ y $\bullet\text{NO}_2$ durante la reacción. La capacidad de difusión de los radicales tirosilo también influye sobre la probabilidad de encuentro de dos $\text{Tyr}^\bullet$, por lo que esta reacción sería más importante en fase acuosa que en membranas, donde la capacidad difusional de los radicales tirosilo es considerablemente menor. La presencia en exceso de especies radicalares diferentes al $\bullet\text{NO}_2$ puede llevar a que el radical tirosilo evolucione a derivados de la tirosina sustituidos en la posición 3. Por ejemplo, un exceso de radical hidroxilo presente durante procesos de oxidación de tirosina lleva a la formación del derivado hidroxilado de la tirosina, la 3-hidroxitirosina (DOPA). Las reacciones de nitración de tirosina, así como la formación de los subproductos mencionados, presentan una fuerte dependencia con el pH. Esto se debe en parte a los varios mecanismos posibles en que el peroxinitrito evoluciona a

especies nitrantes (dependiente de H⁺, de CO₂ o de metales de transición), y también al hecho de que los oxidantes por un electrón reaccionan más rápido con la forma disociada de la tirosina (fenolato) [2, 16, 39]. En la Figura 2.7 se esquematizan los mecanismos de nitración y oxidación de tirosina mencionados. La Tabla II presenta los valores de las constantes de velocidad para varias reacciones relevantes que participan en los procesos mencionados.

Si bien en sistemas bioquímicos controlados los mecanismos de nitración de tirosina dependientes de radicales libres están bien elucidados, el problema es más complejo cuando se lo lleva a la situación que ocurre *in vivo*. En sistemas biológicos, los oxidantes se forman en flujo, a diferencia de cómo se los utiliza tradicionalmente en experimentos químicos en los cuales se los agrega en bolo. Además, está el hecho de que la presencia de antioxidantes y de reacciones de reparación de radicales limitan ampliamente las reacciones de nitración. Por ejemplo, el glutatión, presente en concentraciones muy elevadas a nivel intracelular, es capaz de reaccionar con el ONOOH directamente pero también con el radical tirosilo para regenerar la tirosina (reacción de reparación del radical tirosilo) así como con el •NO₂, disminuyendo sus niveles y previniendo así que reaccione con posibles radicales tirosilo formados. No obstante, se ha visto en un gran número de casos la formación de 3-nitrotirosina *in vivo* y como se correlaciona con niveles tisulares de •NO elevados. Estas consideraciones llevan a la búsqueda de posibles explicaciones que permitan, en base a las observaciones experimentales, dar cuenta de la presencia de NO₂-Tyr *in vivo*. Es así que factores tales como la nitración sitio-específica catalizada por metales, la nitración de tirosina a través de la formación de 3-nitrosotirosina y la asociación de proteínas a ambientes hidrofóbicos como membranas biológicas adquieren una relevancia especial al buscar la comprensión de los mecanismos que llevan a la nitración de residuos de tirosina en sistemas biológicos [39].

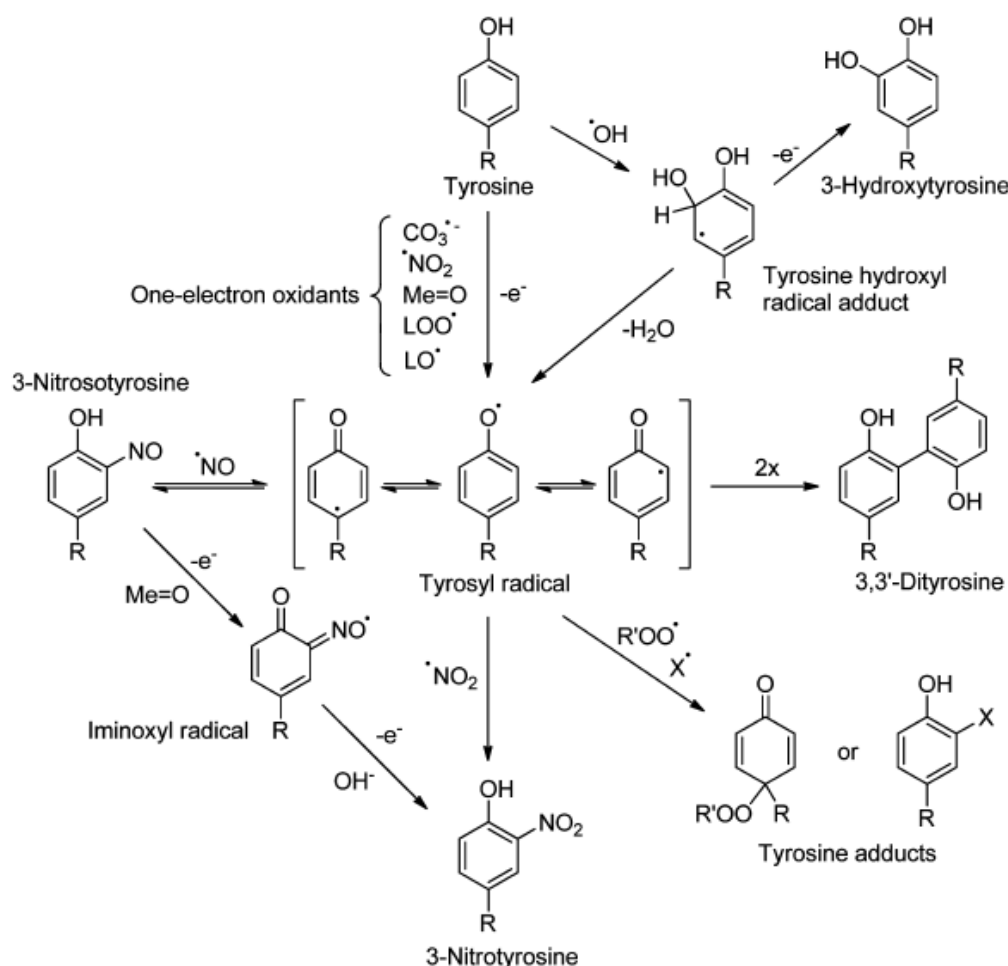


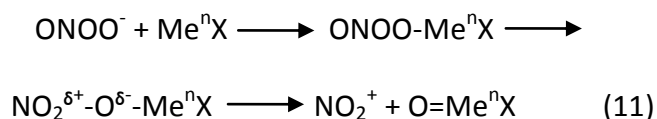
Figura 2.7. Mecanismos radicalares de oxidación y nitración de tirosina. El paso inicial de los procesos de oxidación de la tirosina es la formación del radical tirosilo, lo cual es llevado a cabo por diversos oxidantes de un electrón. Dependiendo de las condiciones, el radical tirosilo podrá dar lugar a la formación de 3-nitrotirosina o de otros productos de oxidación, como la 3,3-ditirosina o la DOPA. La especie X representa al radical glutacionilo, mientras que $\text{ROO}^\bullet$ representa especies como los radicales peróxido lipídicos o al superóxido; dichas especies son capaces de formar aductos con el radical tirosilo [2].

Tabla II. Constantes de velocidad de las principales reacciones implicadas en la nitración y oxidación de tirosina [2].

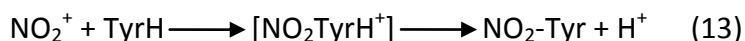
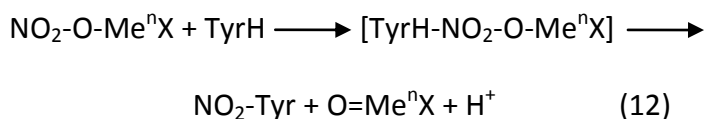
Reacción	Especie (R)	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
Oxidación por un electrón de la tirosina: TyrH + R [•] → Tyr [•] + RH	CO ₃ ^{•-}	4,5 x 10 ⁷
	•NO ₂	3,2 x 10 ⁵
	Me=O	7,7 x 10 ⁵
	LOO [•]	4,8 x 10 ³
	LO [•]	3,5 x 10 ⁵
	•OH	6,5 x 10 ⁸
Formación de 3-nitrotirosina: Tyr [•] + •NO ₂ → NO ₂ Tyr	•NO ₂	3,0 x 10 ⁹
	•NO	1,0 x 10 ⁹
Dimerización y formación de aductos: Tyr [•] + R → Aducto de Tyr	•OH	1,2 x 10 ¹⁰
	Tyr [•]	2,3 x 10 ⁸
	O ₂ ^{•-}	1,5 x 10 ⁹
	LOO [•]	N.D.
	GS [•]	N.D.
Reducción del radical tirosilo: Tyr [•] + RH → TyrH + R [•]	Ascorbato	4,4 x 10 ⁸
	Glutatión	2,0 x 10 ⁶

N.D. No determinado

Además de los mecanismos radicalares que llevan a la nitración de tirosina, inicialmente se propuso que la reacción de nitración de residuos de tirosina podría ocurrir por un mecanismo independiente de radicales libres, llamado nitración electrofílica aromática (un tipo particular de reacción de sustitución electrofílica aromática). Dicho mecanismo de nitración se planteó que podría ser promovido por las reacciones del ONOO⁻ con metales de transición. En dicho mecanismo, el peroxinitrito formaría inicialmente un complejo con el metal de transición para formar un portador polarizado del catión nitronio (NO₂⁺), el cual podría posteriormente descomponerse a NO₂⁺ libre por ruptura heterolítica (Ec. 11).



A continuación, el portador polarizado o el propio NO₂⁺ atacarían a la tirosina como un aceptor de dos electrones, generando un ion nitroareno como intermediario, el cual evoluciona luego a 3-NO₂Tyr y H⁺ (Ecs. 12-14).





En solución acuosa, la vida media del NO_2^+ es muy corta debido a que reacciona rápidamente con H_2O para decaer a NO_3^- ; por lo tanto el complejo NO_2^+ unido al metal sería la especie que reaccionaría con la tirosina (Ec. 12). En este mecanismo de nitración electrofílica aromática, no existe un cambio en el estado redox neto del centro metálico, a diferencia de lo que ocurre con las reacciones entre el ONOO^- y los metales de transición que se mencionaron previamente. Se cree que la nitración aromática electrofílica de residuos de tirosina podría operar para ciertos complejos de metales de transición, como ocurre en la nitración peroxinitrito dependiente de la Tyr-108 de la Cu, Zn SOD bovina o la Tyr-34 de la MnSOD humana, si bien con la información actual no puede descartarse un mecanismo radicalar [15]. Un mecanismo de nitración independiente de radicales libres como lo es la nitración electrofílica aromática no produciría como subproducto la 3,3'-ditirosina, ya que el mismo se forma únicamente por procesos radicalares que implican la formación de radical tirosilo. Es por esto que la cuantificación de DiTyr en sistemas de reacción de nitración de tirosina por ONOO^- y metales de transición resulta clave para evidenciar la presencia o no de procesos radicalares en los mecanismos de nitración.

2.5. Metales de transición en biología

Los metales de transición son esenciales para numerosos procesos biológicos en prácticamente todos los seres vivos, desde bacterias hasta humanos. Aportan, entre otras, funciones estructurales y catalíticas como grupos prostéticos en las metaloproteínas; por esto, son necesarios para numerosos procesos fisiológicos, que van desde la transcripción génica hasta la respiración celular. Los metales de transición son necesarios en niveles traza, siendo los más abundantes de ellos en el ser humano el hierro, el cobre y el manganeso. Estos tres metales, localizados en el bloque *d* de la tabla periódica, son considerados como ácidos de Lewis, presentando constantes de estabilidad elevadas cuando son coordinados por ligandos que son bases de Lewis, como los tiolatos y los imidazoles. Su facilidad para oscilar entre un estado oxidado y uno reducido es la principal característica que les permite actuar como cofactores en reacciones enzimáticas. Los metales de transición son absorbidos de la dieta por el duodeno y transportados a los sitios de utilización. Dentro de las células, pueden existir bajo muchas formas,

que incluyen unidos a biomoléculas (como proteínas), en asociación con especies de bajo peso molecular (como aminoácidos) o como iones libres. Sus niveles sistémicos y celulares deben ser monitoreados y regulados activamente, ya que por un lado, su deficiencia puede llevar a la pérdida de actividades enzimáticas cruciales, mientras que por otro lado, su acumulación puede dar lugar a reacciones indeseadas que generan especies reactivas del oxígeno, daño oxidativo y, eventualmente, muerte celular [61, 62, 63].

2.5.1. Hierro

El hierro es requerido por la mayoría de los organismos ya que sirve como grupo prostético para proteínas involucradas en procesos celulares centrales, como la respiración, la síntesis de ADN y el transporte de oxígeno. Diariamente, el ser humano puede absorber entre 1-3 mg de hierro, para remplazar las pérdidas diarias. Los enterocitos captan el hierro de la dieta mediante el transportador de metales divalentes 1 (DMT-1; en forma de Fe^{2+} ingresa) y lo exportan hacia la circulación (momento en que vuelve a oxidarse a Fe^{3+}), donde se une a una proteína plasmática que lo transporta, la transferrina. De este modo, el hierro es transportado hacia la mayor parte de las células, siendo los precursores de los eritrocitos los que captan una mayor cantidad. El hígado también capta grandes cantidades de hierro, el cual lo almacena unido a la proteína ferritina. El hierro citosólico es utilizado para la síntesis de proteínas que contienen hierro, mientras que la mitocondria lo utiliza para la biosíntesis de los clústeres hierro-azufre (Fe-S) y del grupo hemo. La cantidad de hierro absorbida a diario representa solo una mínima fracción del hierro corporal total: la mayor parte del hierro circulante proviene del reciclaje de los grupos hemo de los eritrocitos senescentes por parte de los macrófagos reticuloendoteliales [64].

En las proteínas, el hierro se encuentra formando complejos químicamente diversos, como los centros ferro-sulfurados, los complejos de hierro mononuclear, los complejos oxo- Fe_2 y los grupos hemo. En todos ellos, el hierro suele estar en estado de oxidación +2 o +3; los estados +4 y +5 suelen formarse transitoriamente durante reacciones de oxigenación [65]. Aproximadamente dos tercios del contenido total de hierro corporal de una persona adulta se encuentra incorporado en los grupos hemo de la hemoglobina [66]. El grupo hemo es una protoporfirina de hierro que consiste en un macrociclo formado por cuatro anillos pirrólicos sustituidos conectados por enlaces metileno (Figura 2.8). Cuando el átomo de hierro está en estado ferroso (Fe^{2+}), el complejo se llama ferroprotoporfirina o hemo, mientras que cuando está en estado férrico (Fe^{3+}) el complejo se llama ferriprotoporfirina o hemina. El hemo es una molécula de

naturaleza hidrofóbica, que contiene grupos metilo, vinilo y propionilo como sustituyentes de los anillos pirrol. En la naturaleza, existen varios tipos de grupo hemo que difieren en la composición de las cadenas laterales de los pirroles. El más abundante es el hemo tipo *b*, que está presente en todas las hemoproteínas salvo en los citocromos *c* y *a*, que tienen hemo *c* y *a*, respectivamente [67].

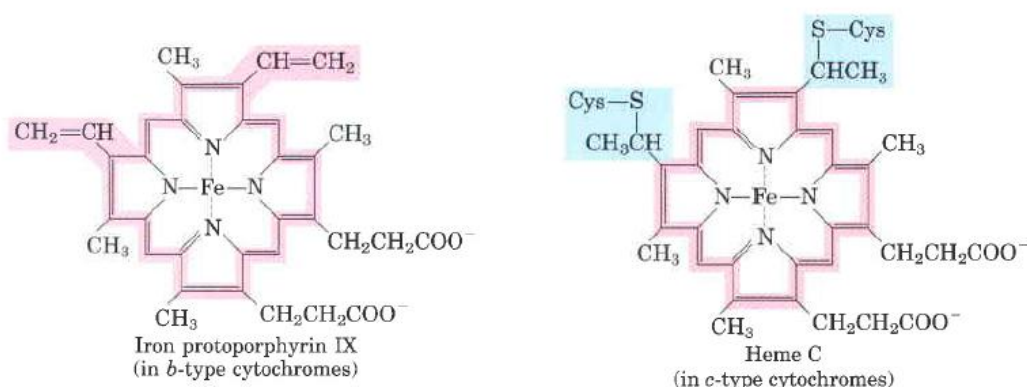


Figura 2.8. Estructura del grupo hemo. El grupo hemo consiste de cuatro anillos de cinco miembros que contienen nitrógeno dispuestos de manera cíclica, en una estructura llamada porfirina. Los cuatro átomos de nitrógeno están coordinados con un átomo de hierro central, que puede estar como Fe^{2+} o como Fe^{3+} . La protoporfirina IX de hierro (izquierda) se encuentra en los citocromos de tipo *b* y en la hemoglobina y mioglobina, entre otras proteínas. El hemo *c* (derecha) se encuentra unido covalentemente al componente proteico del citocromo *c* a través de dos enlaces tioéter con dos residuos de cisteína [1].

Dado que numerosas enzimas que contienen hierro cumplen un rol esencial en el metabolismo energético y la proliferación celular, un déficit severo de hierro a nivel celular resulta en la inhibición de la proliferación de las células y puede eventualmente llevar a muerte celular. A nivel sistémico, la deficiencia de hierro puede causar anemia, que altera el transporte de oxígeno hacia los tejidos y genera efectos adversos sobre la función cardiopulmonar. De igual modo, un exceso de hierro también tiene consecuencias negativas sobre la homeostasis celular. La presencia de exceso de hierro en forma libre puede promover la generación de especies reactivas del oxígeno, por ejemplo, a través de la ya mencionada reacción de Fenton (Ec. 3), o también por reacción entre el hierro ferroso e hidroperóxidos lipídicos, que puede llevar a la formación de radicales peroxilo y alcoxilo lipídicos; esta producción de especies altamente reactivas puede producir daño a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos [66]. La formación de especies reactivas del oxígeno mediada por hierro está

implicada en la patogénesis de numerosos desórdenes vasculares, como la aterosclerosis o la anemia hemolítica microangiopática. Una fuente abundante de hierro redox-activo son los grupos hemo de las hemoproteínas intracelulares. En efecto, el hemo (y la hemina) libre produce daño a lípidos, proteínas y ADN a través de la generación de ROS [67].

2.5.2. Cobre

El cobre es un metal redox-activo que es utilizado predominantemente por organismos que viven en ambientes ricos en oxígeno y que fluctúa entre un estado oxidado (Cu^{2+}) y uno reducido (Cu^+). Con estos cambios en su estado redox, el cobre puede coordinar con una variedad de ligandos que incluyen al oxígeno de carboxilatos, nitrógenos de imidazoles, tiolatos de cisteína y grupos tioéter de la metionina, al tiempo que también es capaz de participar en interacciones catión- π . Muchas enzimas se aprovechan de los cambios en el estado de oxidación de átomos de cobre unidos, en presencia de oxígeno, para catalizar reacciones redox para diversas transformaciones químicas que son claves en biología. Algunos ejemplos de esto lo constituyen la superóxido dismutasa de Cu y Zn, la citocromo oxidasa (Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial), la ceruloplasmina y la hefaestina (ambas importantes en la homeostasis del hierro al catalizar su oxidación) y la tirosinasa (enzima que participa en la síntesis de melanina). Además de la participación como cofactor enzimático en reacciones de oxidación-reducción, en ciertas proteínas, el cobre cumple un rol estructural [68]. A nivel intracelular, hay mínimas cantidades de cobre libre: el Cu se encuentra principalmente unido a proteínas o ligado a glutatión u otras moléculas de bajo peso molecular. Las enzimas que contienen cobre reciben dicho elemento de chaperonas de cobre, que unen estrechamente al Cu y lo entregan a las proteínas blanco [69].

La absorción de Cu en el cuerpo humano depende de diversos factores, como la forma química del mismo o la presencia de otros componentes dietarios. Un 30-50% del cobre ingerido se absorbe en el intestino delgado, principalmente como Cu^{2+} ; cantidades muy pequeñas son absorbidas en el estómago. Una parte del cobre endógeno presente en las secreciones digestivas es además reabsorbida. El Cu absorbido es transportado en la sangre unido predominantemente a la albúmina (aunque también en parte por la transcupreína), que lo libera en los tejidos que lo requieran. Gran parte del cobre absorbido es captado por el hígado, que puede almacenarlo dentro de los hepatocitos, secretado a la sangre o excretado en la bilis. Los hepatocitos usan el cobre para la síntesis de cuproenzimas, pudiendo almacenar el resto unido a la

proteína metalotioneína. Si bien la albúmina es quien cumple principalmente el rol de transporte de cobre en sangre hacia los tejidos, aproximadamente un 60-90% del Cu circulante en plasma se encuentra unido a la ceruloplasmina, una proteína que une seis átomos de cobre y cuya función ya fue mencionada.

En individuos sanos, los mecanismos mencionados operan correctamente: el Cu suele estar como grupo prostético en ciertas enzimas o unido estrechamente a proteínas de almacenamiento o transporte y por lo tanto no se encuentra libre y disponible para ejercer otros efectos. Sin embargo, en ciertas situaciones, como frente a exposición a niveles excesivos de cobre (por ejemplo, por contaminación ambiental o exposición laboral) o por defectos hereditarios en proteínas involucradas el metabolismo de dicho elemento, los niveles de cobre pueden verse elevados, existiendo una mayor cantidad de Cu libre capaz de ejercer efectos tóxicos. Al igual que lo mencionado para el hierro, los efectos tóxicos del cobre se deben a su capacidad de oscilar entre diferentes estados de oxidación, pudiendo participar así en reacciones de formación de especies reactivas del oxígeno y oxidación de biomoléculas. Por ejemplo, al igual que el hierro ferroso, el Cu^+ puede generar radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Ec. 3), el cual podrá producir daño oxidativo a diversas moléculas. Además, el Cu^{2+} puede iniciar procesos de peroxidación lipídica; un caso bien estudiado y de mucha relevancia es la oxidación del componente lipídico de la lipoproteína de baja densidad (LDL). De este modo, los niveles elevados de cobre pueden tener un impacto negativo sobre la salud humana; por ejemplo, la intoxicación crónica con Cu afecta principalmente el hígado (al ser el principal sitio de depósito del mismo), pudiendo llevar al desarrollo de cirrosis hepática, con episodios de hemólisis y daño a los túbulos renales, el cerebro y otros órganos. Por su parte, la intoxicación aguda con cobre genera principalmente trastornos gastrointestinales. Dado que el cobre actúa como cofactor en diversas enzimas que cumplen funciones muy importantes en diferentes procesos biológicos, la deficiencia de cobre también puede ocasionar distintas complicaciones, sobre todo, desórdenes hematológicos y neurológicos [70].

2.5.3. Manganeseo

El manganeso es un componente esencial de la dieta humana, necesario para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. En mamíferos, puede existir en los estados Mn^{2+} y Mn^{3+} ; mientras que el Mn^{2+} presenta propiedades químicas similares al calcio (Ca^{2+}) y al magnesio (Mg^{2+}), el Mn^{3+} es similar al Fe^{3+} . Las diversas funciones que cumple el manganeso en sistemas biológicos dependen en gran medida de la química de su estado de oxidación. Por ejemplo,

el Mn^{2+} es un cofactor esencial en la glutamina sintetasa y en varias transferasas e hidrolasas, mientras que el rol del Mn en la superóxido dismutasa mitocondrial depende de la conversión entre los estados de oxidación +2 y +3 [71]. En muchas enzimas que dependen de Mn^{2+} , el metal suele funcionar como un activador de las mismas, al unirse a la proteína directamente o a través de un sustrato, como el ATP, para iniciar un cambio conformacional y promover la actividad enzimática [72].

En humanos, el Mn se obtiene de la dieta. Aproximadamente un 3-5% del manganeso ingerido resulta finalmente absorbido; su captación está estrechamente regulada, y cualquier exceso ingerido es excretado fácilmente por vía biliar. Los mecanismos de absorción y transporte del manganeso son similares a los del hierro: ingresa a los enterocitos a través del DMT1 en el estado Mn^{2+} y es transportado en sangre unido a la transferrina, previa oxidación a Mn^{3+} (si bien puede ser llevado también por la albúmina). Los tejidos con una alta demanda energética (principalmente el cerebro) o con un alto contenido de pigmentos presentan las mayores concentraciones de manganeso. También existen altos niveles de Mn en huesos, hígado, páncreas y riñón. A nivel intracelular, predomina el manganeso en estado Mn^{2+} , y suele encontrarse unido a ATP; preferentemente, el Mn dentro de las células se acumula en la mitocondria [73, 74].

Al igual que lo comentado para el hierro y para el cobre, debido a su esencialidad, la presencia de niveles bajos de manganeso trae consigo serias complicaciones fisiológicas, como problemas de crecimiento, formación de huesos débil, fertilidad reducida, tolerancia a la glucosa anormal y alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. De igual modo, la presencia de niveles elevados de manganeso en el organismo puede resultar en el desarrollo de distintas situaciones patológicas; en particular, la acumulación de manganeso en el sistema nervioso central puede conducir a la aparición de manganismo, un desorden neurológico caracterizado por anormalidades psicológicas y neurológicas que se parece a las de la enfermedad de Parkinson. Las similitudes entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Parkinson y el manganismo incluyen la presencia de bradicinesia y rigidez generalizada, así como también de una manera de caminar característica, conocida como marcha de gallo ("cock-walk"). Sin embargo, los niveles excesivos de manganeso dañan otras áreas del cerebro aparte de las afectadas en la enfermedad de Parkinson, y por esto, el manganeso ha sido relacionado también con la etiología de otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica. La exposición a altos niveles de Mn

ambiental es una de las principales causas del desarrollo del manganismo. Uno de los principales factores implicados en la neurotoxicidad del manganeso es, al igual que para el hierro y el cobre, el estrés oxidativo. Por ejemplo, un mecanismo bien estudiado de neurotoxicidad del Mn es su capacidad de catalizar la autooxidación de catecolaminas (en especial de la dopamina) a quinonas; este proceso implica la producción de especies reactivas del oxígeno, además de ocasionar una disminución en los niveles de dopamina. Además de este efecto se ha propuesto también que, dado que suele acumularse en la mitocondria, el Mn en concentraciones elevadas podría interferir con la cadena respiratoria mitocondrial, llevando a una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno. De hecho, se ha visto que el Mn^{3+} es capaz de inhibir al complejo I y a la ATP sintasa de la cadena respiratoria [72, 73, 74].

2.6. Bioquímica redox del grupo hemo

El grupo hemo es sintetizado a nivel celular a partir de dos precursores, que son el succinil-CoA (proveniente del ciclo de Krebs en la mitocondria) y el aminoácido glicina. Un conjunto de ocho enzimas, de localización tanto citosólica como mitocondrial, se encargan de transformar estos precursores en la protoporfirina IX y catalizar además la incorporación del átomo de hierro ferroso en el centro del anillo. Se precisan en total ocho moléculas de succinil-CoA y ocho de glicina para lograr la síntesis de la protoporfirina IX. Si bien su síntesis puede ocurrir virtualmente en todos los tejidos, los principales sitios de síntesis lo constituyen las células eritroides y los hepatocitos; claramente, estos dos tipos celulares lo sintetizan con diferentes finalidades. En el hígado, gran parte del hemo sintetizado es incorporado a la familia de los citocromos P450, implicados en el metabolismo de xenobióticos. Por su parte, los precursores eritroides sintetizan todo el hemo para su incorporación en la hemoglobina. Una vez que las hemoproteínas resultan degradadas, el grupo hemo debe ser correctamente metabolizado. Su catabolismo implica en primer lugar la ruptura del tetrapirrol cíclico por parte de un sistema complejo de enzimas llamado hemo oxigenasa, formando biliverdina (un tetrapirrol lineal) y liberando Fe^{3+} y monóxido de carbono; posteriormente, la biliverdina es reducida a bilirrubina. A continuación, la bilirrubina producida en los tejidos periféricos es transportada en plasma unida a la albúmina hasta el hígado, donde las células del parénquima hepático la

captan. Posteriormente, la bilirrubina es conjugada con ácido glucurónico para aumentar su polaridad y finalmente resulta secretada en la bilis [5].

En la hemoglobina, el grupo hemo se encuentra reducido (con el átomo de hierro en el estado Fe^{2+}) y uniendo oxígeno molecular. En dicho contexto, el potencial pro-oxidante del hemo se encuentra relativamente controlado. Sin embargo, una vez que los eritrocitos envejecen, puede ocurrir su lisis a nivel intravascular, lo que resulta en la liberación de su gran contenido de hemoglobina a la sangre. Tras esto, puede ocurrir la disociación de los grupos hemo de la hemoglobina (antes o después de su oxidación a metahemoglobina), resultando en grupos hemo libre y cadenas de globina libres. Una vez en su forma libre, el grupo hemo liberado en su estado ferroso (uniendo oxígeno) se oxida rápidamente al estado férrico, generándose así hemina libre en plasma y liberando en este proceso superóxido; esto tiene como resultado final la presencia de hemina libre capaz de participar en reacciones oxidativas así como también la producción de superóxido. No obstante, existen circulando en el plasma diversos sistemas proteicos que participan en la detoxificación de la hemoglobina libre y de sus productos derivados. La haptoglobina es una proteína plasmática cuya función es unir la hemoglobina liberada, para evitar que genere daño y transportarla al hígado para su catabolismo. En caso de liberarse el grupo hemo en sangre, éste es captado principalmente por dos proteínas: la hemopexina y la albúmina. La hemopexina es una glucoproteína que une hemo con una alta afinidad ($K_d < 1 \text{ pM}$), reduciendo notoriamente de este modo los efectos tóxicos del hemo (y la hemina) libres. Además, se encarga de transportar los grupos hemo liberados en sangre hacia el hígado, donde pueden ser degradados por la hemo-oxigenasa; es así la principal proteína plasmática encargada de la unión y transporte de hemina libre en plasma en condiciones basales. Sin embargo, dado que su concentración normal es relativamente baja ($6\text{-}25 \text{ }\mu\text{M}$), este sistema de detoxificación puede verse saturado con facilidad si se liberan cantidades mayores de hemina por parte de los glóbulos rojos; es allí cuando se hace necesaria la participación de otra proteína: la albúmina. Esta proteína es la principal proteína del plasma (alcanza concentraciones de aprox. $600 \text{ }\mu\text{M}$) y es capaz de unir con gran afinidad hemina ($K_d < 10 \text{ nM}$), formando complejos en una relación molar 1:1. Si bien se ha visto que estos complejos hemina-albúmina son redox-activos, su actividad es mucho menor que la de la hemina libre, por lo que la albúmina cumple un rol en evitar los efectos tóxicos de la hemina libre que complementa a la de la hemopexina. A diferencia de lo que ocurre con los complejos hemina-hemopexina, no hay evidencia de que los complejos hemina-albúmina sean transportados a las células parenquimales del

hígado, con lo cual la albúmina funcionaría más como un depósito de hemina en situaciones en que la capacidad de la hemopexina se encuentra saturada. Así, mantendría a la hemina en circulación en un estado menos tóxico, a la espera de que se libere hemopexina y la pueda transportar al hígado para su degradación [67, 75].

En condiciones normales, los eventos de hemólisis intravascular son relativamente esporádicos y los sistemas de detoxificación mencionados son suficientes para dar cuenta de la baja cantidad de hemoglobina y hemina que resulta liberada, evitando así que ejerzan efectos tóxicos. No obstante, en situaciones patológicas donde hay un incremento importante de la hemólisis intravascular (por ejemplo, anemia hemolítica, anemia falciforme, isquemia reperusión y hemorragias), la cantidad de hemina que resulta liberada de los glóbulos rojos lisados puede ser tan grande que supera la capacidad de la hemopexina y la albúmina para unirla, resultando en la existencia de hemina libre en plasma (capaz de alcanzar una concentración de hasta $20 \mu\text{M}$). En su estado libre, la hemina (y el hemo también) resulta tóxica para células y tejidos principalmente a través de la producción de especies reactivas del oxígeno, siendo el principal responsable de esto el átomo de hierro redox-activo que posee. En efecto, se ha visto que la hemina tiene una gran capacidad de promover la peroxidación lipídica (lo cual además se ve favorecido por la hidrofobicidad de la hemina, que hace que tienda a intercalarse en membranas), la oxidación de ácidos nucleicos y también la oxidación de proteínas, en las cuáles puede inducir la formación de entrecruzamientos covalentes (a través de la formación de ditirosina) así como también promover la formación de agregados proteicos. Además de este daño a biomoléculas, la presencia de cantidades importantes de hemina libre puede llevar a la disfunción endotelial al limitar la biodisponibilidad de óxido nítrico. Por un lado, la oxi-hemoglobina liberada inicialmente puede reaccionar con el $\bullet\text{NO}$ produciendo metahemoglobina y NO_3^- ; por otra parte, la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de la hemina pueden consumir una fracción del óxido nítrico producido a nivel endotelial. Principalmente, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido reaccionará con el $\bullet\text{NO}$ produciendo ONOO^- ; esto no solo disminuye la disponibilidad de óxido nítrico, sino que a la vez genera una especie altamente oxidante capaz de generar más daño. La hemólisis severa que produce esto también incluye una liberación de la enzima arginasa-I por parte de los eritrocitos, que puede degradar al sustrato de la enzima óxido nítrico sintasa, la arginina, disminuyendo así la capacidad de síntesis de $\bullet\text{NO}$. Otro de los efectos adversos de gran importancia que genera la presencia de niveles de hemina libre elevados a nivel

intravascular es su capacidad de inducir una respuesta inflamatoria. Los efectos pro-oxidantes de la hemina pueden llevar a la activación del endotelio y a la expresión por parte de las células endoteliales de moléculas de adhesión (como la selectina-P, VCAM-1 e ICAM-1), que favorecen la adhesión de leucocitos al endotelio. Además de esto, se han visto otros efectos pro-inflamatorios de la hemina, como su capacidad quimiotáctica y activadora de neutrófilos. Por último, la hemina libre tiene una gran capacidad hemolítica, principalmente a través de su efecto pro-oxidante, que puede alterar la homeostasis del eritrocito, promoviendo su lisis. Con esto, estaría ocurriendo una retroalimentación positiva de la hemólisis: una situación patológica inicial produce una hemólisis intravascular aumentada, que genera una liberación masiva de hemina a la circulación; a su vez, estos niveles altos de hemina inducen nuevos eventos de hemólisis, de manera independiente de los de la situación inicial. A través de los mecanismos mencionados, la hemina juega un rol principal en las consecuencias fisiopatológicas que surgen como consecuencia de la hemólisis intravascular severa que ocurre en situaciones patológicas [67, 76]. Además de estos mecanismos de toxicidad mencionados, otro efecto capaz de ser promovido por la hemina libre es la nitración de residuos de tirosina proteicos en presencia de H₂O₂ y NO₂⁻ [77].

2.7. Complejos metálicos de relevancia farmacológica

Dentro del área de la bioquímica redox y el estrés nitro-oxidativo, un grupo de compuestos sintéticos de interés farmacológico que han sido ampliamente estudiados son las metaloporfirinas de hierro y de manganeso. Inicialmente diseñadas para presentar actividad superóxido dismutasa, se descubrió posteriormente que eran capaces de ejercer efectos protectores principalmente contra la citotoxicidad mediada por ONOO⁻ tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, al ser capaces de catalizar su descomposición.

Estructuralmente, estos compuestos consisten en un anillo de porfirina (tetrapirrol cíclico) idéntico al del grupo hemo, pero con sustituyentes de naturaleza química diversa ubicados a nivel de los enlaces metileno que conectan los pirroles (en las protoporfirinas naturales, los sustituyentes suelen ubicarse a nivel de los anillos pirrólicos). El centro metálico es coordinado por los cuatro nitrógenos de los pirroles, y puede ser Mn o Fe. La naturaleza de los sustituyentes afecta en gran medida las propiedades fisicoquímicas de la

metaloporfirina, como la carga, hidrofobicidad y potencial de reducción del átomo de hierro o manganeso para la transición +3 a +2, motivo por el cual se han diseñado un gran número de estos compuestos presentando distintos grupos sustituyentes. La Figura 2.9 muestra la estructura general de las metaloporfirinas sintéticas así como algunos ejemplos de sustituyentes adicionados.

Las metaloporfirinas son capaces de experimentar reacciones bimoleculares rápidas con el ONOO^- , al comportarse como el ácido de Lewis de la forma aniónica del peroxinitrito, ya sea a través de procesos redox de uno o dos electrones. Distintas porfirinas de Fe^{3+} hidrosolubles que actúan como catalizadores de la descomposición del ONOO^- han demostrado tener efectos protectores en varios modelos de patologías. Dicho efecto fue atribuido a la capacidad de las porfirinas de hierro de reaccionar directamente con el peroxinitrito mediante una oxidación de un electrón, que genera el intermediario oxo-ferrilo de la porfirina ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}\text{P}$) y $\cdot\text{NO}_2$, o bien a través una reacción de isomerización del ONOO^- a NO_3^- , siempre con constantes de velocidad del orden de 10^5 - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Si bien experimentalmente han tenido efectos benéficos en varios modelos de enfermedad, un mecanismo de acción que implica la reducción por un electrón del ONOO^- deriva en la formación de especies radicalares, capaces de promover el daño oxidativo, lo cual impone una limitante al uso de estos compuestos. En cambio, una reacción de isomerización neta del ONOO^- a nitrato representaría una forma muy eficaz de descomponer el peroxinitrito al llevar a la formación de productos relativamente inertes. No obstante, la isomerización del ONOO^- a NO_3^- por parte de las porfirinas de hierro resulta poco probable de ocurrir *in vivo*, pues en base a los mecanismos planteados, solo podría ocurrir en ausencia de agentes reductores externos.

De igual modo, las porfirinas de manganeso (MnP) han ejercido importantes efectos protectores contra el daño mediado por ONOO^- en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la porfirina de manganeso Mn(III) *meso*-tetrakis(N-etil-2-piridil)porfirina (MnTE-2-PyP) ha demostrado tener importantes efectos neuroprotectores contra daños isquémicos focales, así como también presentó un efecto protector contra lesiones pulmonares por radiación y contra disfunción del músculo esquelético en sepsis. Además, otras porfirinas de manganeso han presentado resultados prometedores, ejerciendo un importante efecto protector en diversos modelos patológicos, siendo consideradas para la realización de ensayos clínicos para lograr un conocimiento más profundo de su posible rol farmacológico en distintas enfermedades.

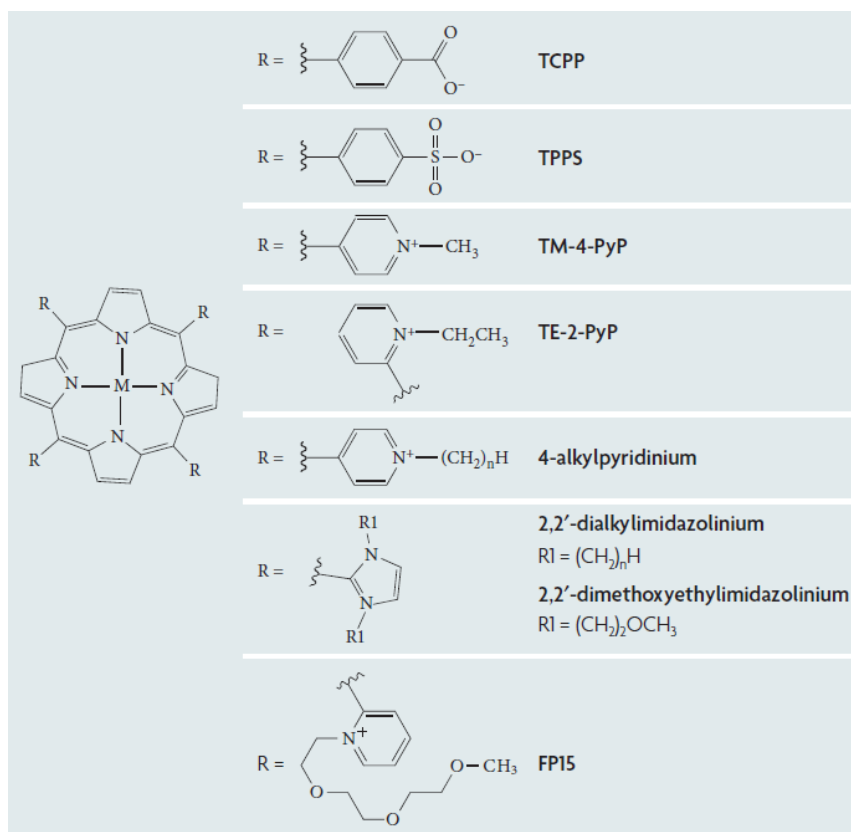


Figura 2.9. Estructura de las metaloporfirinas. Estructura básica de las porfirinas de Fe y Mn empleadas como catalizadores de la descomposición del peroxinitrito. El metal (Fe o Mn) se representa como M, mientras los sustituyentes del anillo de la porfirina se representan como R. Se representan como ejemplo algunos de los sustituyentes utilizados habitualmente y que brindan propiedades fisicoquímicas características a cada compuesto [59].

En todos los casos, el principal mecanismo propuesto para los efectos ejercidos por estos compuestos es la descomposición catalítica de peroxinitrito. Dicho mecanismo podría transcurrir por dos vías principales que son a través de la reducción por un electrón o de la reducción por dos electrones del ONOO⁻, con constantes de velocidad que van de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $3,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; el tipo de reacción que ocurrirá va a depender del estado de oxidación de la porfirina de manganeso. Normalmente, las MnP son administradas en el estado +3 (Mn⁺³P), el cual es el más estable. En dicho estado, el compuesto promueve la reducción por un electrón del ONOO⁻, generando $\bullet\text{NO}_2$ y el estado oxo-manganeso de la porfirina (O=Mn⁴⁺P); a continuación, el compuesto retorna a su estado inicial (Mn³⁺P) a expensas de algún reductor intracelular, el cual reduce al O=Mn⁴⁺P. De esta manera, la porfirina de manganeso estaría descomponiendo de manera catalítica al ONOO⁻, si bien produce en el camino especies altamente reactivas

como $\bullet\text{NO}_2$ y $\text{O}=\text{Mn}^{4+}\text{P}$, capaces de promover reacciones no deseadas (ej: la nitración de tirosina). La vía de descomposición del ONOO^- por dos electrones podrá ocurrir si la porfirina de manganeso resulta reducida al estado +2 (Mn^{2+}P) a nivel intracelular una vez administrada. De hecho, diversos reductores intracelulares son capaces de reducir a estos compuestos, como el glutatión o las flavoproteínas. En su estado Mn^{2+}P , la reacción entre la porfirina de manganeso y el ONOO^- genera como productos NO_2^- y $\text{O}=\text{Mn}^{4+}\text{P}$; posteriormente, el complejo $\text{O}=\text{Mn}^{4+}\text{P}$ retorna al estado Mn^{2+}P , pasando primero por el estado Mn^{3+}P , mediante la oxidación de reductores celulares. Este mecanismo catalítico de descomposición del peroxinitrito presenta una ventaja importante respecto al anterior mencionado y es que se evita la formación de $\bullet\text{NO}_2$, con lo cual disminuyen las posibilidades de que se den reacciones de oxidación secundarias no deseadas [48, 59]. La Figura 2.10 resume los mecanismos de descomposición de peroxinitrito por parte de las porfirinas de manganeso y de hierro.

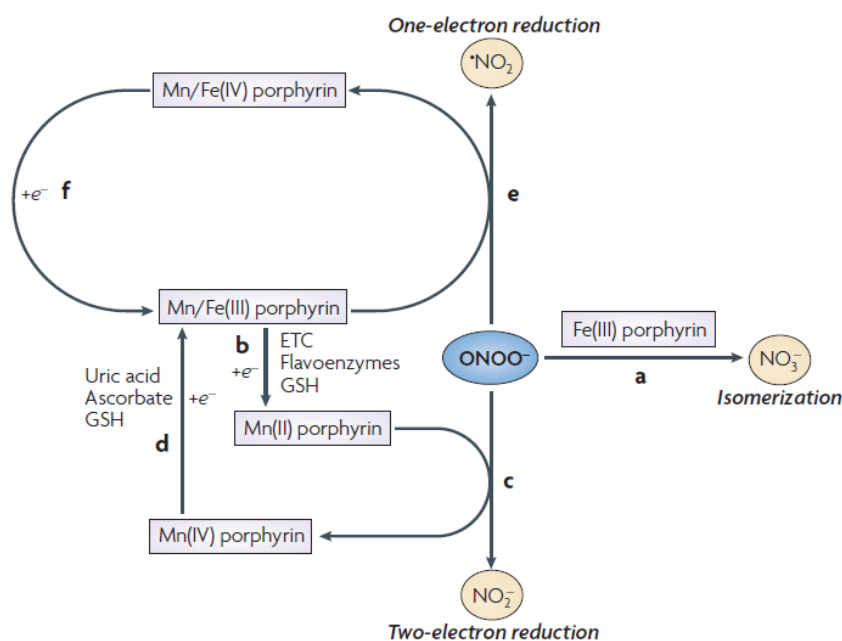


Figura 2.10. Descomposición catalítica de peroxinitrito por parte de porfirinas de manganeso y hierro. Se muestran los mecanismos de descomposición catalítica del ONOO^- por parte de metaloporfirinas de hierro o manganeso. Las porfirinas de hierro pueden isomerizar el ONOO^- a nitrato (a). Por su parte, las porfirinas de manganeso pueden ser reducidas a nivel intracelular al estado Mn^{2+} (b) y reducir por dos electrones al ONOO^- (c); el resultante complejo de Mn^{4+} puede ser reducido de vuelta al estado Mn^{3+} por reductores intracelulares (d). Además, tanto las porfirinas de Mn como las de Fe pueden promover la reducción del peroxinitrito por un electrón a $\bullet\text{NO}_2$ (e), y nuevamente el complejo Mn/Fe^{4+} es finalmente reducido al estado (III). ETC: cadena transportadora de electrones; GSH: glutatión [59].

3. Objetivos

Se plantea como objetivo general de este trabajo el estudio de la nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito en fase acuosa mediada por metales de transición; como objetivos específicos se plantean: **1)** identificar complejos metálicos de bajo peso molecular de relevancia biológica capaces de promover este tipo de modificaciones oxidativas; y **2)** estudiar los mecanismos de reacción implicados.

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

Los reactivos fosfato de potasio monobásico y dibásico (KH_2PO_4 y K_2HPO_4), L-tirosina, cloruro de sodio (NaCl), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 3-nitro-L-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, dióxido de manganeso (MnO_2), nitrito de sodio (NaNO_2), pirofosfato disódico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), citrato trisódico (Cit), adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ácido L-glutámico (Glu), L-histidina (His), L-lisina (Lys), ácido p-hidroxifenilacético (p-HPA), Peroxidasa de rábano (HRP), β -mercaptoetanol (β -ME), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), carbón activado, solución de ácido Bicinconínico (BCA), solución de sulfato de cobre (II) y albúmina sérica bovina (BSA) fueron adquiridos en Sigma. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico fue de Fisher Biotec. El hidróxido de sodio (NaOH) y la Hemina (Ferriprotoporfirina IX cloruro) fueron adquiridos en Applichem; el Ácido o-fosfórico (H_3PO_4 , solución 85% w/w) fue de Merck y la Albúmina sérica humana (HSA, solución al 25%) fue adquirida en Baxter Healthcare Corporation. Las porfirinas de manganeso Mn(III) *meso*-tetrakis(N-etil-2-piridil)porfirina pentacloruro (MnTE-2-PyP) y Mn(III) tetrakis(4-Ácido benzoico)porfirina cloruro (MnTBAP) fueron adquiridas en Calbiochem. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fue de Mallinckrodt Chemicals y el metanol (MeOH) empleado en las separaciones por cromatografía fue de Macron Fine Chemicals.

Todas las soluciones fueron preparadas en agua ultrapura deionizada para evitar lo más posible la contaminación con metales traza.

4.2. Métodos

4.2.1. Síntesis y cuantificación de peroxinitrito

El peroxinitrito empleado en todos los experimentos fue sintetizado en un reactor de flujo detenido a partir de NaNO_2 y H_2O_2 en condiciones ácidas como fue descrito previamente [78]. Una vez realizada la reacción, el H_2O_2 remanente se eliminó tratando la solución stock con MnO_2 granular; la solución alcalina de peroxinitrito fue guardada a -80°C hasta su uso. Se controló que el contenido de nitrito de las soluciones de peroxinitrito fuera menor al 20% (respecto al peroxinitrito). La concentración de las soluciones de peroxinitrito a utilizar se determinó siempre antes de cada experimento espectrofotométricamente (Espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Tablet, Varian, Inc.) midiendo la absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Todas las diluciones de peroxinitrito fueron realizadas en NaOH preparada siempre al momento de su uso.

4.2.2. Síntesis de 3,3'-ditirosina

La solución estándar de 3,3'-ditirosina fue sintetizada de acuerdo a lo reportado por Malencik *et al* [79]. El procedimiento consistió en incubar tirosina (0,5 mM), peroxidasa de rábano (HRP 4,5 μM) y H_2O_2 (0,5 mM) en buffer fosfato 100 mM pH 7,4 por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue centrifugada en un tubo de filtrado Amicon Ultra de 15 mL (corte de 10 kDa) para remover la enzima. Posteriormente, la ditirosina fue purificada por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC, Gilson) utilizando una columna de fase reversa Beckman Coulter Ultrasphere ODS de 5 μM (10 mm de diámetro interno x 25 cm de largo), utilizando como fase móvil 97% Buffer Fosfato de Potasio (KPi) 50 mM pH 3,0 y 3% Metanol. La DiTyr fue detectada por fluorescencia, empleando una $\lambda_{\text{ex}} = 294 \text{ nm}$ y una $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$. El compuesto fue recolectado y posteriormente cuantificado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 315 nm ($\epsilon = 8380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a pH 9,9) en un equipo Cary 50 Tablet, Varian, Inc.

4.2.3. Preparación de complejos metálicos

Los complejos metálicos de bajo peso molecular utilizados se prepararon mezclando volúmenes iguales de una solución del ion metálico (FeCl_3 o CuSO_4) con una solución del ligando correspondiente, en una relación molar de concentraciones metal: ligando de 1:1,1 para los complejos $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$, $\text{Fe}^{3+}\text{DTPA}$ y $\text{Cu}^{2+}\text{EDTA}$ o de 1:4 para los restantes complejos preparados ($\text{Fe}^{3+}\text{Citrato}$, Fe^{3+}ATP ,

Fe^{3+} ADP, Fe^{3+} Glutamato, Fe^{3+} Histidina y Fe^{3+} Lisina). La solución de FeCl_3 empleada para preparar los complejos fue preparada en ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N.

Las soluciones de hemina y de la porfirina de manganeso MnTBAP fueron preparadas en NaOH 0,1 N. La solución de MnTE-2-PyP se preparó directamente en agua. Estas tres soluciones se mantuvieron en oscuridad luego de preparadas. La estructura de algunos de los complejos metálicos empleados se muestran en la Figura 4.1 y 4.2.

Todos los complejos metálicos preparados fueron caracterizados mediante la realización de espectros en el intervalo UV-Visible (200 – 700 nm) empleando un equipo Cary 50 Tablet, Varian, Inc.

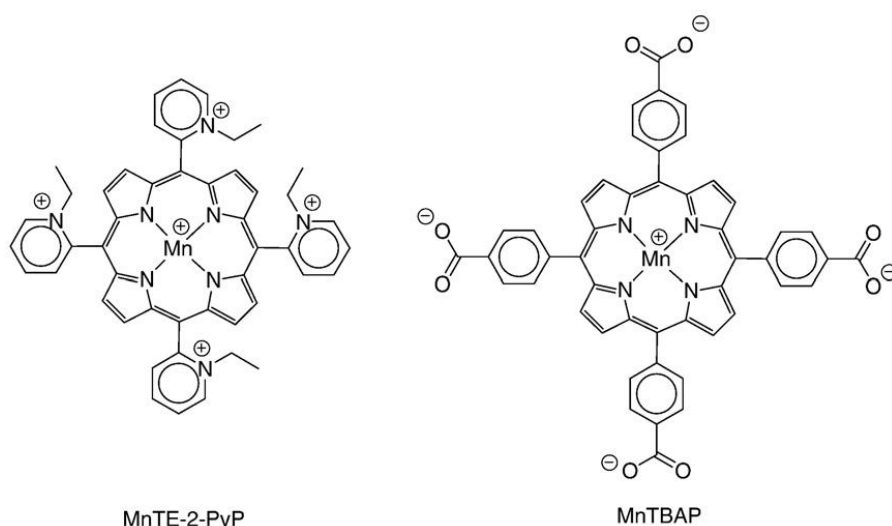


Figura 4.1. Estructura de las porfirinas de manganeso empleadas. Las dos porfirinas de Mn^{3+} empleadas fueron MnTE-2-PyP y MnTBAP. La primera pertenece al grupo de las porfirinas sintéticas con sustituyentes *N*-alquilpiridinio, que presentan carga positiva en las inmediaciones del centro metálico, lo que favorece la reacción del compuesto con aniones. La segunda presenta como sustituyentes cuatro moléculas de ácido benzoico, lo que le brinda a este compuesto una carga neta negativa de -3 [80].

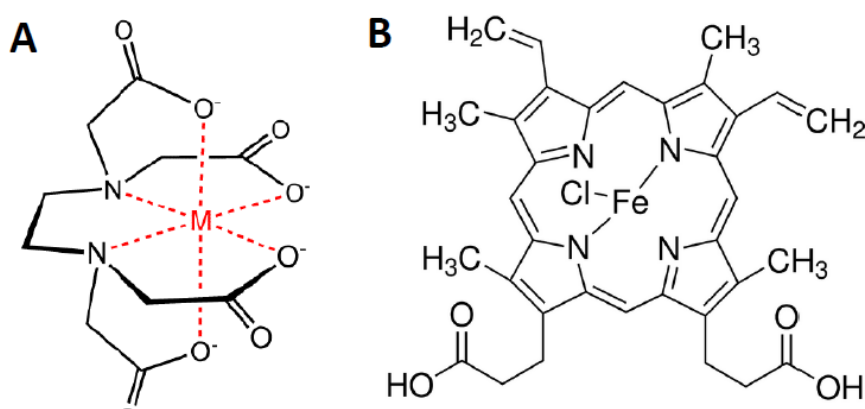


Figura 4.2. Estructura de los complejos Metal-EDTA y Hemina. Se emplearon como complejos metálicos de bajo peso molecular mezclas de un metal de transición coordinado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) **(A)** y también Hemina **(B)**. Imágenes extraídas de es.wikipedia.org (A) y www.sigmaaldrich.com (B).

4.2.4. Reacciones de oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito

Las reacciones de oxidación y nitración de tirosina, en ausencia o presencia de complejos metálicos, se realizaron agregando el peroxinitrito en forma de bolo bajo agitación vigorosa o mediante infusión lenta empleando un equipo de infusión automática (Kd Scientific) a una solución de tirosina en buffer fosfato de potasio (100 o 150 mM para agregado en bolo o infusión, respectivamente) pH 7,3. Las concentraciones de tirosina y ONOO^- utilizadas fueron en general 0,5 mM, salvo en aquellos experimentos donde se indica. En los experimentos realizados en ausencia de complejos metálicos, los buffers empleados contenían 0,1 mM DTPA; cuando se evaluó el efecto de los complejos metálicos no se añadió DTPA al buffer para evitar el posible secuestro del metal del complejo en estudio por el DTPA del buffer. Debido a que la solución de peroxinitrito es fuertemente alcalina, el pH de las muestras fue controlado siempre luego de realizadas las reacciones para asegurar que las variaciones que pudieran ocurrir en el pH no fueran significativas ($< 0,2$ unidades de pH). En cada experimento se realizaron controles agregando peroxinitrito previamente descompuesto en buffer fosfato pH 7,3 para descartar el efecto de los compuestos remanentes de la síntesis del peroxinitrito (en particular NO_2^-) sobre los resultados (adición reversa del peroxinitrito). Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado o por triplicado a temperatura ambiente en un volumen final de 1 mL.

Para el caso de las reacciones de nitración y oxidación de tirosina por ONOO⁻ en presencia de distintas concentraciones de hemina-albúmina o de albúmina, se removió la proteína luego de realizadas las reacciones utilizando tubos de filtrado por centrifugación de 0,5 mL (Amicon Ultra 0,5 mL, corte de 10 kDa). El filtrado (componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción) se recuperó para el análisis posterior de los productos formados.

Los experimentos en que se estudió el efecto del pH sobre las reacciones fueron realizados en soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio 100 mM de diferentes valores de pH en el intervalo 5,5 a 8,5. Las mismas fueron preparadas mezclando diferentes volúmenes de soluciones de KH₂PO₄ y K₂HPO₄ de igual concentración. La fuerza iónica se mantuvo constante en cada mezcla mediante el agregado de NaCl a la solución de KH₂PO₄ (0,4 M de NaCl al stock 0,2 M de KH₂PO₄).

4.2.5. Análisis y cuantificación de productos de oxidación y nitración de tirosina por HPLC

La tirosina y sus productos de oxidación y nitración principales generados tras las reacciones con peroxinitrito (DOPA, DiTyr y NO₂Tyr) fueron separados y cuantificados empleando un sistema de HPLC Agilent 1200 Series mediante una columna de fase reversa TSKgel ODS-120A de 5 µM de TOSOH Bioscience (4,6 mm de diámetro interno x 25 cm de largo). Se utilizó como fase móvil una mezcla 97% KPi 50 mM pH 3,0 y 3% MeOH (isocrático) a un flujo de 1 mL/min durante 33 minutos. Los productos fueron detectados por espectrofotometría UV-Visible a 280 nm (Tyr, DOPA y NO₂Tyr) y a 360 nm (NO₂Tyr) y por fluorescencia excitando a 294 nm y detectando la emisión a 410 nm (DiTyr). La cuantificación de los compuestos se consiguió gracias al uso de estándares de cada uno de ellos (Tyr, NO₂Tyr y DOPA de Sigma; DiTyr sintetizada como se explicó) para la realización de curvas de calibración correspondientes en el equipo (relación área del pico vs concentración de compuesto). Los tiempos de retención característicos de los compuestos separados fueron normalmente: 6 minutos (DOPA), 8,3 minutos (Tyr), 12 minutos (DiTyr) y 28 minutos (NO₂Tyr). La nitración no deseada durante el análisis por HPLC por las condiciones ácidas y el NO₂⁻ presente en las mezclas de reacción fue descartada mediante el análisis de las muestras de adición reversa del peroxinitrito.

4.2.6. Estudio cinético de la reacción entre el ONOO^- y el complejo metálico FeEDTA

La cinética de la reacción entre el ONOO^- y el complejo metálico FeEDTA fue estudiada por espectrofotometría de flujo detenido en un equipo Applied Photophysics SX-20 de acuerdo a Beckman *et al* [13]. El procedimiento consistió en mezclar iguales volúmenes de una solución de FeEDTA (0,5 – 2 mM concentración final) y p-HPA (2 mM concentración final) en buffer KPi 100 mM pH 7,3 con una solución de ONOO^- (0,1 mM concentración final) en NaOH a 37°C. La reacción se siguió midiendo el incremento en la absorbancia a 432 nm producto de la nitración del p-HPA; los datos se ajustaron a una función exponencial simple utilizando el software provisto por el equipo para obtener la correspondiente constante de velocidad observada (k_{obs}). La constante de velocidad de reacción de segundo orden se obtuvo luego graficando los valores de las k_{obs} en función de las respectivas concentraciones del reactivo utilizado en exceso (FeEDTA) y realizando el correspondiente ajuste lineal.

4.2.7. Preparación de Hemina-Albúmina (HemHSA)

Las soluciones de HSA utilizadas se prepararon realizando un tratamiento de delipidación del stock comercial empleando carbón activado, siguiendo el protocolo descrito por Chen [81]. La concentración final de HSA luego del tratamiento, determinada espectrofotométricamente a 279 nm ($\epsilon = 0,531 \text{ (g/L)}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y asumiendo un peso molecular de 66.486 Da, fue de 1,42 mM. El contenido de tiol reducido en dicho stock de HSA fue determinado utilizando DTNB, luego de incubar la HSA con un exceso de DTNB en buffer pirofosfato de sodio (0,1 M, pH 9) por 25 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se usó un coeficiente de absorción a 412 nm de $14150 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para cuantificar el anión 5-tio-3-nitrobenzoato (TNB) formado, el cual equivale a la cantidad de tiol reducido presente en la muestra original de HSA. Como control, se midió la formación de TNB en el buffer utilizado luego de incubar el DTNB en iguales condiciones pero en ausencia de HSA. Se obtuvo así que el porcentaje de tiol reducido (mol SH/mol HSA) en la solución de HSA a utilizar fue menor al 1%, indicando que la muestra carecía prácticamente de grupos SH libres.

El complejo hemina-albúmina fue preparado incubando HSA delipidada con hemina (a partir de un stock 5 mM en NaOH) en una relación de concentraciones de 1:1,1 durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego de un mezclado rápido inicial en vórtex. Posteriormente, se removió el exceso de hemina no unida mediante gel filtración en una columna PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare)

pre-equilibrada en KPi 100 mM pH 7,4. Se introdujo la mezcla (1 mL) en la columna y se la separó por gravedad haciendo fluir el buffer usado a través de la columna; el complejo HemHSA, intensamente coloreado (color rojo oscuro-marrón) eluyó rápidamente luego del ingreso de la muestra en la columna. Se recolectó un volumen aproximado de 1 mL de la fracción más intensamente coloreada para evitar la contaminación con hemina libre, que al ser de bajo peso molecular, eluye luego de la proteína. La fracción recolectada se caracterizó espectrofotométricamente.

Las fracciones de HemHSA así preparadas fueron cuantificadas en placa de 96-pocillos por el método del Ácido Bicinconínico, siguiendo el protocolo de Sigma. Se prepararon diluciones 1/100 y 1/200 de las muestras a cuantificar y una curva de calibración con albúmina sérica bovina, por triplicado. Las mezclas de proteína con el reactivo del ensayo se incubaron durante 30-40 minutos a 37°C y luego se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas. Se consiguió así cuantificar las muestras de HemHSA preparadas tras el proceso de purificación.

4.2.8. Tratamiento de HSA y HemHSA con ONOO⁻

Las muestras de HSA y HemHSA preparadas fueron tratadas con diferentes concentraciones de peroxinitrito, para evaluar la nitración de residuos de tirosina en la albúmina que está unida a hemina y compararla con la que ocurre en la albúmina sola. Se hizo reaccionar la HemHSA o la HSA (0,1 mM de ambas) con ONOO⁻ (10 – 1000 μ M) en KPi 100 mM pH 7,3 a temperatura ambiente, en un volumen final de 200 μ L bajo agitación en vórtex. Luego de realizadas las reacciones, se removió la hemina de las muestras de HemHSA mediante tratamiento con acetona ácida. Se mezclaron 150 μ L de las mezclas de reacción de HemHSA con ONOO⁻ con 1 mL de acetona ácida fría para precipitar la proteína. Las mezclas se guardaron a – 20°C durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y el precipitado se resuspendió en 150 μ L de agua. Se repitió el procedimiento dos veces más y el último precipitado fue resuspendido en 300 μ L de agua. Finalmente, se cuantificó la HSA remanente tras la remoción de la hemina en todas las muestras por el método del ácido bicinconínico.

4.2.9. Determinación de NO₂Tyr en muestras de HSA y HemHSA tratadas con ONOO⁻ por Dot-Blot

Los niveles de NO₂Tyr formados en las muestras de HSA y HemHSA tratadas con ONOO⁻ fueron determinados por Dot-Blot, empleando anticuerpos policlonales anti-NO₂Tyr. Se sembraron 2 μ g de proteína de cada muestra

preparada en una membrana de nitrocelulosa, tras lo cual la membrana fue bloqueada con una solución de leche 5% en buffer fosfato salino (PBS). Luego de esto se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti- NO_2Tyr (dilución 1/2000 en PBS Tween 0,1% con BSA 3%). Después de la incubación y de los lavados (con PBS Tween 0,1%), se incubó con el anticuerpo secundario (dilución 1/12000 en PBS Tween 0,1%) específico para el revelado posterior en un equipo de detección infrarrojo. Tras una hora de incubación, la membrana se volvió a lavar y finalmente se procedió a su revelado en un equipo Odyssey (Li-Cor). La intensidad de las señales detectadas fue cuantificada por densitometría utilizando el propio software del equipo.

5. Resultados

5.1. Análisis por HPLC de productos de oxidación y nitración de tirosina

Los niveles de productos formados tras las reacciones realizadas entre la tirosina y el peroxinitrito se determinaron mediante el método de HPLC ya descrito. Como se observa en la Figura 5.1A, el método es capaz de separar eficazmente a los tres principales productos de oxidación y nitración formados del sustrato inicial, obteniéndose picos de elución de los compuestos muy bien definidos. Esto permite que la cuantificación de los mismos por esta técnica, realizando curvas de calibración respectivas, de manera confiable y precisa. Las Figuras 5.1B y 5.1C representan cromatogramas típicos obtenidos al realizar la reacción entre tirosina y ONOO^- a valores de pH 5,5 y 7,4 respectivamente; al igual que para el análisis de la mezcla de estándares de la Figura 5.1A, se puede observar cómo se consiguió la correcta de separación de los productos de reacción formados en cada uno de los casos. A partir del área del pico de elución de cada compuesto se calculó para los diferentes experimentos la concentración de producto formado luego de las reacciones.

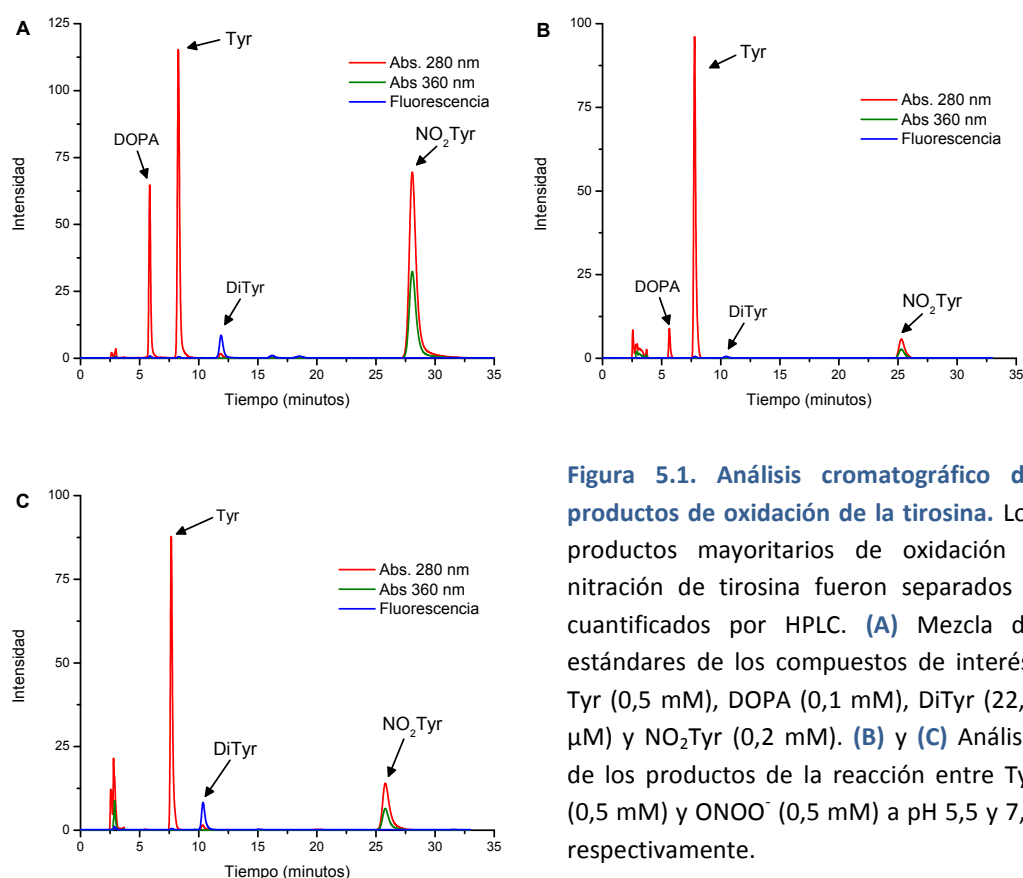


Figura 5.1. Análisis cromatográfico de productos de oxidación de la tirosina. Los productos mayoritarios de oxidación y nitración de tirosina fueron separados y cuantificados por HPLC. **(A)** Mezcla de estándares de los compuestos de interés: Tyr (0,5 mM), DOPA (0,1 mM), DiTyr (22,5 μM) y NO_2Tyr (0,2 mM). **(B)** y **(C)** Análisis de los productos de la reacción entre Tyr (0,5 mM) y ONOO^- (0,5 mM) a pH 5,5 y 7,4 respectivamente.

5.2. Efecto de la concentración de ONOO^- y de tirosina sobre la formación de productos

Empleando el método cromatográfico ya descrito, se estudió la formación de productos de oxidación y nitración de tirosina a pH 7,3 formados tras la reacción entre el ONOO^- y la tirosina variando primero la concentración del oxidante y luego la concentración de Tyr (Figura 5.2). Como se observa en la Figura 5.2.A, los niveles de NO_2Tyr formada aumentaron de manera proporcional al aumento en la concentración de ONOO^- ; sin embargo, los niveles de DiTyr presentaron un incremento de tipo hiperbólico: a bajas concentraciones de ONOO^- , aumentaron rápidamente, mientras que a concentraciones mayores el aumento fue cada vez menor hasta alcanzar un valor de formación de producto máximo a 500 μM de ONOO^- . Luego de alcanzado este valor máximo, los niveles de DiTyr no aumentaron frente a un aumento mayor de la concentración de peroxinitrito. Este mismo comportamiento puede observarse al graficar los rendimientos de

formación de cada producto (calculado en base al peroxinitrito agregado) en función de la concentración de ONOO^- utilizada (Figura 5.2B). Mientras que para la NO_2Tyr los rendimientos se mantuvieron prácticamente invariables en todo el rango de concentraciones de ONOO^- utilizado (rendimiento del 10% aproximadamente), para la DiTyr presentaron un descenso muy pronunciado, yendo desde un valor de 18% al comienzo hasta menos del 1% para la mayor concentración de ONOO^- agregada. Es destacable el hecho de que a la menor concentración de peroxinitrito utilizada ($50\text{ }\mu\text{M}$) la formación del producto de dimerización fue mayor que la del producto nitrado ($9,1$ vs $5,8\text{ }\mu\text{M}$). Si bien esto se revirtió notoriamente para los demás casos, es importante remarcar que en condiciones de un exceso de 10 veces de tirosina respecto al ONOO^- , el principal producto formado tras la reacción resultó ser la ditirosina, considerado habitualmente como un producto minoritario respecto a la nitrotirosina.

De modo similar a como se observó al variar las concentraciones de ONOO^- , cuando se realizaron las reacciones variando la concentración de tirosina, se obtuvieron resultados diferentes para la formación de cada uno de los productos. La NO_2Tyr mostró un rápido incremento en los niveles de formación para bajas concentraciones de Tyr, estabilizándose luego a concentraciones de Tyr mayores. El valor máximo de producto nitrado formado se alcanzó a una concentración de $0,25\text{ mM}$ de tirosina (relación $\text{ONOO}^-/\text{Tyr} = 2$). A diferencia de esto, la cantidad de DiTyr formada fue mínima a bajas concentraciones de Tyr (indetectable a $0,010$ y $0,025\text{ mM}$ de Tyr), pero aumentó considerablemente de manera proporcional a la concentración de tirosina para valores mayores a $0,1\text{ mM}$ de la misma. A la mayor concentración de Tyr empleada (1 mM), los niveles de producto nitrado y de dimerización fueron aproximadamente iguales, mientras que para las demás concentraciones de Tyr fue siempre mayor la cantidad de NO_2Tyr respecto a la de DiTyr . Esto observado al variar la concentración de Tyr es similar a lo que se vio al variar la concentración de ONOO^- . A bajas concentraciones de tirosina respecto al ONOO^- , predomina como producto de la reacción la NO_2Tyr sobre el dímero; sin embargo, a medida que comienza a aumentar la cantidad de tirosina respecto al ONOO^- , la cantidad de nitrotirosina formada permanece prácticamente constante y aumenta notoriamente la cantidad de ditirosina formada. Cuando la concentración de tirosina es el doble que la de ONOO^- , los niveles de producto nitrado y dímero son prácticamente iguales. Si se continuara hacia excesos de Tyr sobre ONOO^- mayores, es probable que la cantidad de DiTyr que se formara fuera mayor a la de NO_2Tyr , de manera similar a como se obtuvo en la Figura 5.2A para la situación de exceso de 10 veces de Tyr sobre peroxinitrito.

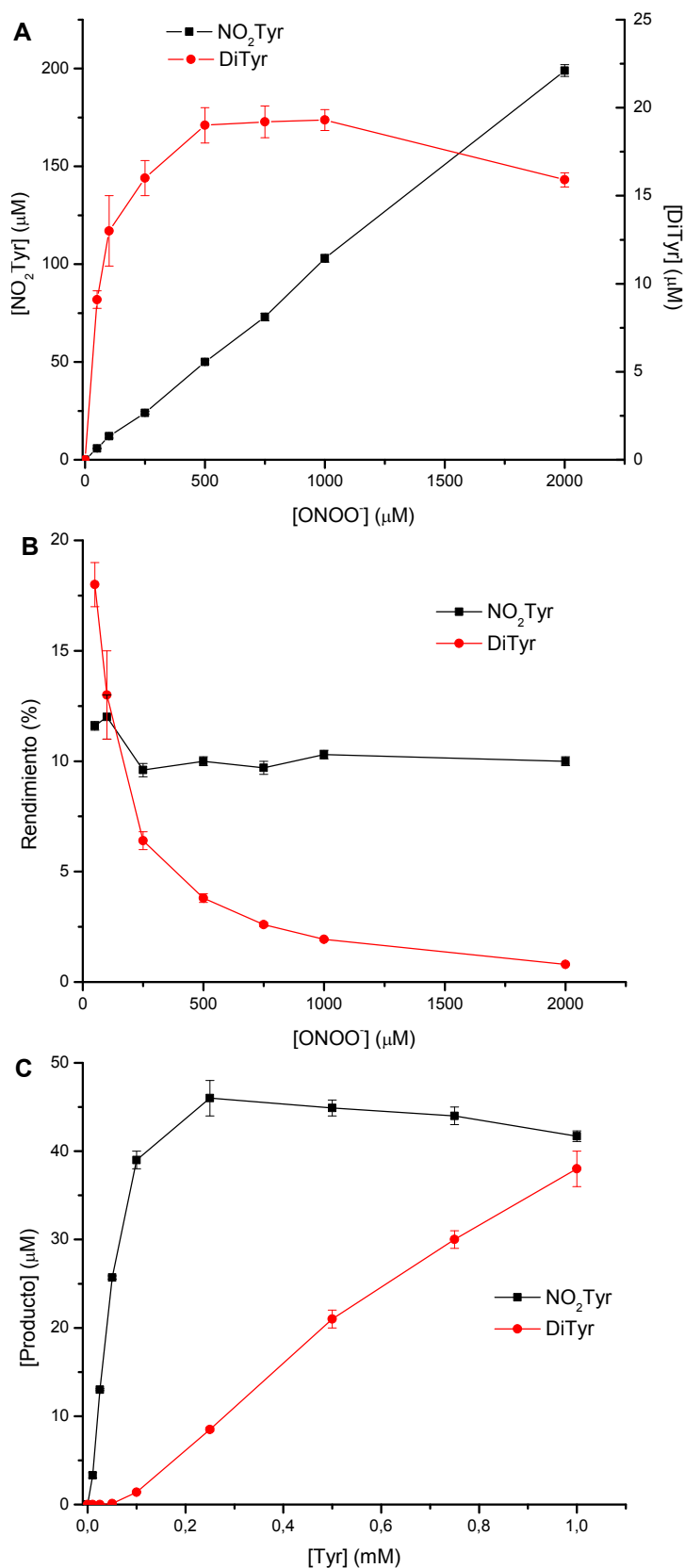


Figura 5.2. Efecto de la concentración de ONOO^- y de tirosina sobre la nitración y dimerización de tirosina. Los niveles de formación de NO_2Tyr y DiTyr fueron estudiados para la reacción entre Tyr y ONOO^- en KPi 100 mM pH 7,3 con 0,1 mM DTPA. **(A)** Efecto de la concentración de ONOO^- (50-2000 μM) sobre la nitración y dimerización de Tyr (0,5 mM). **(B)** Rendimientos de formación de productos (calculados respecto a la concentración inicial de ONOO^-) para las distintas concentraciones de ONOO^- usadas. **(C)** Análisis de la formación de NO_2Tyr y DiTyr en función de la concentración de tirosina (0,01-1 mM) tras reacción con ONOO^- (0,5 mM). Para todos los casos, los productos fueron cuantificados por RP-HPLC como se describió previamente.

En resumen, la formación de los principales productos de oxidación formados tras la reacción entre la tirosina y el peroxinitrito a pH 7,3 (3-nitrotirosina y 3,3'-ditirosina) depende fuertemente de las concentraciones existentes de los reactivos. A altas concentraciones de tirosina sobre ONOO^- , la dimerización de la tirosina resulta favorecida sobre la nitración, mientras que a concentraciones comparables de ambas especies o exceso de peroxinitrito respecto a la tirosina, predomina ampliamente el producto de nitración, pasando la DiTyr a ser un producto minoritario.

5.3. Nitración y oxidación de tirosina por ONOO^- en presencia de distintos complejos metálicos de bajo peso molecular

De acuerdo al método ya explicado, se prepararon los siguientes complejos de metales de transición de bajo peso molecular: FeEDTA, FeDTPA, FeCitrato (FeCit), FeADP, FeATP, FeGlutamato (FeGlut), FeLisina (FeLys), FeHistidina (FeHis) y CuEDTA. Se evaluó la capacidad de dichos compuestos, además de los también preparados Hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP, de promover las reacciones de nitración y oxidación de tirosina por ONOO^- . Como punto inicial, se realizaron las reacciones en presencia de una única concentración de los distintos complejos metálicos, para profundizar posteriormente el estudio en aquellos que pudieran incrementar los rendimientos de formación de productos. La Tabla III muestra como se vieron afectados los niveles de nitración y dimerización de tirosina por ONOO^- en presencia de los distintos complejos preparados (concentración 100 μM para todos salvo para la hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP, cuya concentración fue de 25 μM). Como se puede ver en la misma, la mayor parte de los complejos metálicos probados no consiguieron aumentar los niveles de formación de NO_2Tyr o de DiTyr tras reacción de ONOO^- con tirosina; este grupo de complejos que no tuvo efecto incluye a la mayoría de los complejos biológicamente relevantes que fueron preparados, es decir, aquellos en que el ligando del metal era un metabolito habitual de las células de mamíferos (citrato, ADP, ATP y aminoácidos). Tampoco tuvo efecto sobre la formación de productos el FeCl_3 (hierro férrico), el FeDTPA ni el complejo de cobre CuEDTA. Sin embargo, hubo cuatro complejos estudiados que produjeron un incremento importante sobre los niveles de formación de NO_2Tyr y DiTyr por reacción de Tyr con ONOO^- : FeEDTA, MnTBAP, MnTE-2-PyP y Hemina. Los mismos produjeron un incremento en los rendimientos de nitración desde un 10% a valores de 21, 32, 26 y 20% para FeEDTA, MnTBAP, MnTE-2-PyP y Hemina, respectivamente. De igual modo, los rendimientos de formación de producto de dimerización se incrementaron desde un 4% a 7% para FeEDTA y MnTBAP y a 8% para MnTE-2-PyP; no hubo sin

embargo un aumento de DiTyr para la reacción realizada en presencia de hemina.

Tabla III. Formación de productos de oxidación y nitración en presencia de diversos complejos metálicos de bajo peso molecular. Se expuso tirosina (0,5 mM) a ONOO⁻ (0,5 mM) en buffer KPi 100 mM pH 7,3 en presencia de distintos complejos de bajo peso molecular de metales de transición. La formación de productos (NO₂Tyr y DiTyr) se determinó por HPLC de fase reversa. La concentración usada de los complejos fue de 25 μM para hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP, y de 0,1 mM para los restantes complejos.

Condición	[NO ₂ Tyr] (μM)	[DiTyr] (μM)
Tirosina	0	0
+ONOO ⁻	51 ± 2	22 ± 1
+ FeCl ₃	49 ± 3	20 ± 2
+ FeEDTA	103 ± 2	33,8 ± 0,9
+ FeDTPA	48 ± 4	19 ± 3
+ FeCit	46,5 ± 0,8	19 ± 5
+ FeADP	49 ± 3	25,0 ± 0,9
+ FeATP	50 ± 2	20,6 ± 0,5
+ FeGlut	50,1 ± 0,1	21,5 ± 0,3
+ FeLys	48 ± 3	20 ± 1
+ FeHis	38 ± 1	14,8 ± 0,2
+ Hemina	99 ± 2	20 ± 1
+ CuEDTA	46,3 ± 0,6	20,5 ± 0,2
+ MnTBAP	158 ± 3	33,4 ± 0,4
+ MnTE-2-PyP	128 ± 3	41,6 ± 0,2

Más allá de que no produjeron un efecto notorio a la concentración utilizada en el experimento de la Tabla III, se evaluó la formación de productos de reacción en presencia de diferentes concentraciones de FeCit, FeGlut, CuEDTA y FeCl₃, para tener la certeza de que lo observado no fuera producto de la concentración utilizada del complejo en dicho ensayo. Como se puede ver en la Figura 5.3, en presencia de un amplio rango de concentraciones (10 – 1000 μM) de los mencionados complejos, no hubo un incremento importante en los niveles de formación de productos de la reacción entre tirosina y ONOO⁻, apoyando el resultado visto en la primera aproximación. Por lo tanto, pese a que se observan aumentos mínimos en los niveles de nitración para ciertas concentraciones usadas, los complejos de hierro férrico con diversos ligandos biológicos como nucleótidos, aminoácidos o ácidos tricarboxílicos, no serían capaces de promover las reacciones de nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito.

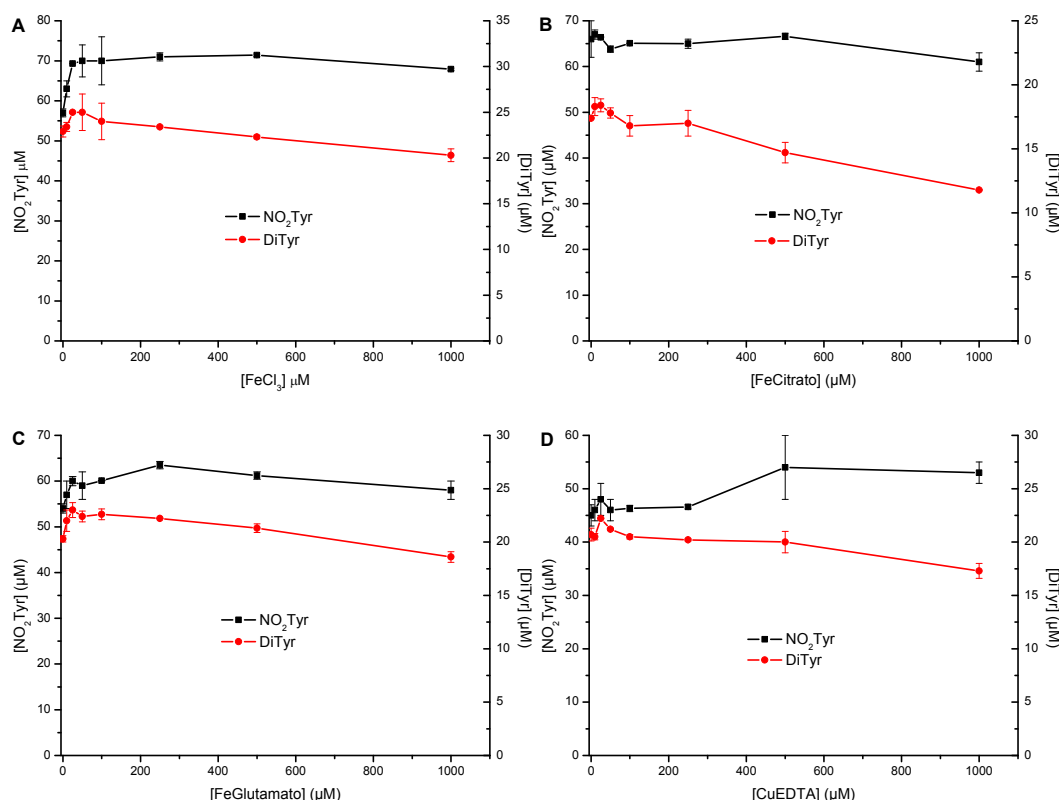


Figura 5.3. Nitración y dimerización de Tyr por ONOO^- en presencia de distintas concentraciones de FeCl_3 , FeCit , FeGlut y CuEDTA . Se estudió el efecto de distintas concentraciones de FeCl_3 (A), FeCit (B), FeGlut (C) y CuEDTA (D) sobre la formación de productos de nitración y dimerización de tirosina (0,5 mM) expuesta a ONOO^- (0,5 mM) en buffer KPi 100 mM pH 7,3.

A continuación, el estudio se enfocó en aquellos complejos metálicos que en la prueba inicial fueron capaces de generar rendimientos de nitración y dimerización considerablemente mayores a la situación control. En primer lugar, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de dichos complejos sobre la formación de NO_2Tyr y DiTyr a pH 7,3 por la reacción entre la tirosina y el ONOO^- . Dicho estudio se realizó agregando el peroxinitrito en forma de bolo y como infusión lenta.

Se realizó la reacción entre tirosina y ONOO^- en presencia de diferentes concentraciones del complejo FeEDTA (10 – 1000 μM), y se determinó la cantidad de NO_2Tyr y DiTyr formados tras la misma (Figura 5.4). Cuando el ONOO^- fue agregado en bolo, el FeEDTA incrementó de manera dosis-dependiente los niveles de nitrotirosina formada notablemente (Figura 5.4A), aumentando los rendimientos desde 13% a 45% para 1 mM del complejo. De

modo similar, la cantidad de ditirosina formada aumentó a mayores concentraciones de FeEDTA (Figura 5.4B), aunque para concentraciones del complejo mayores a 250 μM , los niveles de la misma comenzaron a descender. Dicho comportamiento de todos modos no fue tan pronunciado como lo fue el incremento en los niveles de NO_2Tyr (aumentaron los rendimientos de dimerización del 4 al 6% tan solo).

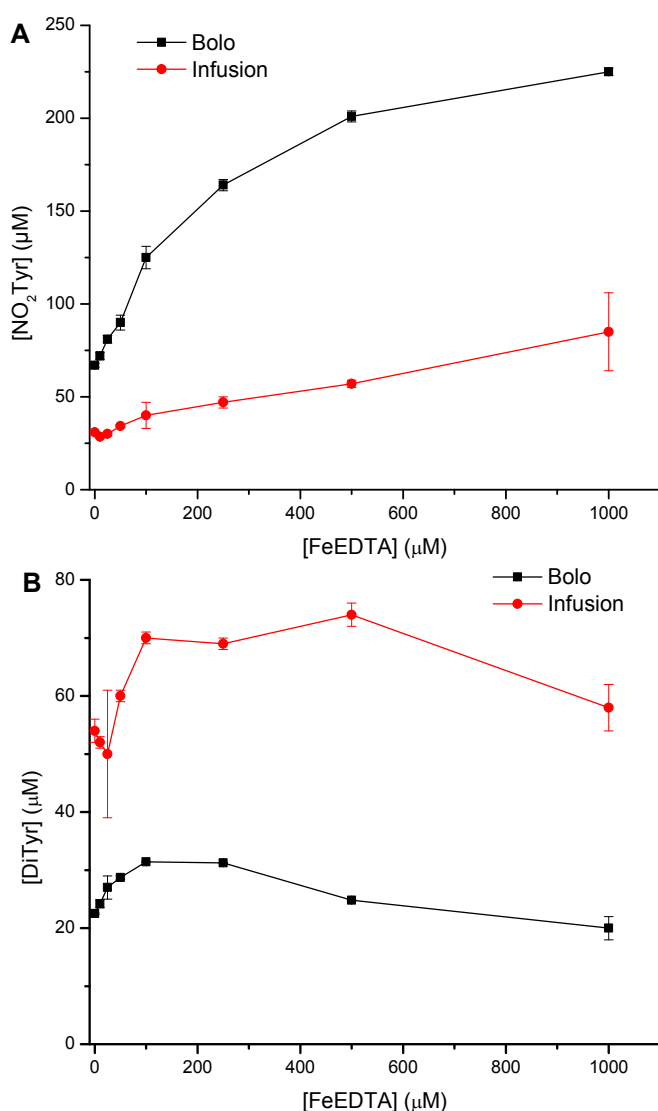


Figura 5.4. Curva dosis-respuesta para nitración y oxidación de tirosina por ONOO^- en presencia de FeEDTA. Se realizó la reacción entre tirosina (0,5 mM) y ONOO^- (0,5 mM, agregado en bolo o como infusión continua, a un flujo de 33 $\mu\text{M}/\text{min}$) en buffer fosfato pH 7,3 en presencia de distintas concentraciones del complejo metálico FeEDTA (10 – 1000 μM). **(A)** Concentración de NO_2Tyr formada tras la reacción en función de la concentración de complejo metálico, para agregado de ONOO^- en bolo o en infusión. **(B)** Niveles de ditirosina formada en función de la concentración de FeEDTA, para agregado en bolo o infusión del ONOO^- .

Cuando el agregado del ONOO^- se hizo en forma de infusión lenta, se observó también un incremento en los niveles de NO_2Tyr en función de la concentración de FeEDTA (Figura 5.4A); sin embargo, este aumento fue mucho menos

pronunciado que para el agregado del ONOO^- en bolo, aumentando los rendimientos de nitración de un 6% a un 17%. Es destacable el hecho de que frente al agregado por infusión lenta, los niveles de nitración obtenidos en ausencia y presencia del complejo metálico son considerablemente menores que los que se obtuvieron para iguales condiciones pero con agregado en bolo del ONOO^- . Además, el aumento observado en este caso, además de ser menos pronunciado, fue apreciable recién a concentraciones de FeEDTA mayores a 50 μM . Los rendimientos de formación de ditirosina fueron considerablemente mayores cuando el ONOO^- fue agregado como infusión respecto al agregado en bolo, y presentaron de modo similar un incremento al aumentar la concentración de FeEDTA (Figura 5.4B). Sin embargo, al igual que para la nitración, el aumento en los niveles de DiTyr cuando el oxidante fue agregado en forma de flujo continuo se observó para concentraciones de FeEDTA mayores a 50 μM y no para los valores iniciales.

De igual modo a lo realizado para FeEDTA, se realizó la reacción entre tirosina y ONOO^- (agregado en bolo o infusión) en presencia de distintas concentraciones de la porfirina de manganeso MntBAP (2,5 – 100 μM) y se determinó la cantidad de producto formado luego de la misma; los resultados de lo mismo se expresan en la Figura 5.5. En todo el rango de concentraciones del complejo usadas, se observó un incremento importante en los niveles de nitrotirosina formada al aumentar la concentración de MntBAP, tanto para el agregado en bolo como en infusión del peroxinitrito (Figura 5.5A). Así como ocurrió para el complejo FeEDTA, el aumento en la nitración mediada por el complejo metálico fue más pronunciado para el agregado del ONOO^- en bolo (aumento del rendimiento de nitración de un 10% a un 35%) que para el agregado en infusión (incremento del rendimiento de NO_2Tyr de un 6% a un 16%). Si bien en presencia de FeEDTA se llegaron a obtener rendimientos de nitración mayores (45% vs 35% para agregado en bolo del ONOO^-), esto se dio para concentraciones mucho más altas de FeEDTA que las usadas de MntBAP. Si se compara en el intervalo de concentraciones abarcado por ambos complejos (hasta 100 μM), se puede apreciar claramente como es mayor la capacidad de aumentar la nitración de tirosina del complejo MntBAP. La mencionada porfirina de manganeso aumenta de manera importante los rendimientos de nitración incluso a concentraciones muy bajas de la misma, indicando que tiene una gran capacidad para promover las reacciones de nitración incluso a concentraciones muy bajas (p. ej. 5 μM). Esto mismo puede apreciarse también al observar cómo, al agregar el peroxinitrito en infusión, se consiguen aumentar los niveles de NO_2Tyr incluso para las concentraciones más bajas usadas de MntBAP, a diferencia de lo que ya

se remarcó que ocurría cuando se agregaba el ONOO^- en infusión en presencia de FeEDTA.

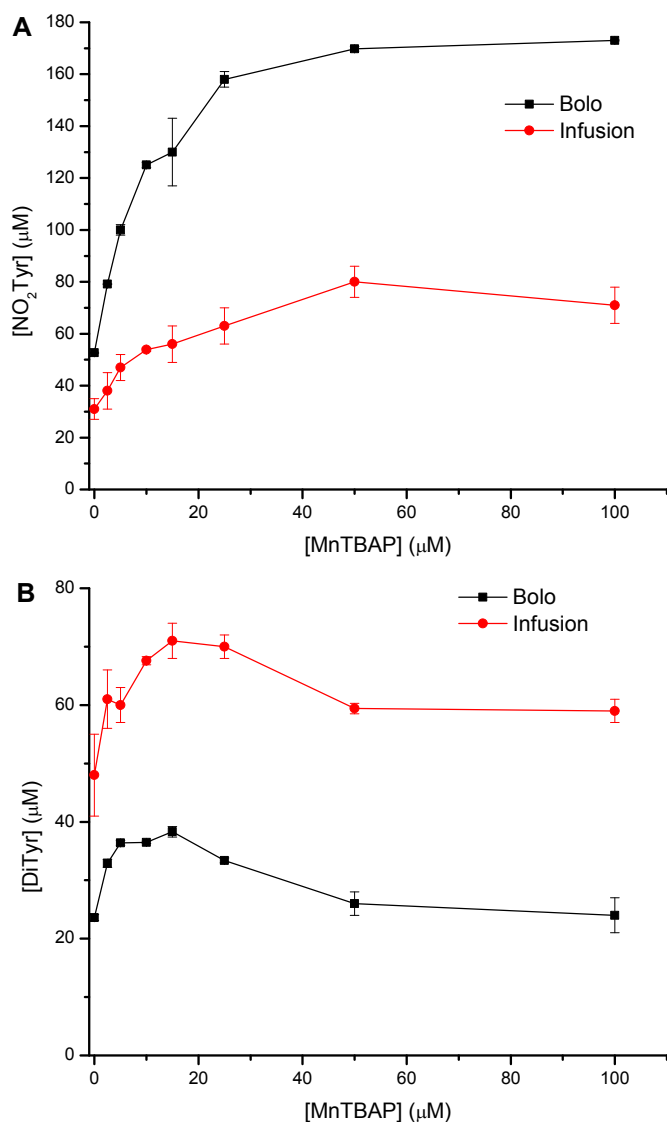


Figura 5.5. Nitración y dimerización de tirosina por ONOO^- en presencia de distintas concentraciones de MnTBAP. Se cuantificaron los niveles de NO_2Tyr y DiTyr formados tras reacción entre tirosina (0,5 mM) y ONOO^- (0,5 mM) en buffer KPi pH 7,3 en presencia de MnTBAP (2,5 – 100 μM). El ONOO^- se agregó tanto en bolo como en infusión lenta a 33 $\mu\text{M}/\text{min}$ (0,5 mM concentración final agregada de ONOO^-). **(A)** Formación de 3-nitrotirosina en presencia de las distintas concentraciones de MnTBAP utilizadas, para agregado en bolo o en infusión del peroxinitrito. **(B)** Formación de 3,3'-ditirosina por ONOO^- (agregado en bolo o infusión) en presencia de diferentes concentraciones de MnTBAP.

Tanto para el agregado del ONOO^- en bolo como para su adición en forma de infusión lenta, se observó un incremento en los niveles de DiTyr formada al aumentar la concentración de MnTBAP. Esto ocurrió para concentraciones de MnTBAP menores a 25 μM ; a concentraciones mayores, los niveles de ditirosina tendieron a descender. Nuevamente, se obtuvieron rendimientos de formación de ditirosina notablemente mayores (tanto en presencia como en ausencia de

complejo metálico) cuando el ONOO^- fue agregado en infusión lenta que cuando fue agregado en bolo.

Posteriormente, se midieron los niveles de formación de productos de oxidación de tirosina por reacción con ONOO^- en presencia de la otra porfirina de manganeso utilizada, MnTE-2-PyP, en concentraciones de 2,5 – 100 μM (Figura 5.6). Como se puede ver en la Figura 5.6A, se obtuvieron también niveles de NO_2Tyr mayores al aumentar la concentración del complejo metálico, tanto para la situación en que el oxidante fue agregado en bolo como cuando se lo agregó como infusión lenta. Para el caso de agregado en bolo, los mayores rendimientos de nitración (26% contra 11% en ausencia de complejo) se alcanzaron a 25 μM de MnTE-2-PyP; a concentraciones mayores, los niveles de NO_2Tyr se mantuvieron prácticamente constantes. Sin embargo, a diferencia de lo que pasaba para los complejos anteriores, se apreció para esta porfirina de manganeso un incremento mayor en los rendimientos de nitración cuando el peroxinitrito fue agregado como infusión lenta (26% rendimiento máximo contra 6% en ausencia del complejo). En este caso además, el mayor rendimiento de nitración se obtuvo para una concentración de 5 μM de MnTE-2-PyP, 5 veces menor de la que generó el mismo rendimiento máximo al agregar el ONOO^- en bolo. Además, la presencia de la menor concentración de complejo utilizada (2,5 μM) ya fue suficiente para generar un incremento en la concentración de NO_2Tyr de más de 4 veces (29 μM en ausencia de complejo y 122 μM en presencia de 2,5 μM de complejo). Si bien frente al agregado en infusión del ONOO^- el aumento en los niveles de producto nitrado es muy rápido y pronunciado respecto a la concentración de MnTE-2-PyP, a concentraciones de la misma mayores a 15 μM comienza a observarse un descenso en los niveles del mencionado producto.

De modo similar, la formación del producto de dimerización se vio en general aumentada a mayores concentraciones de la porfirina de manganeso (Figura 5.6B). Sin embargo, este comportamiento presentó algunas diferencias respecto a los casos anteriores. En primer lugar, para el caso de agregado en bolo del peroxinitrito, resulta destacable el hecho de que en todo el rango de concentraciones de MnTE-2-PyP utilizado, los niveles de DiTyr aumentaron, pasando los rendimientos de un 5% a un 13%. Esto contrasta con lo visto para FeEDTA y MnTBAP, donde si bien a concentraciones bajas de dichos compuestos los niveles de DiTyr aumentaban, a mayores concentraciones se veía un descenso en los niveles de ditirosina. Cuando el agregado de peroxinitrito se hizo como infusión lenta, el comportamiento obtenido fue un tanto diferente. La concentración de ditirosina formada disminuyó en presencia de bajas concentraciones de MnTE-2-PyP (2,5 a 10 μM), para luego volver a aumentar a

partir de concentraciones mayores del complejo. Si bien los rendimientos finales de ditirosina obtenidos para el caso de la infusión fueron similares a los obtenidos para el caso de agregado en bolo, el incremento neto en la concentración de ditirosina en presencia del complejo metálico no fue tan notorio en este caso: se pasó de un 11% a un valor de 14%. Nuevamente se vio para este complejo que los rendimientos de nitración fueron menores (en ausencia de la porfirina de manganeso al menos) cuando el ONOO⁻ se agregó en forma de infusión respecto a cuando fue agregado en bolo, mientras que lo opuesto ocurrió con los rendimientos de dimerización.

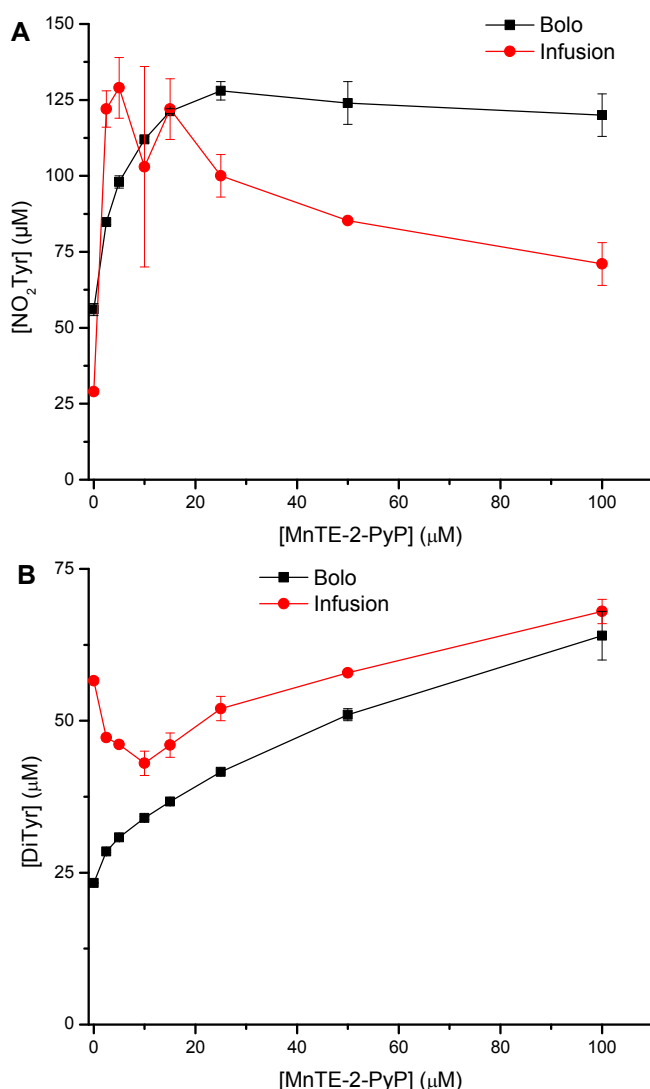


Figura 5.6. Efecto del complejo MnTE-2-PyP sobre la nitración y dimerización de tirosina por ONOO⁻.

En presencia de distintas concentraciones de la porfirina de manganeso MnTE-2-PyP (2,5 – 100 μM), se llevó a cabo la reacción entre tirosina (0,5 mM) y ONOO⁻ (0,5 mM) agregado en bolo o en flujo de 33 μM/min, en buffer KPi 100 o 150 mM (según si el ONOO⁻ se agregó en bolo o como infusión, respectivamente) pH 7,3. Se determinó tras las mismas la concentración de productos de nitración y dimerización por HPLC. **(A)** Cuantificación de NO₂Tyr formada en función de la concentración de MnTE-2-PyP. **(B)** Cuantificación de DiTyr formada tras la reacción para las distintas concentraciones del complejo metálico.

Por último, se evaluó de modo similar el efecto de distintas concentraciones de hemina (0,5 – 25 μM) sobre los niveles de nitración y dimerización de tirosina

por peroxinitrito (Figura 5.7). Cuando el peroxinitrito fue agregado en bolo, la hemina incrementó de manera dosis-dependiente los rendimientos de formación de nitrotirosina de un 9% a un 17% (Figura 5.7A). Ya incluso a concentraciones muy bajas (menores a $1\ \mu\text{M}$) fue apreciable el efecto de la hemina sobre la nitración de tirosina, que produjo los mayores rendimientos a una concentración de $10\ \mu\text{M}$. A mayores concentraciones, los rendimientos dejan de aumentar, observándose un leve descenso a la mayor concentración de hemina probada. Este efecto no pudo observarse cuando el peroxinitrito se agregó como infusión lenta ($25\ \mu\text{M}/\text{min}$); los niveles de NO_2Tyr apenas mostraron un aumento muy leve para concentraciones bajas de hemina, retornando a los valores iniciales a mayores cantidades del complejo metálico.

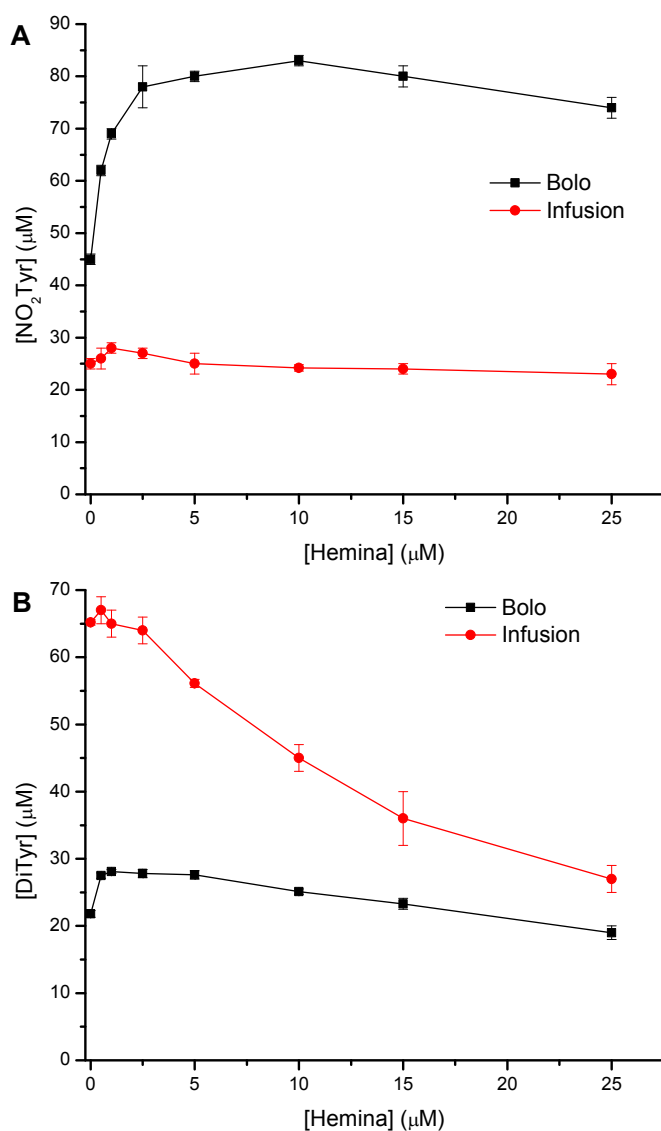


Figura 5.7. Curva dosis-respuesta para nitración y dimerización de tirosina por ONOO^- en presencia de Hemina. Se llevó a cabo la reacción entre tirosina ($0,5\ \text{mM}$) y ONOO^- ($0,5\ \text{mM}$, agregado en bolo o como infusión continua, a un flujo de $25\ \mu\text{M}/\text{min}$) en buffer fosfato pH 7,3 100 o 150 mM (para agregado en bolo o en infusión del ONOO^- , respectivamente) en presencia de diferentes concentraciones de hemina ($0,5 - 25\ \mu\text{M}$). **(A)** Niveles de NO_2Tyr obtenidos tras la exposición de tirosina a ONOO^- para las distintas concentraciones de hemina probadas. **(B)** Formación de ditirosina tras la reacción en función de la concentración de hemina.

En la Figura 5.7B se representan los niveles de DiTyr obtenidos para las diferentes condiciones. Como puede observarse, la hemina no produjo un incremento importante en la concentración de ditirosina formada tras la reacción, tanto para el agregado en bolo como en infusión del peroxinitrito. En el caso de agregado en bolo se ve un leve aumento al principio de los rendimientos de dimerización, que luego fue disminuyendo lentamente hasta que a 25 μM de hemina los niveles de DiTyr fueron menores que en ausencia de dicho complejo. Para la situación de agregado del ONOO⁻ como infusión lenta, si bien a las concentraciones más bajas de hemina hubo un aumento apenas apreciable, la tendencia general fue a disminuir. A concentraciones de hemina mayores a 2,5 μM , el descenso en los niveles de ditirosina fue muy pronunciado, llegando a ser a 25 μM de hemina menos de la mitad del valor inicial. Un hecho a mencionar es que la infusión de peroxinitrito aplicada a estas muestras fue más lenta que las aplicadas a las anteriores (25 $\mu\text{M}/\text{min}$ para este caso contra 33 $\mu\text{M}/\text{min}$ de los casos anteriores). Esta diferencia puede generar que se obtengan rendimientos de formación de productos levemente distintos respecto a los experimentos anteriores, sobre todo al contemplar la situación control (en ausencia de complejo metálico). Por ejemplo, en la condición sin complejo metálico, los rendimientos de nitración fueron de un 6% cuando el flujo utilizado fue de 33 $\mu\text{M}/\text{min}$, siendo levemente menor (5%) para un flujo de 25 $\mu\text{M}/\text{min}$. Para el caso de los rendimientos de dimerización, hubo una diferencia un poco más notoria: 11% para el caso de un flujo de 33 $\mu\text{M}/\text{min}$ y 13% para cuando el flujo fue de 25 $\mu\text{M}/\text{min}$. Si bien en términos de porcentaje parecen diferencias mínimas, un 1% representa una concentración de compuesto de 5 μM , que comparado con los niveles obtenidos de productos, representa una fracción considerable.

5.4. Estudio de la cinética de reacción entre el complejo FeEDTA y el ONOO⁻

De acuerdo al método ya mencionado, se estudió la cinética de la reacción entre el peroxinitrito y el complejo metálico FeEDTA, con el objetivo de determinar la constante de velocidad de dicha reacción. En presencia de un exceso de 5 a 20 veces de FeEDTA respecto al ONOO⁻, la nitración del p-HPA (seguida a 432 nm) presentó una cinética de pseudo-primer orden. Obteniendo el valor de la constante observada para cada exceso de complejo metálico empleada se determinó la constante de velocidad de reacción de segundo orden, mediante la pendiente del gráfico k_{obs} vs [FeEDTA] (Figura 5.8). Se determinó de este modo un valor de constante de velocidad de $3490 \pm 20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,3 y 37°C.

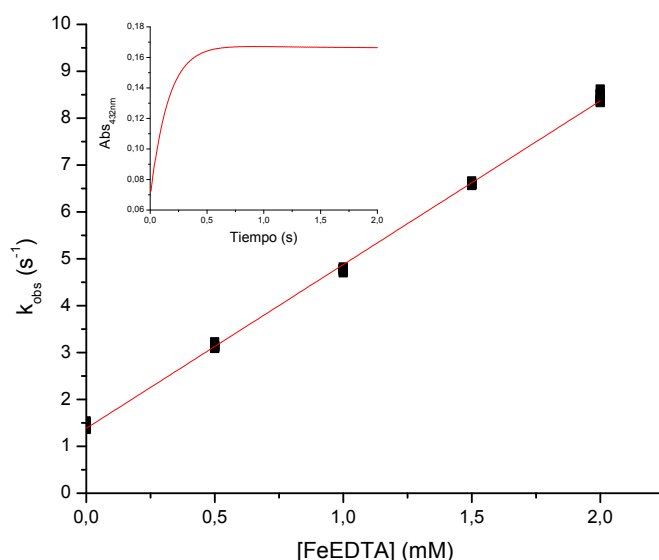


Figura 5.8. Determinación de la constante de velocidad de la reacción entre FeEDTA y el ONOO^- . Se mezcló rápidamente peroxinitrito (0,1 mM) con distintas concentraciones del complejo FeEDTA (0,5 – 2 mM) en buffer fosfato 100 mM pH 7,3 y 2 mM p-HPA a 37°C y se siguió la reacción a 432 nm (aparición del producto nitrado). Los datos se ajustaron a una función exponencial simple y se determinó la k_{obs} para cada concentración de complejo (Inset). A partir de la pendiente del gráfico k_{obs} vs $[\text{FeEDTA}]$ se determinó la constante de velocidad de reacción.

5.5. Efecto del pH sobre la formación de productos de nitración y oxidación de tirosina por ONOO^-

Se estudió a continuación el efecto del pH sobre los rendimientos de formación de los distintos productos de oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito, tanto en ausencia como en presencia de los complejos metálicos capaces de promover este tipo de modificaciones. Se abarcó el rango de pH entre 5,5 a 8,5 utilizando siempre soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio 100 mM, de fuerza iónica constante (mediante el agregado de NaCl). Cuando fue realizado en ausencia de complejos metálicos, los distintos buffers contuvieron además 0,1 mM DTPA. En la Figura 5.9 se muestra el resultado obtenido para la formación de DOPA, DiTyr y NO_2Tyr en función del pH tras reacción entre la tirosina y el ONOO^- , en ausencia de metales de transición.

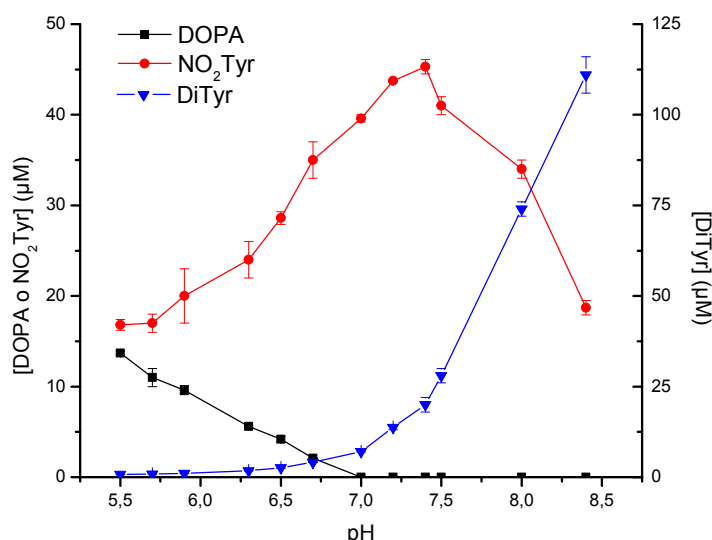


Figura 5.9. Formación de productos de oxidación y nitración de tirosina por ONOO^- a distintos valores de pH. Se efectuó la reacción entre tirosina (0,5 mM) y ONOO^- (0,5 mM) en KPi 100 mM con 0,1 mM DTPA en el rango de pH 5,5 – 8,5. Se cuantificó para cada valor de pH la formación de los productos DOPA, DiTyr y NO_2Tyr por HPLC de fase reversa. El valor de pH reportado corresponde al pH determinado para cada muestra luego de realizada la reacción.

Como puede observarse en la Figura 5.9, la distribución en función del pH de la formación de productos es diferente para cada compuesto de los analizados, presentando cada uno un comportamiento característico. En primer lugar, se ve que la 3-nitrotirosina presenta una distribución en forma de campana, que alcanza los valores máximos de rendimiento en la región de pH fisiológico (pH 7,4). A valores de pH más ácidos o más alcalinos, los rendimientos de nitración disminuyen rápidamente, cayendo a menos de la mitad del valor máximo en los extremos de la curva. El producto de hidroxilación de la tirosina (DOPA) pudo únicamente ser detectado a valores de pH ácidos, siendo indetectable a partir de pH mayores o igual a 7. Los rendimientos de formación de dicho producto presentaron una clara tendencia a aumentar a medida que el pH se torna más ácido. De todos modos, en el intervalo estudiado, los niveles del mismo fueron siempre menores que los de NO_2Tyr , si bien a pH 5,5 se obtuvieron niveles similares. Esto sugiere que si se ampliara el rango de pH a valores aún más ácidos, probablemente el producto mayoritario formado fuera la DOPA. Por el contrario, la ditirosina presentó una tendencia netamente opuesta. A valores de pH ácido, apenas fue detectable, pero sus niveles aumentaron rápidamente al ir

hacia valores de pH alcalinos, de tal manera que a pH mayor a 8 fue el principal producto detectado.

Esto mismo fue evaluado a continuación en presencia de los distintos complejos metálicos evaluados previamente. Se muestra en la Figura 5.10 la cuantificación de NO_2Tyr y DiTyr en función del pH tras la reacción entre tirosina y peroxinitrito en presencia de los distintos complejos metálicos.

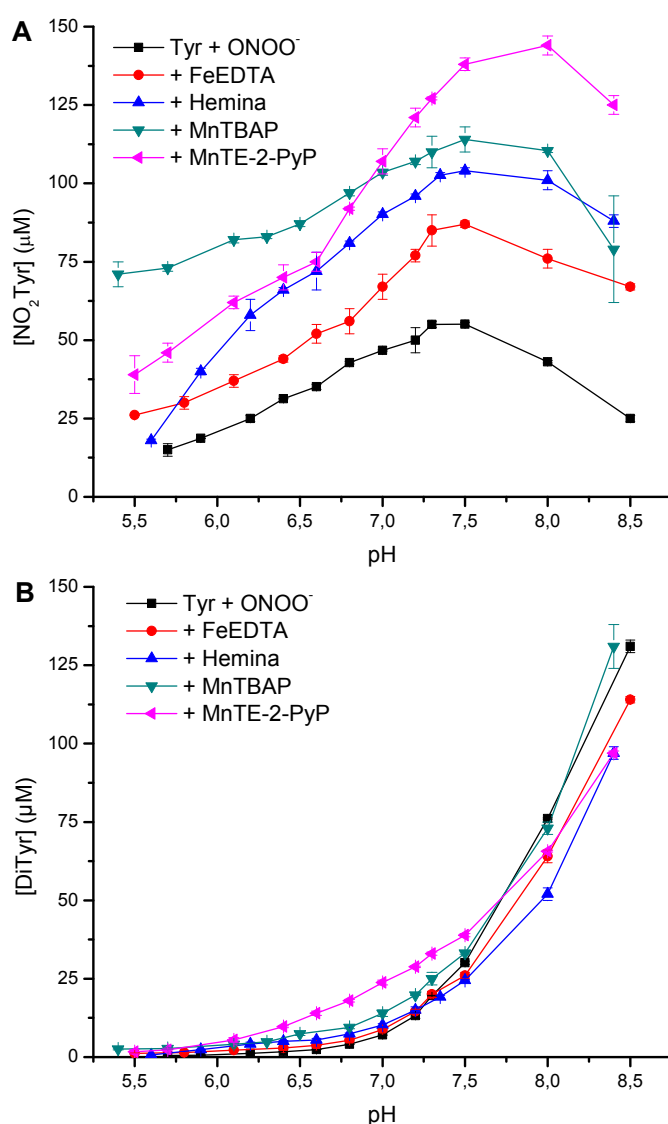


Figura 5.10. Efecto del pH sobre la nitración y dimerización de tirosina por ONOO^- en presencia de complejos metálicos. Se estudió la formación de NO_2Tyr y DiTyr por reacción entre tirosina (0,5 mM) y ONOO^- (0,5 mM) en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 5,5 – 8,5 en presencia de distintos complejos metálicos. Las concentraciones de dichos complejos fueron 0,1 mM para FeEDTA y 25 μM para Hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP. Se muestra también el resultado para la condición sin complejo metálico. **(A)** Formación de NO_2Tyr en función del pH en ausencia y presencia de los distintos complejos metálicos. **(B)** Niveles de dimerización de tirosina obtenidos según el pH para los cuatro complejos evaluados.

En presencia de los distintos complejos metálicos evaluados, los niveles de nitrotirosina formada tras la reacción presentaron una distribución en el intervalo de pH usado bastante similar a la obtenida en ausencia de los mencionados complejos (Figura 5.10A). Para los cuatro complejos evaluados, los rendimientos de nitración fueron siempre mayores que los obtenidos en

ausencia de los mismos, indicando que su efecto de incrementar la formación de producto nitrado se mantiene en un amplio intervalo de pH. Una diferencia que se apreció en las curvas en presencia de metal respecto a la obtenida en ausencia de los mismos es la disminución menos pronunciada que presentan los rendimientos de nitración al ir hacia los pH más alcalinos (es decir, la parte descendente de la campana que se ve a pH alcalino). Esto generó que la forma de campana que se obtiene para la nitración a diferentes valores de pH en ausencia de metales se deformara un poco cuando había complejos metálicos presentes en la reacción. Este fenómeno fue más notorio para la porfirina de manganeso MnTE-2-PyP, que generó que el rendimiento de nitración máximo se obtuviera a pH 8,0 y no a pH 7,4.

A diferencia de lo visto para la formación de nitrotirosina, los niveles de DiTyr en función del pH fueron prácticamente iguales en ausencia que en presencia de los complejos metálicos (Figura 5.10B). Es decir, no se observaron diferencias importantes en los rendimientos de formación ni tampoco en la distribución a lo largo del pH de los mismos. Esto es consistente con lo visto previamente, pues la presencia de complejos metálicos no afectaba de manera muy importante los rendimientos de dimerización, como si lo hace con los de nitración.

Por último, se compararon los rendimientos de formación de DOPA a valores de pH ácido en presencia de Hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP con los obtenidos en ausencia de los mismos (Figura 5.11). En presencia de cualquiera de los tres complejos metálicos, hubo una inhibición notoria de la formación del producto de hidroxilación. Solo se logró detectar DOPA para los dos valores de pH más ácido en presencia de metales, cuando en ausencia de los mismos recién a pH 7 dejaba de detectarse; además, cuando se pudo cuantificar, los niveles de la misma fueron siempre menores en presencia de los complejos metálicos que en ausencia de ellos.

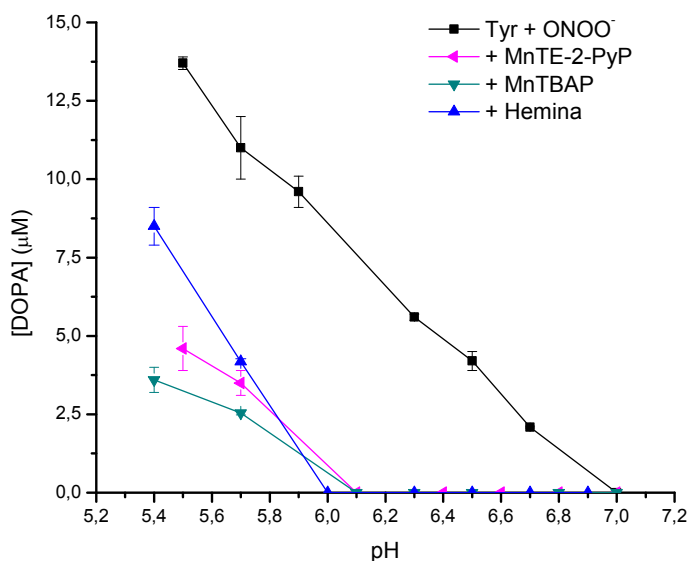


Figura 5.11. Formación de DOPA a valores de pH ácidos en presencia de complejos metálicos. Se cuantificó la DOPA formada por reacción entre tirosina (0,5 mM) y peroxinitrito (0,5 mM) en buffer KPi 100 mM a pH menor a 7. La reacción se realizó tanto en ausencia como en presencia de 25 μM de los complejos hemina, MnTBAP o MnTE-2-PyP.

5.6. Formación de NO_2Tyr y DiTyr por ONOO^- en presencia de Hemina-Albúmina

Habiendo visto que la hemina libre es capaz de incrementar la nitración de tirosina libre por peroxinitrito, se procedió a continuación a estudiar si la hemina unida a la albúmina sérica humana puede ejercer el mismo efecto. Para esto, se preparó el complejo HemHSA de acuerdo al método ya descrito. La caracterización del compuesto luego del procedimiento se realizó espectrofotométricamente (Figura 5.12). Como puede verse, tras la incubación de la HSA con la hemina, se obtuvo un espectro con nuevas características respecto al espectro inicial de la HSA y la hemina. El complejo resultante presentó un pico de absorbancia cerca de los 280 nm, característico de la proteína (ya presente en la HSA sola), pero además presentó un pico de mayor intensidad a 400 nm aproximadamente. Dado que la hemina en solución alcalina presenta un espectro con un pico ancho cercano a los 385 nm no muy intenso, la formación del pico a 400 nm, de alta intensidad y más estrecho que se observó para la mezcla, es un indicativo de que hubo unión de la hemina a la HSA. Luego de su preparación, la concentración de HemHSA generada fue determinada por

el método del ácido bicinónico, empleando soluciones de BSA de concentración conocida para realizar una curva de calibración.

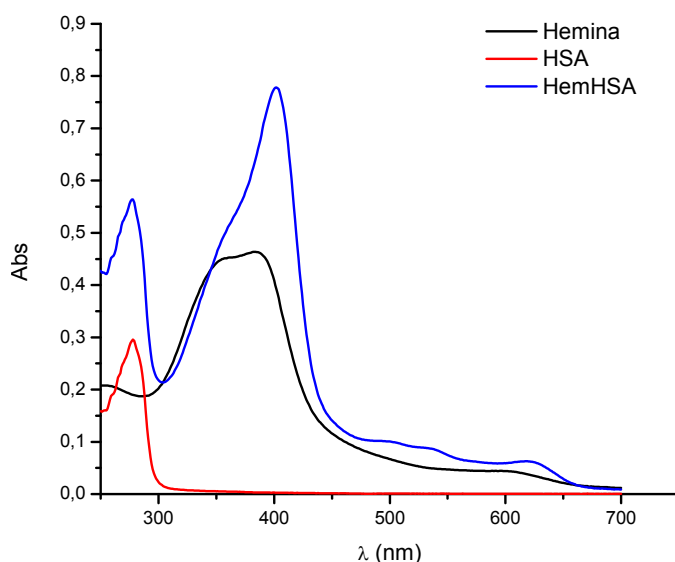


Figura 5.12. Caracterización espectrofotométrica de la formación del complejo Hemina-Albúmina. Se incubó HSA delipidada 1 mM con hemina 1,1 mM (preparada en NaOH) a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego, se separó la hemina libre por gel filtración y se recolectó la fracción correspondiente a la HemHSA. Se muestran los espectros entre 250-700 nm para 10 μ M hemina, 10 μ M HSA y 10 μ M HemHSA.

Una vez caracterizado el complejo formado, se realizó la reacción entre tirosina y ONOO⁻ en buffer KPi 100 mM pH 7,3 en presencia de distintas concentraciones de HemHSA (0,5 – 25 μ M). La mezcla de reacción se sometió a filtrado por centrifugación para remover la proteína y finalmente se analizó la muestra por HPLC de fase reversa y se cuantificó la formación de 3-nitrotirosina y 3,3'-ditirosina tras la reacción para las distintas concentraciones de HemHSA utilizadas. De igual modo, se realizó como control la determinación de los niveles de NO₂Tyr y DiTyr formados luego de la reacción pero en presencia de HSA, para conocer el efecto debido al componente proteico del complejo HemHSA. La Figura 5.13 muestra los resultados obtenidos de formación de productos para las distintas concentraciones de HemHSA o HSA. En presencia de HSA, los niveles de NO₂Tyr mostraron una disminución frente al aumento de la concentración de proteína, como era de esperarse. Sin embargo, esta inhibición no ocurrió cuando la reacción se hizo en presencia de HemHSA. Se observó un leve aumento en la

concentración del producto nitrado entre 0,5 y 5 μM de HemHSA, que luego descendió para mayores concentraciones del complejo. A excepción de la condición de 25 μM de HemHSA, en las restantes concentraciones usadas se observaron siempre rendimientos de nitración mayores para la reacción en presencia de HemHSA que en presencia de HSA, evidenciando un efecto de la hemina unida sobre la formación del producto de nitración (Figura 5.13A).

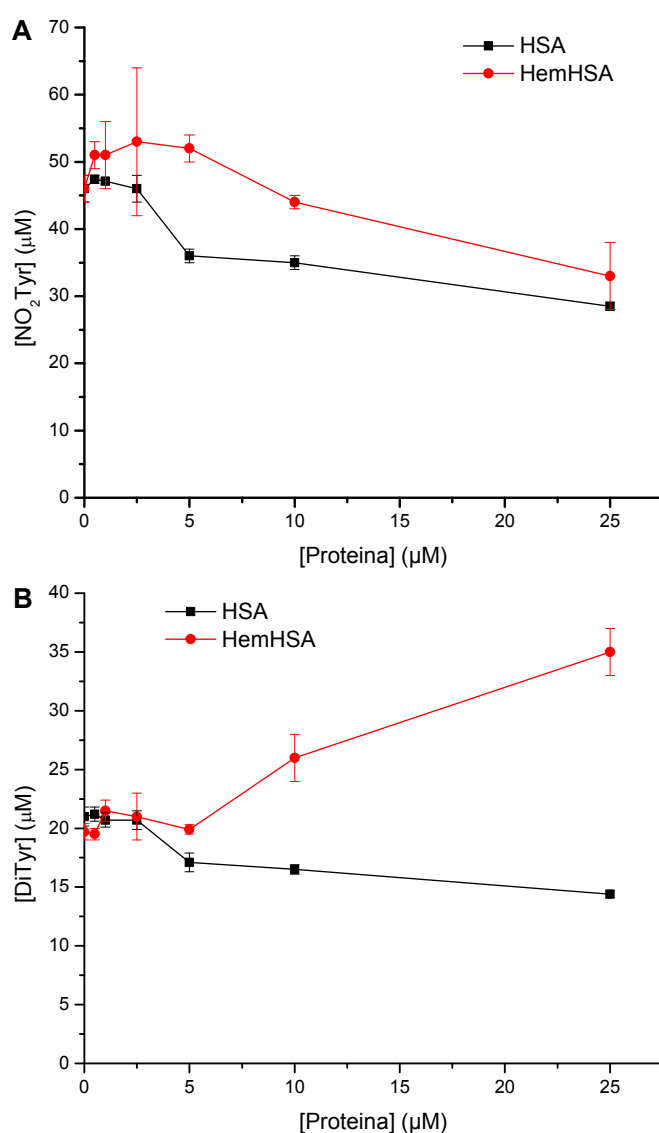


Figura 5.13. Formación de NO_2Tyr y DiTyr por reacción entre tirosina y ONOO^- en presencia de HemHSA y HSA.

En presencia de HemHSA o HSA (0,5 – 25 μM) se realizó la reacción entre tirosina (0,5 mM) y ONOO^- (0,5 mM, agregado en bolo) en KPi 100 mM pH 7,3. Luego de remover la proteína, la mezcla se analizó por RP-HPLC y se cuantificó la NO_2Tyr y la DiTyr formadas. **(A)** Niveles de 3-nitrotirosina determinados en función de la concentración de HSA o HemHSA presente. **(B)** Formación de DiTyr para las distintas concentraciones de HSA o HemHSA empleadas en el ensayo.

La formación de ditirosina en presencia de HSA presentó, al igual que para la formación de nitrotirosina, un descenso en función de la concentración presente de la proteína. En presencia de HemHSA, el comportamiento que se obtuvo fue

bastante diferente que la tendencia vista para el caso de la formación de NO₂Tyr. A bajas concentraciones de HemHSA (0,5 – 5 μM), los niveles de DiTyr se mantuvieron relativamente constantes. Sin embargo, a mayores concentraciones del complejo, se observó una clara tendencia a aumentar, obteniéndose a la mayor concentración de HemHSA un incremento en los rendimientos de dimerización de 4% a 7%, respecto a la condición sin complejo (Figura 5.13B). En este tramo del gráfico el resultado de formación de DiTyr fue muy diferente para el caso de la HemHSA respecto a la HSA, indicando que la hemina unida está teniendo algún efecto sobre la reacción de oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito. Dicho efecto se ve reflejado en los rendimientos de nitración para concentraciones de HemHSA bajas (menores a 5 μM) y en los rendimientos de dimerización a concentraciones de HemHSA más elevadas (mayores a 5 μM).

5.7. Nitración de HSA y HemHSA por ONOO⁻

Habiendo visto que la hemina libre es capaz de promover la nitración de tirosina libre por peroxinitrito, y que parte de este efecto se mantiene (aunque en mucha menor medida) para la hemina unida a albúmina humana, se procedió a estudiar la nitración de residuos de tirosina de la HSA cuando esta tiene unida o no hemina, para ver si la hemina, cuando está unida a la albúmina, es capaz de promover la nitración de residuos de tirosina de la propia proteína. Para esto, se sometió a la HSA y a la HemHSA a un tratamiento con diferentes concentraciones de peroxinitrito (agregado en bolo) y se realizó luego la detección de 3-nitrotirosina en la proteína empleando anticuerpos policlonales de conejo anti-NO₂Tyr. Previo a realizar el sembrado de las muestras tratadas con ONOO⁻ en la membrana de nitrocelulosa donde se efectuó el Dot-Blot, se extrajo la hemina de las muestras donde la HSA la tenía unida de acuerdo al método ya mencionado. Esto se realizó para evitar que la hemina interfiera en la detección de los residuos de tirosina nitrados por los anticuerpos o que, por sus propiedades espectroscópicas, inhiba la emisión de señal del anticuerpo secundario, que tiene unido como método de detección una molécula que emite fluorescencia en la zona del espectro electromagnético cercana al infrarrojo. Cuando las muestras de HemHSA tratadas con ONOO⁻ fueron sembradas en la membrana sin realizar la extracción de la hemina, no se observó señal de NO₂Tyr luego de realizado el Dot-Blot (Datos no mostrados); si bien esto podría haber sido porque realmente no hubo nitración, al repetir el procedimiento tras extracción de la hemina se consiguió detectar NO₂Tyr en el componente proteico, indicando que el resultado negativo se debía (al menos en parte) a una interferencia de la hemina. Entonces, luego de realizadas las reacciones y de extraer con acetona ácida la

hemina de la HemHSA, se realizó la detección de residuos de tirosina nitrados en la HSA de las distintas muestras (Figura 5.14).

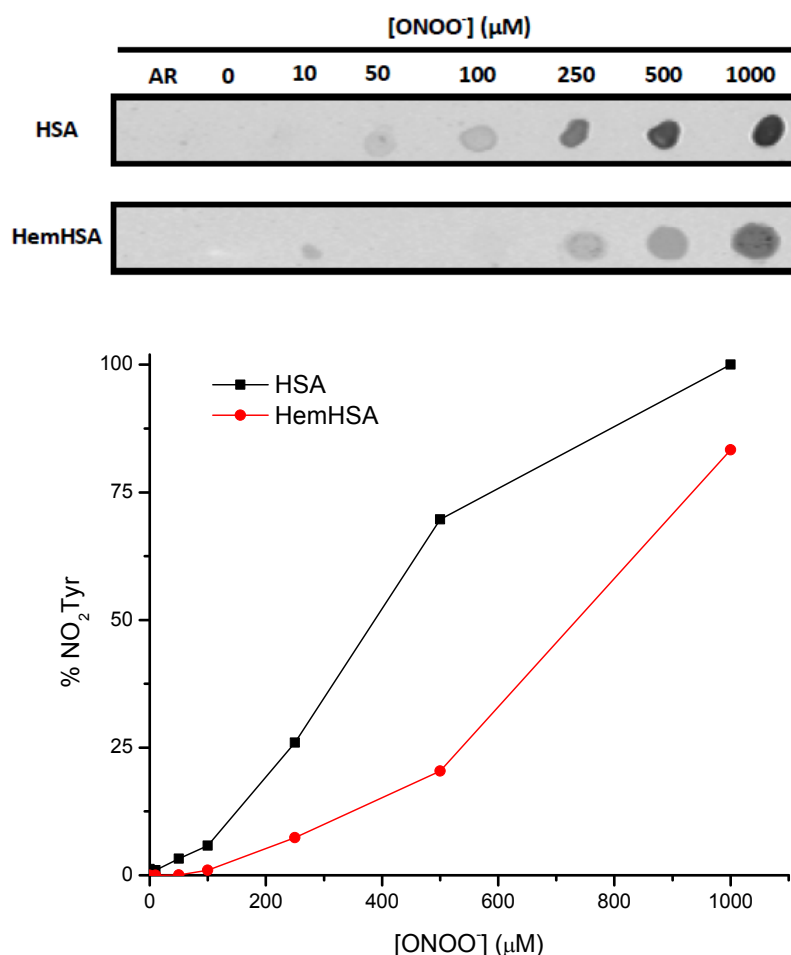


Figura 5.14. Formación de NO_2Tyr en muestras de HSA y HemHSA tratadas con ONOO^- . Se expuso HSA (0,1 mM) o HemHSA (0,1 mM) a diferentes concentraciones de ONOO^- (10 – 1000 μM ; AR: adición reversa de 1 mM ONOO^-) en buffer KPi 100 mM pH 7,3. Luego de realizada la reacción, se le removió la hemina unida a las muestras que contenían originalmente HemHSA y tras esto se cuantificó por el método del ácido bicinónico la albúmina remanente. Por último, se sembraron 2 μg de cada muestra en una membrana de nitrocelulosa y se realizó la detección de residuos de tirosina nitrados en la proteína empleando anticuerpos policlonales anti- NO_2Tyr . Se muestra en la figura un Dot-Blot representativo de cuatro experimentos independientes (imagen superior). La señal de NO_2Tyr detectada fue cuantificada por densitometría y graficada en función de la concentración de ONOO^- utilizada (imagen inferior) como porcentaje de NO_2Tyr formada, tomando como 100% la intensidad de la señal de la muestra de HSA tratada con 1 mM ONOO^- , es decir, la señal de mayor intensidad ($\% \text{NO}_2\text{Tyr} = (\text{Int. Señal} / \text{Int. Máxima}) \times 100$).

Como se ve en la Figura 5.14, para el caso de las muestras de HSA que fueron tratadas con ONOO⁻, se obtuvo un claro incremento en la cantidad de NO₂Tyr detectada a mayor concentración de peroxinitrito. A una concentración de 50 μM de ONOO⁻, ya se pudo observar una clara señal de nitrotirosina en la HSA; importantemente, no se vio señal para el caso de HSA sin tratar o tratada con la adición reversa del peroxinitrito. Las muestras de HemHSA que fueron tratadas con ONOO⁻ presentaron una señal correspondiente a la formación de NO₂Tyr en la proteína que también incrementó a mayores concentraciones de peroxinitrito utilizadas. Sin embargo, la intensidad de la señal para estas muestras fue siempre menor que la obtenida para las muestras de HSA tratadas con las correspondientes concentraciones de peroxinitrito, indicando que la formación de NO₂Tyr fue menor para la HemHSA tratada con ONOO⁻ que para la HSA. Recién a una concentración de ONOO⁻ de 250 μM fue detectable de manera importante una señal de nitrotirosina cuando la HemHSA fue la proteína presente, indicando no solo que dicha proteína se nitró aparentemente en menor magnitud sino que también precisó de concentraciones de peroxinitrito 5 veces mayores que la HSA para que sea detectable por esta técnica la presencia de NO₂Tyr en la proteína. Cuando las muestras fueron tratadas con 0,5 mM de ONOO⁻, la diferencia entre la señal de HSA nitrada y HemHSA nitrada fue máxima, pero ya para el tratamiento con 1 mM de ONOO⁻ los valores se aproximan considerablemente, sobre todo por tendencia a saturarse que presentó la formación de NO₂Tyr en la HSA al pasar de 0,5 a 1 mM de peroxinitrito.

6. Discusión

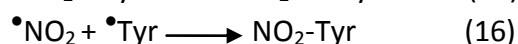
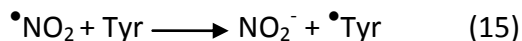
En fase acuosa, se estudió la formación de productos de nitración y oxidación de la tirosina tras reacción con peroxinitrito, haciendo énfasis en caracterizar el efecto de complejos de metales de transición sobre la formación de los mencionados productos. La cuantificación de productos formados tras realizar la reacción entre Tyr y ONOO⁻ se efectuó mediante HPLC de fase reversa (Figura 5.1), empleando el método ya descrito.

En primer lugar, se estudió la formación de NO₂Tyr y DiTyr tras reacción entre la tirosina y el peroxinitrito en buffer fosfato pH 7,3 variando la concentración inicial de ONOO⁻ (Figura 5.2A y B) o de Tyr (Figura 5.2C). Ambas variables produjeron un efecto similar sobre los niveles de formación de producto de

nitración y de dimerización si se las analiza en conjunto. Frente al agregado de 50-2000 μM ONOO^- , los rendimientos de nitración se mantuvieron prácticamente constantes; por el contrario, los rendimientos de formación de DiTyr disminuyeron rápidamente al aumentar la concentración de ONOO^- agregado. De modo similar, agregando igual cantidad de ONOO^- a diferentes concentraciones iniciales de Tyr (0,01-1 mM) se observó como los niveles de NO_2Tyr aumentaron rápidamente a concentraciones bajas de Tyr, manteniéndose constante a mayores concentraciones del sustrato. Por su parte, la DiTyr recién pudo ser detectada a una concentración de 0,1 mM de Tyr, y de ahí en más, aumentó de manera proporcional a la concentración inicial de tirosina puesta a reaccionar. En conjunto, estos dos resultados están indicando que, en condiciones de concentraciones de ONOO^- elevadas respecto a la cantidad de tirosina presente (concentración de peroxinitrito aproximadamente la mitad de la de tirosina o más), el principal producto que se forma tras la reacción es la NO_2Tyr , siendo los niveles de DiTyr menores. Cuando la cantidad de ONOO^- agregada es igual a la de tirosina (situación empleada en todos los experimentos posteriores), la cantidad de producto de dimerización que se forma es generalmente cerca de la mitad de la cantidad de NO_2Tyr que se forma. A partir de allí, a medida que aumenta la relación ONOO^-/Tyr , los niveles de NO_2Tyr continúan aumentando de manera proporcional mientras que los de DiTyr dejan de incrementarse, siendo muy marcada la diferencia de concentración entre los dos productos. No obstante, cuando la concentración de peroxinitrito agregada fue 10 o 5 veces menor que la de tirosina, la cantidad de DiTyr formada fue mayor que la de NO_2Tyr ; esto está indicando que, en condiciones de concentración de ONOO^- baja respecto a la Tyr inicial, está favorecida la formación de DiTyr respecto a la de ONOO^- , si bien esto se revierte rápidamente al aumentar la cantidad de oxidante. Similar a esto es el hecho de que cuando se varió la concentración de Tyr, se observó como a mayor concentración de tirosina inicial, los niveles de DiTyr aumentaron proporcionalmente, aún cuando la NO_2Tyr dejó de aumentar. Por lo tanto, se está observando con esto nuevamente como el incremento en la concentración inicial de tirosina respecto al ONOO^- agregado favorece la formación del producto de dimerización, existiendo situaciones donde incluso el principal producto formado es la DiTyr, siendo la NO_2Tyr un producto secundario. Este concepto coincide con estudios previos realizados por Pfeiffer *et al* [82], donde analizaron en detalle el hecho de que la capacidad de nitrar tirosina de $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2\bullet^-$ generados simultáneamente era mucho menor que la de soluciones de ONOO^- . En el mismo, vieron como la eficiencia de nitración de soluciones de

ONOO⁻ agregadas como infusión aumentaba al ser mayor la velocidad de infusión, y también como, frente al agregado en bolo de diferentes concentraciones de peroxinitrito, la formación de ditirosina predominaba sobre la de 3-nitrotirosina a bajas concentraciones de ONOO⁻. De estos resultados, concluyeron que, a concentraciones de estado estacionario de peroxinitrito bajas, la reacción de dimerización entre dos radicales tirosilo predomina sobre la reacción de formación de NO₂Tyr. Además de lo visto en la Figura 5.2, este mismo fenómeno queda reflejado en los experimentos de formación de NO₂Tyr y DiTyr en presencia de complejos metálicos (Figura 5.4-5.7), donde los niveles de producto de nitración y de dimerización formados (en la condición sin complejo metálico) tras la reacción fueron muy diferentes según si el peroxinitrito fue agregado en bolo o como infusión lenta. Consistentemente con lo planteado, cuando el ONOO⁻ en las reacciones fue agregado como infusión lenta (33 μM/min o 25 μM/min), los niveles de NO₂Tyr obtenidos fueron notoriamente menores que los obtenidos para igual condición pero con el ONOO⁻ agregado en bolo; en cambio, los niveles de DiTyr fueron mucho mayores que cuando se agregó el peroxinitrito en bolo. En el sistema acuoso simple utilizado, es posible explicar por qué se ve favorecida la reacción de dimerización a bajas concentraciones de ONOO⁻ y la nitración a mayores concentraciones de peroxinitrito. Considerando la situación en ausencia de complejos metálicos, la formación de radical tirosilo y posteriormente de nitrotirosina es llevada a cabo por los radicales derivados de la homólisis del ácido peroxinitroso (ONOOH), es decir, [•]OH y [•]NO₂. Ambas especies son capaces de oxidar por un electrón a la tirosina a radical tirosilo, con diferentes constantes de velocidad (ver Tabla II), dando inicio al proceso de oxidación y nitración de la tirosina. En una situación en la que se añade al sistema una concentración de peroxinitrito relativamente elevada (por ejemplo, agregado de ONOO⁻ en bolo, a una concentración similar a la de tirosina puesta a reaccionar), se generará como consecuencia una concentración de radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno alta; esta elevada cantidad de radicales, además de recombinar entre sí en reacciones secundarias, llevará a la rápida oxidación de la tirosina a radical tirosilo, alcanzándose niveles de [•]Tyr importantes rápidamente. Este paso de generación de radical tirosilo en este caso será llevado a cabo principalmente (al menos en primera instancia) por el [•]OH, pues reacciona más rápidamente con la tirosina que el [•]NO₂. Por lo tanto, luego de la homólisis del ONOOH, habrá una rápida generación de radical tirosilo por parte del radical hidroxilo principalmente. Si la cantidad de radical tirosilo que se genera en ese momento es relativamente elevada (como lo sería en la situación planteada de agregado en bolo del peroxinitrito), el [•]NO₂ generado a

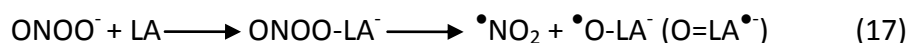
partir del ONOOH tendrá claramente dos reacciones en las cuáles participar con la tirosina:



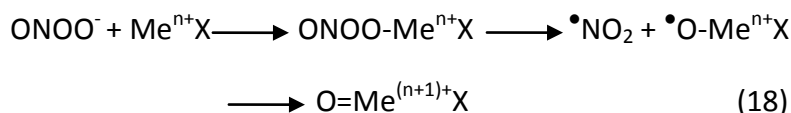
En primer lugar, el dióxido de nitrógeno podría actuar como oxidante de un electrón para oxidar a la tirosina a radical tirosilo (Ec. 15), con una constante de velocidad de $3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por otra parte, el $\bullet\text{NO}_2$ podrá reaccionar con los radicales tirosilo ya generados para formar NO_2Tyr (Ec. 16), en una reacción mucho más rápida ($k = 3,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Cinéticamente, la reacción del $\bullet\text{NO}_2$ con el radical tirosilo está ampliamente favorecida; sin embargo, la cantidad de dióxido de nitrógeno que seguirá esa ruta dependerá en última instancia de las concentraciones de tirosina y radical tirosilo existentes: a concentraciones de $\bullet\text{Tyr}$ generadas relativamente altas y concentraciones de tirosina no muy elevadas, la mayor parte del $\bullet\text{NO}_2$ reaccionará con radical tirosilo para generar 3-nitrotirosina. Esta situación sería la que más probablemente se generaría cuando las concentraciones de peroxinitrito agregadas son relativamente elevadas respecto a la cantidad de tirosina presente y por esto, en dicha condición experimental, predomina la nitrotirosina como producto principal de la reacción. Por el contrario, a concentraciones bajas de radical tirosilo y elevadas de tirosina, el $\bullet\text{NO}_2$ reaccionará preferentemente con la tirosina, generando radical tirosilo. Esto pasaría en condiciones experimentales donde se agregan bajas concentraciones de ONOO^- , elevadas concentraciones de tirosina o bien, cuando el peroxinitrito es agregado como infusión lenta (generando concentraciones de estado estacionario de ONOO^- bajas), donde la cantidad de radical tirosilo generado por acción del $\bullet\text{OH}$ sería relativamente baja respecto a la cantidad de tirosina presente. Como consecuencia, la mayor parte del $\bullet\text{NO}_2$ se consumiría en la reacción con la tirosina, generando $\bullet\text{Tyr}$, que al no tener mucho dióxido de nitrógeno disponible, recombinaría entre sí ($k = 2,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para generar como principal producto la 3,3'-ditirosina. En resumen, estos resultados muestran como, en numerosas condiciones, la DiTyr es un producto mayoritario de la reacción entre la tirosina y el ONOO^- , haciendo importante su cuantificación en este tipo de estudios para tener una noción más amplia de lo que ocurre cuando se busca estudiar la nitración de tirosina por peroxinitrito, sea en la tirosina libre como en péptidos o proteínas.

Luego de esto, se comenzó a evaluar la capacidad de distintos complejos metálicos de promover las reacciones de nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito. Se probaron complejos de metales de transición tanto con ligandos

biológicos como sintéticos; si bien el objetivo principal era identificar posibles complejos capaces de formarse *in vivo* que puedan promover la nitración y oxidación de Tyr por ONOO⁻, el uso de complejos sintéticos fue realizado de todos modos para aportar en el estudio de los mecanismos de reacción implicados. Del conjunto de complejos utilizados, solo cuatro tuvieron un efecto sobre los niveles de NO₂Tyr y DiTyr detectados tras la reacción entre Tyr y ONOO⁻ (Tabla III): FeEDTA, Hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP; se tratan de dos complejos de Fe³⁺ y dos de Mn³⁺, donde el único natural es la hemina, siendo los restantes sintéticos. El hierro libre (FeCl₃) o formando complejo con ligandos de interés biológico (Citrato, ADP, ATP y los aminoácidos Glutamato, Lisina e Histidina) no tuvieron efecto sobre los niveles de nitración y oxidación de tirosina; tampoco tuvo efecto el único complejo de Cu²⁺ preparado, CuEDTA. Para algunos de estos complejos se verificó además este comportamiento empleando un amplio rango de concentraciones de los mismos (Figura 5.3). Por su parte, para los complejos que aumentaron los rendimientos de nitración y dimerización, su efecto se estudió para diferentes concentraciones de los mismos y frente al agregado del ONOO⁻ en bolo o como infusión (Figura 5.4-5.7). En todos los casos se pudo observar cómo, frente al agregado en bolo de ONOO⁻, hubo un incremento dosis-dependiente de los niveles de NO₂Tyr formada frente a las distintas concentraciones de complejo. De modo similar, también se detectó un incremento en los niveles de DiTyr, pero esto solo ocurrió a concentraciones bajas de los complejos, observándose una disminución a concentraciones mayores. Primero que nada, estos resultados evidencian la capacidad de algunos complejos de metales de transición de participar en las reacciones de nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito, promoviendo este tipo de modificaciones y generando que los rendimientos de formación de productos, en particular de la NO₂Tyr, sean mayores que en ausencia de los mismos. El mecanismo por el cual estos complejos metálicos causan un incremento de los rendimientos de nitración y oxidación de tirosina por ONOO⁻ implicaría una reacción directa entre el peroxinitrito (sea la forma aniónica o la protonada) y el metal de transición del complejo, que actuaría como un ácido de Lewis (LA). Esto llevaría a la formación de un aducto de Lewis, el cuál luego experimentaría una ruptura homolítica para generar [•]NO₂ y el correspondiente oxi-radical; este último podría a continuación evolucionar al correspondiente radical del oxo-compuesto a través de la oxidación del ácido de Lewis (Ec. 17) [83].



Considerando la situación en estudio en que el ácido de Lewis es un complejo de bajo peso molecular de un metal de transición, las reacciones serían las siguientes (Ec. 18; las cargas de las especies involucradas no se especifican):



Como resultado de la reacción entre el peroxinitrito y los complejos metálicos que tuvieron efecto, se estaría generando $\bullet\text{NO}_2$ y una forma más oxidada del complejo, en la cual el hierro o el manganeso están en el estado de oxidación +4 formando el complejo oxo-metálico ($\text{O=Fe}^{4+}\text{X}$ y $\text{O=Mn}^{4+}\text{X}$). Estas dos especies generadas, como ya fue mencionado, son capaces de llevar a cabo la oxidación y la nitración de tirosina, lo que les brinda a estos complejos la capacidad observada de promover la nitración de tirosina por peroxinitrito. En ausencia de dichos compuestos, toda la nitración y dimerización observada en los experimentos proviene de la formación de $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ producto de la homólisis del ácido peroxinitroso; por esta vía, el rendimiento teórico máximo de formación de radicales hidroxilo e dióxido de nitrógeno libres para reaccionar es de un 30% (el 70% restante decae a NO_3^-), resultando en una capacidad limitada del peroxinitrito original para llevar a cabo la oxidación y nitración de la tirosina (aproximadamente un rendimiento de 9% de formación de NO_2Tyr obtenido en los distintos experimentos). En presencia de los complejos metálicos en cambio, el peroxinitrito agregado podría seguir dos rutas de decaimiento diferentes: por un lado la homólisis tras protonación, y por otro lado, la reacción con el complejo metálico, que deriva en la formación de dióxido de nitrógeno y el complejo oxo-metálico. La cantidad de ONOO^- que decae por cada ruta dependerá de la constante de velocidad de reacción entre el complejo metálico presente y el peroxinitrito, así como también de la concentración del compuesto metálico: estos dos factores determinan la velocidad de la reacción peroxinitrito-metal de transición ($v = k[\text{Me}^{n+}\text{X}][\text{ONOO}^-]$), indicando según las condiciones de cada experimento cuánto podrá competirle a la descomposición espontánea del ácido peroxinitroso ($v = k[\text{ONOO}^-]$, siendo $k = 0,9 \text{ s}^{-1}$ a 37°C y $\text{pH } 7,4$). Suponiendo por ejemplo una condición experimental tal que todo el peroxinitrito agregado reacciona directamente con el complejo metálico, se podrían generar las especies $\bullet\text{NO}_2$ y $\text{O=Me}^{(n+1)+}\text{X}$ con un 100% de rendimiento respecto a la concentración de peroxinitrito agregado, lo que significa que se forman especies capaces de promover la oxidación y la nitración de tirosina en cantidades mucho mayores que lo que se forman por homólisis del ONOOH (hasta un 30% de la

concentración inicial de peroxinitrito como máximo); esto traerá como consecuencia que los rendimientos de nitración sean mayores en presencia del complejo metálico que en ausencia del mismo. En dicha consideración, la cantidad de NO₂Tyr que se formará a partir de las especies $\bullet\text{NO}_2$ y $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$ generadas tras la reacción dependerá (al igual que para la nitración por radicales derivados de la homólisis del ONOOH) en gran medida de la capacidad de las mismas de participar en reacciones secundarias que no lleven a la oxidación y nitración de la tirosina (por ejemplo, la posible oxidación del ligando del complejo metálico). De este modo, al realizar la reacción entre tirosina y ONOO⁻ en presencia de metales de transición, la reacción directa entre el metal y el peroxinitrito competirá con la homólisis catalizada por protón del ONOO⁻, llevando esto a que se formen especies capaces de oxidar a la tirosina en una mayor cantidad respecto a lo que se formaría si todo el ONOO⁻ decayera por homólisis, existiendo así una mayor capacidad de oxidar y nitrar a la Tyr. El rendimiento final de formación de productos de oxidación y nitración será reflejo de la formación de $\bullet\text{NO}_2$ y $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$ por reacción entre el ONOO⁻ y el metal y de $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ por homólisis del ONOOH, lo que variará según la condición experimental (complejo metálico involucrado y concentración del mismo).

De todos los complejos evaluados, solo cuatro produjeron un efecto notorio sobre la formación de NO₂Tyr y DiTyr por reacción entre la tirosina y el peroxinitrito. Teniendo en cuenta los complejos que fueron preparados, resulta claro que la capacidad de un metal de transición redox-activo de promover este tipo de modificaciones de la tirosina por ONOO⁻ (a través de una reacción directa entre el metal y el peroxinitrito) depende del ligando con el cual esté coordinado. Por ejemplo, el hierro férrico formando complejo con aminoácidos, nucleótidos o citrato como ligandos, no tuvo ningún efecto, mientras que cuando se encontraba formando complejos con EDTA o protoporfirina IX (formando la hemina), sí produjo un efecto. Considerando que el efecto observado por los complejos metálicos es debido a la oxidación por un electrón de los mismos por el ONOO⁻, la dependencia del ligando puede deberse a dos factores, principalmente. En primer lugar, al ser la reacción entre el complejo metálico y el ONOO⁻ una reacción de oxidación-reducción, solo será termodinámicamente favorable si, en las condiciones experimentales, el potencial de reducción del par $\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}/\text{Me}^{n+}\text{X}$ es menor al potencial de reducción por un electrón del peroxinitrito a $\bullet\text{NO}_2$ (1,6-1,7 V). En el caso de los metales de transición, es bien sabido que el potencial de reducción de sus transiciones redox depende en gran medida de los ligandos que presente dicho metal: por ejemplo, el potencial de reducción estándar bioquímico de la transición Fe^{3+} a Fe^{2+} es de + 0,771 V para el

hierro libre, pero vale - 0,432 V para el hierro de la proteína Ferredoxina (donde se encuentra formando un centro ferro-sulfurado) [1]; de igual modo, el potencial de reducción del par $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ es de + 1,51 V para el manganeso acuoso, mientras que vale + 0,31 V para la misma transición pero del manganeso de la enzima MnSOD [83]. Por lo tanto, el efecto de los ligandos que se observó en el presente estudio podría deberse en parte a la modulación del potencial de reducción del par redox involucrado del complejo metálico ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}/\text{Fe}^{3+}$; $\text{Mn}^{4+}=\text{O}/\text{Mn}^{3+}$) por parte del ligando empleado en cada complejo. Dependiendo del ligando en cuestión, el efecto del mismo podría ser una disminución o un aumento en el potencial de reducción del metal de transición (para la transición entre el estado +3 y el estado +4), con lo cual, la oxidación del mismo por parte del ONOO^- sería menos o más favorable termodinámicamente, haciendo de este modo menos o más posible que el complejo metálico pueda participar en las reacciones de nitración y oxidación de tirosina. El otro factor que hay que considerar y que podría explicar el efecto del ligando sobre los resultados observados (tal vez incluso más que el aspecto termodinámico ya explicado) es el aspecto cinético de la reacción entre el ONOO^- y el centro metálico del complejo: incluso siendo termodinámicamente favorable la oxidación del metal por el ONOO^- , si la misma no es lo suficientemente rápida, no generará un efecto apreciable sobre los rendimientos de nitración y oxidación de tirosina. En este aspecto, más allá de poder afectar el potencial de reducción del par redox involucrado del complejo metálico, el ligando podría hacer que la reacción entre el metal y el ONOO^- sea cinéticamente más favorable (es decir más rápida) o desfavorable (más lenta), según el ligando en cuestión. Esto es particularmente relevante en el sistema en estudio, dado que el agente oxidante presenta una vida media muy corta y si la reacción con el complejo metálico no es lo suficientemente rápida, todo el ONOO^- decaerá espontáneamente antes de reaccionar con el metal. Por lo tanto, para que el complejo metálico provoque un incremento sobre los niveles de oxidación y nitración de tirosina por ONOO^- , debe reaccionar con el peroxinitrito lo suficientemente rápido como para competir con la descomposición espontánea del ONOOH ; de lo contrario, todo el peroxinitrito decaería de igual manera que en ausencia de metal, generando como máximo un 30% de $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ capaces de llevar a la nitración de tirosina en niveles normales. A pesar de estas dos consideraciones, que un ligando genere una reacción entre el complejo metálico y el ONOO^- termodinámica y cinéticamente muy favorable, no significa que genere un incremento en los niveles de formación de productos de oxidación y nitración de la tirosina mayor que un ligando que forme un complejo metálico cuya reacción con peroxinitrito

sea más lenta. El efecto final sobre los rendimientos de formación de productos no dependerá solo de que el complejo pueda reaccionar con una gran parte del ONOO⁻ sino también de posibles reacciones secundarias que puedan existir y que no lleven a la oxidación y nitración de la tirosina (por ejemplo, oxidaciones del ligando por parte de las especies $O=Me^{(n+1)+}X$ y $\bullet NO_2$), así como también de la cinética de la reacción posterior de oxidación de tirosina a radical tirosilo por parte del intermediario oxo-metálico formado, que determinará la proporción de dicho oxidante que generará radical tirosilo o decaerá en reacciones secundarias. En efecto, cuando el peroxinitrito fue agregado en bolo, no hubo una correlación entre los niveles máximos de formación de productos y la constante de velocidad de la reacción entre el complejo metálico estudiado y el ONOO⁻. Los rendimientos de nitración máximos se obtuvieron con el complejo FeEDTA, que alcanzó la saturación en aproximadamente un 45% de rendimiento de nitración para 1 mM de FeEDTA; como se determinó en este trabajo, dicho complejo no reacciona particularmente rápido con el ONOO⁻ ($k = 3490 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; este valor obtenido es consistente con el determinado previamente por Beckman *et al* [13]). En cambio, con complejos que reaccionan más rápidamente con el ONOO⁻, como las porfirinas de manganeso MnTBAP y MnTE-2-PyP, cuyas constantes de velocidad de reacción son de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $3,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente [84], se obtuvieron rendimientos de nitración máximos menores: 35% para MnTBAP y 26% para MnTE-2-PyP. En base a lo planteado previamente, más allá de la velocidad con la que reaccione el complejo con el ONOO⁻, la posible existencia de reacciones secundarias determinará también la cantidad de productos de oxidación de la tirosina que se podrán formar, y esto posiblemente sea lo que determine que para el complejo FeEDTA se alcancen rendimientos mayores que para las porfirinas de manganeso: el complejo sistema de dobles enlaces conjugados y grupos sustituyentes de las porfirinas de manganeso empleadas (Figura 4.1) probablemente sean blanco de las especies oxidantes formadas durante la reacción, pero no así la molécula de EDTA, compuesta por grupos carboxilo y amino así como también de enlaces carbono-carbono saturados (Figura 4.2). Por lo tanto, a concentraciones elevadas de las porfirinas de manganeso, las modificaciones oxidativas sobre la estructura de la porfirina podrían competir con las reacciones de oxidación de la tirosina, llevando a que los rendimientos de formación de productos de oxidación de tirosina dejen de incrementarse (o puedan incluso disminuir). Siguiendo con este razonamiento, es de esperar que para la hemina (cuya constante de velocidad de reacción con ONOO⁻ no está determinada) también ocurra lo mismo (Figura 4.2).

Cuando el agregado de peroxinitrito se hizo como infusión lenta, los niveles de NO_2Tyr fueron menores que frente al agregado en bolo, mientras que lo contrario se observó para los niveles de DiTyr ; el motivo de esto ya fue discutido previamente. Teniendo en cuenta esto, el aumento en los niveles de nitración que generaron los complejos en esta situación fue menos notorio que el visto cuando el ONOO^- se agregó en bolo. Esto se vio parcialmente compensado sin embargo por un mayor incremento en los rendimientos de dimerización, al menos para concentraciones no muy elevadas de los complejos. La excepción a este comportamiento fue la porfirina de manganeso MnTE-2-PyP . Para dicho complejo, se alcanzaron niveles de nitración máximos similares cuando el ONOO^- se agregó como infusión respecto a cuándo se agregó como bolo. Además, dicho máximo se alcanzó incluso a concentraciones más bajas del complejo para el agregado del ONOO^- en infusión, siendo el aumento entre la formación de NO_2Tyr en ausencia de MnTE-2-PyP y en presencia de la menor concentración de la misma ($2,5 \mu\text{M}$) muy notorio. Mayores concentraciones de complejo no generaron un incremento importante en la formación de NO_2Tyr , e incluso la tendencia fue más bien a disminuir. La explicación de este comportamiento característico podría deberse principalmente al hecho de que dicho compuesto presenta una constante de velocidad de reacción con ONOO^- muy elevada. A una concentración de $2,5 \mu\text{M}$ de MnTE-2-PyP , la reacción del peroxinitrito con dicho compuesto está ampliamente favorecida sobre la descomposición por homólisis del ONOO^- ($k[\text{MnTE-2-PyP}] = 85 \text{ s}^{-1}$ a 37°C , $k = 0,9 \text{ s}^{-1}$ a 37°C para decaimiento del ONOO^- por homólisis), resultando en que prácticamente un 99% del peroxinitrito se descomponga por reacción con el metal. Si ya a la concentración más baja empleada prácticamente todo el ONOO^- reaccionaría con el metal, resulta lógico que a mayores concentraciones de MnTE-2-PyP no se vea un aumento importante en los rendimientos de nitración. Esto sería así siempre y cuando existiera presente en todo momento una cantidad de complejo suficiente como para reaccionar con la cantidad de ONOO^- agregada; sin embargo, la concentración de ONOO^- agregada fue mucho mayor a $2,5 \mu\text{M}$ (fue $0,5 \text{ mM}$ final). Teniendo en cuenta esto, lo que estaría explicando la tendencia observada es el comportamiento catalítico de las porfirinas de manganeso: sufren una oxidación por un electrón tras la reacción con peroxinitrito, pero retornan a su estado inicial en presencia de sustratos oxidables como la tirosina (presente siempre en las reacciones), a la cual pueden oxidar por un electrón, quedando listas para volver a reaccionar con el ONOO^- . Considerando esto, cuando el peroxinitrito fue agregado como infusión (flujo de $33 \mu\text{M}/\text{min}$), la velocidad de ingreso del mismo al sistema fue lo suficientemente lento como para que una

concentración de 2,5 μM de la porfirina de manganeso reaccionara con el ONOO⁻ y posteriormente se volviera a reducir a expensas de la tirosina con la velocidad suficiente para que cuando la concentración de peroxinitrito agregada fuera mayor a 2,5 μM , la porfirina de manganeso se encontrara nuevamente en su estado original (como Mn^{3+}) y disponible para continuar reaccionando. De este modo, una concentración de MnTE-2-PyP de 2,5 μM podría reaccionar con 0,5 mM de ONOO⁻ agregada en flujo, explicando así que ya esa mínima concentración baste para generar un gran aumento en los rendimientos de nitración, y de que aumentos posteriores en la concentración no tengan un efecto importante. En el caso de agregado del peroxinitrito en bolo, no sería posible que pasara esto, pues la porfirina de manganeso se enfrenta instantáneamente con una concentración 0,5 mM de ONOO⁻ y no le es posible cumplir suficientes ciclos catalíticos para evitar que una parte importante del peroxinitrito se descomponga por homólisis. Por esto, cuando el peroxinitrito fue agregado en bolo, se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles de NO_2Tyr entre 2,5 y 25 μM de complejo.

Si bien el ligando de cada complejo metálico se vio que juega un rol determinante en la capacidad del metal de promover las reacciones de nitración y oxidación de tirosina por ONOO⁻, es también importante mencionar que el metal de transición implicado es igualmente relevante al momento de analizar los efectos generados por cada complejo. Esto se vio claramente en que el complejo Fe-EDTA fue capaz de incrementar los rendimientos de formación de productos de oxidación y nitración de tirosina notoriamente, pero el complejo Cu-EDTA no produjo el mismo efecto. En este trabajo únicamente complejos de Fe^{3+} y Mn^{3+} fueron capaces de producir un aumento en la producción de NO_2Tyr y DiTyr, mediante un mecanismo que implicaría la formación de estados de oxidación más elevados del metal ($\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$). Dicho mecanismo no sería aplicable para complejos de Cu^{2+} , ya que dicho metal es incapaz de formar los mencionados complejos oxo-metálicos. De todos modos, se ha visto en trabajos previos que ciertos complejos de Cu^{2+} son capaces de promover la nitración de compuestos fenólicos por peroxinitrito, aunque con una capacidad mucho menor que la de las porfirinas de manganeso [85]. Por lo tanto, el mecanismo exacto a través del cual los complejos de cobre pueden aumentar la nitración por ONOO⁻ es desconocido.

Para los cuatro complejos metálicos evaluados que tuvieron un efecto sobre los rendimientos de nitración y dimerización de tirosina por peroxinitrito, se estudió además el efecto del pH sobre dicha capacidad. La influencia del pH sobre la formación de productos de nitración y oxidación de tirosina por ONOO⁻

fue evidenciada desde los estudios iniciales de estas reacciones [13, 86] y confirmada en estudios posteriores [87, 88]. En todos los casos, el comportamiento observado es similar al que se obtuvo en este estudio (Figura 5.9). La explicación de este comportamiento radica principalmente en las características ácido-base de la tirosina (disociación del grupo fenol) y del peroxinitrito. Hacia valores de pH más alcalinos, existirá en solución una fracción mayor de tirosina en la forma fenolato ($\text{pK}_a = 10,1$). Dado que la oxidación por un electrón de la forma disociada de la tirosina es menos costosa energéticamente que la de la tirosina protonada (es decir, el potencial de reducción del par $\text{TyrO}^\bullet/\text{TyrO}^-$ es menor que el del par $\text{TyrO}^\bullet/\text{TyrOH}$) [89], la formación de radical tirosilo se ve favorecida, tanto por el hecho de que aumenta la cantidad de $\bullet\text{Tyr}$ que se genera por reacción entre la Tyr y el $\bullet\text{OH}$ (preferentemente una reacción de adición del radical hidroxilo sobre el anillo aromático de la tirosina) como por una mayor cantidad de $\bullet\text{NO}_2$ que oxida a la tirosina (pues el dióxido de nitrógeno oxida con mayor facilidad a la forma fenolato de la tirosina que a la forma protonada: $k = 3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,5 y $k = 2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 11,3 [90]) en lugar de reaccionar con los radicales tirosilo. Este incremento en la cantidad de $\bullet\text{Tyr}$ generado favorece su recombinación para formar 3,3'-ditirosina, y esto, junto con el hecho de que una gran parte del $\bullet\text{NO}_2$ se consumió en la reacción con tirosina, inhibe parcialmente la formación de 3-nitrotirosina; esto explicaría el gran aumento que se ve en la formación de DiTyr a valores de pH alcalinos, al tiempo que explica también el descenso observado en los niveles de NO_2Tyr a valores de pH mayores al fisiológico. A valores de pH ácidos, no existirá prácticamente nada de tirosina en la forma ionizada, con lo cual, la constante de velocidad de reacción entre el $\bullet\text{NO}_2$ y la tirosina será relativamente lenta, cercana al valor reportado para pH 7,5 (probablemente un poco más lenta pues a ese pH puede haber una mínima fracción de tirosina disociada). Entonces, por un lado, no se verá favorecida la generación de radical tirosilo por parte del dióxido de nitrógeno, el cual estará disponible para reaccionar con radicales tirosilo que se generen en la reacción o decaerá mediante reacciones secundarias; siendo así, la principal especie responsable de la oxidación de la tirosina será el radical hidroxilo. A pH ácido, el rendimiento de producción de radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno por homólisis del peroxinitrito será mayor que a valores de pH fisiológico (en promedio, un 30% del ONOO^- produce radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ a pH 5,5 siendo dicho porcentaje de un 10% a pH 7,5 [88]). Entonces, en condiciones ácidas, hay una mayor producción de $\bullet\text{OH}$ que en condiciones de pH fisiológico, y dicho radical hidroxilo media la oxidación inicial de la tirosina a radical tirosilo. Sin embargo, la reacción preferencial entre el $\bullet\text{OH}$ y la Tyr no es

la oxidación directa sino la reacción de adición, formando un intermediario que posteriormente podrá evolucionar a radical tirosilo (eliminándose H₂O) o a DOPA. Es así que, en condiciones ácidas, cuando la producción de [•]OH es mayor, habrá una mayor parte del aducto [•]OH-Tyr que decaerá formando DOPA y no radical tirosilo respecto a lo que ocurre a pH neutro o alcalino, donde la mayor facilidad con la que se oxida la tirosina favorece que dicho aducto decaiga a [•]Tyr [88]. Por estos motivos, a pH ácido se hace detectable el producto de hidroxilación (DOPA), que no pudo detectarse a valores de pH neutro o alcalino. Al favorecerse la formación de DOPA la generación de radical tirosilo disminuye respecto a valores de pH mayores, con lo cual se inhibe la formación de DiTyr (apenas fue detectable a los valores de pH más ácidos probados) y también disminuye la formación de NO₂Tyr, en concordancia con los resultados obtenidos. En la región de pH fisiológico, no predomina claramente ninguno de los efectos explicados hasta ahora, que llevan a una gran producción de DiTyr o a una producción importante de DOPA y tienden a disminuir los niveles de NO₂Tyr. Es por esto que a medida que el pH se acerca a 7,3-7,5, los niveles de NO₂Tyr aumentan hasta alcanzar el máximo de la curva en forma de campana; en dicha zona hay una buena producción de radical tirosilo por parte de los radicales derivados del ONOO⁻ (principalmente por parte del [•]OH), y al ser la reacción entre el [•]NO₂ y la tirosina relativamente lenta, se favorece que el [•]NO₂ reaccione con los radicales tirosilo generados, predominando así la NO₂Tyr como producto.

Esta distribución característica de la formación de productos de oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito implicaría que, *in vivo*, la principal modificación de los residuos de tirosina proteicos por ONOO⁻ sería la nitración para formar NO₂Tyr. No obstante, esta situación podría verse levemente modificada si se consideran compartimientos intracelulares donde el pH se aleja del fisiológico; por ejemplo, a nivel de la matriz mitocondrial, donde el pH es cercano a 8, la nitración podría verse disminuida al ser más favorable la reacción de oxidación de tirosina por el [•]NO₂. Del mismo modo, dentro de los fagosomas el pH puede alcanzar valores menores a 6, lo que haría que la hidroxilación de residuos de tirosina por ONOO⁻ adquiriera mayor relevancia. De todos modos, esta distribución de productos según el pH es característica de la tirosina libre, y en el caso de residuos de tirosina en proteínas podría ser diferente, al proveer esta un entorno particular a cada residuo de tirosina que podría favorecer la formación de alguno de los productos en particular (por ejemplo, podría pasar que la hidroxilación de un residuo de tirosina de una proteína ocurra a pH fisiológico en cantidades importantes).

Luego de haber caracterizado la formación de productos de oxidación y nitración de tirosina por ONOO^- en función del pH en ausencia de complejos metálicos, se evaluó el efecto de los complejos FeEDTA, Hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP sobre la variación en los niveles de formación de NO_2Tyr y DiTyr según el pH (Figura 5.10). Para todos los complejos se observó como los niveles de 3-nitrotirosina formada fueron mayores en presencia que en ausencia de los mismos a lo largo de todo el intervalo de pH evaluado. Además, la forma de las curvas de distribución de NO_2Tyr en función del pH fue básicamente la misma que para la condición de reacción sin complejos metálicos, alcanzando valores máximos en la región de pH fisiológico. Una de las diferencias que se puede ver más allá de esto es que la curva no mostró un descenso tan pronunciado luego de alcanzado el máximo al ir hacia valores de pH más alcalinos (puntos del gráfico correspondientes a pH 8,0 y 8,5) en las condiciones realizadas en presencia de los complejos respecto a la condición sin complejos metálicos. Es más, para el complejo MnTE-2-PyP, el rendimiento máximo de nitración se alcanzó a pH 8,0 y no a 7,4-7,5 que es lo que se obtuvo en los restantes casos. Este efecto puede deberse al hecho de que los complejos metálicos empleados reaccionen más rápido con el peroxinitrito anión que con la forma protonada. Siendo así, a valores de pH más alcalinos, si bien la formación de DiTyr se ve favorecida y bajan los rendimientos de nitración, al haber una fracción mayor del peroxinitrito en la forma ONOO^- , el complejo metálico tendría una capacidad mayor de reaccionar con el peroxinitrito, haciendo que una mayor parte del mismo decaiga por reacción con el metal generando así especies capaces de promover la nitración y dimerización de tirosina. Si bien por lo explicado anteriormente este fenómeno no es capaz de hacer que los niveles de NO_2Tyr continúen aumentando al hacerse más básico el pH, consigue atenuar un poco el rápido descenso que ocurre en los rendimientos de nitración a pH mayor al fisiológico en ausencia de complejo metálico. Estudios previos demostraron que de hecho las porfirinas de manganeso (entre ellas las empleadas en este estudio) reaccionan más rápido con el ONOO^- que con el ONOOH [84], por lo que esto perfectamente podría ser la causa de la observación mencionada anteriormente.

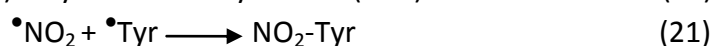
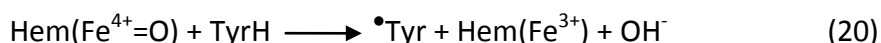
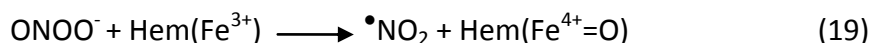
La formación de DiTyr a distintos valores de pH en presencia de los complejos metálicos no presentó diferencias respecto a la curva obtenida en ausencia de metales: los rendimientos de dimerización fueron prácticamente iguales en todo el intervalo de pH en presencia y en ausencia de metales, y la forma de las curvas fue idéntica. Esto podía esperarse si se tiene en cuenta que el efecto de los complejos metálicos sobre la formación de DiTyr no fue muy pronunciado ni presentó tendencias claras como sí ocurrió con la formación de NO_2Tyr .

En presencia de los complejos metálicos Hemina, MnTBAP y MnTE-2-PyP, la formación de DOPA a pH ácido se vio ampliamente inhibida (Figura 5.11), siendo detectable únicamente a los dos valores de pH más ácido y a niveles mucho menores que los obtenidos en ausencia de ellos. En base al mecanismo de nitración y oxidación de tirosina por ONOO⁻ mediado por los complejos metálicos planteado hasta el momento, esto era lo que se esperaba. Como ya se mencionó, el producto de hidroxilación de la tirosina surge por adición del radical hidroxilo al anillo fenólico de la tirosina y posterior decaimiento del aducto (mediante la pérdida de un electrón) para formar la DOPA; por lo tanto, la formación de dicho producto depende de una producción importante de $\bullet\text{OH}$. En presencia de los complejos de metales de transición sin embargo, el mecanismo de oxidación y nitración de Tyr sería independiente de la producción de radical hidroxilo, por lo cual tiene sentido que no se produzca DOPA. En lugar de descomponerse espontáneamente por homólisis, el ONOO⁻ reaccionaría con el metal generando el compuesto oxo-metálico y $\bullet\text{NO}_2$; el primero sería el principal encargado de oxidar a la tirosina por un electrón, para que posteriormente se adicione el $\bullet\text{NO}_2$ y se forme la 3-nitrotirosina. Este resultado claramente apoya el mecanismo planteado previamente.

Hasta este punto, se evaluó la capacidad de diversos complejos de metales de transición de bajo peso molecular de promover la oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito. De todos los evaluados, los únicos que produjeron el efecto mencionado fueron: FeEDTA, Hemina, MnTE-2-PyP y MnTBAP. Todos ellos produjeron un incremento dosis-dependiente de los rendimientos de nitración de tirosina, alcanzando rendimientos muy superiores a los obtenidos en ausencia de ellos; queda evidenciado sin lugar a duda la gran capacidad de ciertos complejos de actuar como potenciadores de la nitración de tirosina mediada por ONOO⁻. Además, el hecho de que en todos los casos fueran detectados niveles considerables de 3,3'-ditirosina (incluso a veces aumentados por los compuestos evaluados) está indicando claramente como el principal mecanismo de nitración de tirosina es de tipo radicalar, es decir, implica la oxidación por un electrón de la tirosina para formar radical tirosilo y la posterior adición al mismo del radical dióxido de nitrógeno. Si bien aun no puede descartarse por completo, resulta poco probable que un mecanismo de nitración mediado por metales de transición de tipo no radicalar (es decir, el de sustitución electrofílica aromática) esté operando en los sistemas estudiados, ya que la formación de productos y la dependencia del pH fueron siempre concordantes con un mecanismo dependiente de radicales libres.

De los compuestos que aumentaron los rendimientos de nitración de tirosina por ONOO^- , únicamente la hemina representa un ejemplo de relevancia biológica. Las porfirinas de manganeso MnTBAP y MnTE-2-PyP, pese a ser compuestos sintéticos, son relevantes desde un punto de vista farmacológico. En los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo, quedó claramente marcado como las porfirinas de manganeso en su estado Mn^{3+} P, pueden, en lugar de proteger, promover modificaciones oxidativas de biomoléculas dependientes de peroxinitrito (en este caso, la nitración de tirosina), mediante la generación de las especies altamente reactivas $\text{O}=\text{Mn}^{4+}\text{P}$ y $\bullet\text{NO}_2$ en cantidades importantes. Claramente, en condiciones intracelulares, dichas especies tendrían diversos blancos con los cuales reaccionar, por lo que el efecto final sería difícil de predecir, pero sin duda podría ocasionar un daño oxidativo importante, sobre todo en caso de que los niveles de antioxidantes celulares estén disminuidos (por ejemplo, de glutatión). Por lo tanto, el uso de estos compuestos como protectores del daño causado por el ONOO^- en diversas condiciones patológicas debe ser estudiado en detalle, pues la eficacia del tratamiento dependerá fuertemente de los niveles de agentes reductores en el paciente, para evitar que el ciclo catalítico de los mismos implique la oxidación de biomoléculas que cumplen funciones importantes. En este razonamiento, resulta clave el diseño de porfirinas de manganeso que sean fácilmente reducidas al estado +2 para minimizar la generación de especies reactivas durante la descomposición del ONOO^- y que la capacidad protectora aumente.

El efecto que tuvo la hemina sobre la oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito resulta interesante teniendo en cuenta que se trata de una molécula ampliamente distribuida en sistemas biológicos. Dicho compuesto fue capaz de incrementar los rendimientos de nitración de tirosina desde un 9% a un 17%, mediante un mecanismo que implica la reacción entre la hemina y el ONOO^- para generar la forma oxo-ferrilo de la hemina ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}\text{Hem}$) y $\bullet\text{NO}_2$, que median posteriormente la nitración de tirosina (Ecs. 19-21).



Este efecto de la hemina había sido previamente observado en bicapas lipídicas, donde se observó un notorio incremento en los rendimientos de nitración del análogo hidrofóbico de la tirosina *N*-*t*-BOC *tert*-butil éster L-tirosina (BTBE) incorporado en liposomas de fosfatidilcolina (PC) por peroxinitrito en

presencia de hemina [87]. En dicho trabajo se observó un incremento en los rendimientos de nitración del BTBE desde 3% a un 15% en presencia de 25 μM de hemina, cuando los liposomas estaban compuestos principalmente por ácidos grasos saturados. Esto representa un aumento en los niveles de formación del producto de nitración de unas 5 veces en presencia de hemina, lo cual significa un incremento mucho mayor que el observado para la nitración de tirosina en fase acuosa (incremento de prácticamente dos veces en presencia de hemina). Es decir, el efecto promotor de la nitración de tirosina por ONOO⁻ de la hemina es mucho más pronunciado en fases hidrofóbicas (por ejemplo, bicapas lipídicas y lipoproteínas) que en fases acuosas. Por un lado, esto puede deberse a la hidrofobicidad que presenta la hemina, que provocaría que dicho compuesto se concentre en las bicapas lipídicas y permanezca así en las proximidades del sustrato BTBE (o de los residuos de tirosina de proteínas de membrana, si consideramos una situación biológica), estando facilitada así la oxidación del mismo una vez que la hemina reaccionó con el peroxinitrito. Además, podría ocurrir que la oxidación de la hemina a la forma oxo-ferrilo esté favorecida en entornos hidrofóbicos, al resultar estabilizado este último; esto sería razonable si pensamos en que las enzimas que dependen de la formación de este tipo de intermediarios en grupos hemo de su sitio activo (por ejemplo, citocromo P450 y catalasa) suelen unir de manera no covalente al hemo en sitios hidrofóbicos de la proteína. Estas consideraciones, sumado al hecho de que los rendimientos de nitración de tirosina en membranas son normalmente menores a los que se obtienen en fase acuosa, podrían estar contribuyendo a que el incremento en los niveles de nitración causado por la hemina sea mucho mayor en fases hidrofóbicas que en fase acuosa.

Como ya se mencionó, prácticamente dos tercios del contenido de hierro total corporal de un adulto se encuentra en los grupos hemo de la hemoglobina, donde su potencial pro-oxidante se encuentra controlado. En estudios anteriores se demostró que la reacción entre el ONOO⁻ y la oxi-hemoglobina es una reacción de isomerización del peroxinitrito a nitrato, que en términos generales representa una vía de decaimiento del ONOO⁻ que no tiene efectos adversos [91]. De este modo, no solo los efectos tóxicos descritos previamente de la hemina libre, sino también los hallados en este trabajo, estarían inhibidos en condiciones normales. No obstante, una vez que el grupo hemo resulta liberado y oxidado a hemina al ocurrir la hemólisis intravascular, podría promover diversos efectos tóxicos, como la lipoperoxidación, la oxidación de proteínas, limitar la biodisponibilidad de $\bullet\text{NO}$, etc. Los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con los de Bartsaghi *et al.* en fase hidrofóbica [87], permiten

agregar dentro de los mecanismos de toxicidad de la hemina libre ya mencionados la capacidad que presenta de promover la oxidación y nitración de residuos de tirosina por peroxinitrito, tanto en fase acuosa como (principalmente) en membranas biológicas, donde tiende a ubicarse. De este modo, los elevados niveles de hemina libre en plasma que aparecerían en situaciones de hemólisis severa (en las cuales se satura la capacidad de captación de la hemopexina y la albúmina) producirían un incremento en la modificación de residuos de tirosina a 3-nitrotirosina, tanto de proteínas solubles como de membrana, a partir del ONOO^- formado en el espacio intravascular. Esto podría tener un fuerte impacto sobre la función de diversas proteínas endoteliales o plasmáticas, contribuyendo así al desarrollo de los distintos desórdenes vasculares asociados a patologías que cursan con eventos de hemólisis severa.

Teniendo en cuenta el hecho de que la unión de la hemina a la albúmina forma un complejo que puede permanecer en circulación un cierto tiempo si el sistema de detoxificación de la hemopexina se encuentra saturado, resulta interesante estudiar si dicho complejo Hemina-HSA posee, al igual que la hemina libre, una capacidad de promover la nitración de tirosina dependiente de ONOO^- . Sin embargo, el complejo HemHSA no fue capaz de promover la nitración de tirosina de igual manera que la hemina libre (Figura 5.13), sino que el aumento en los niveles de NO_2Tyr observado fue mínimo y se observó solo a bajas concentraciones de HemHSA ($< 5 \mu\text{M}$), descendiendo a valores menores al inicial a concentraciones mayores de complejo. El comportamiento observado de nitración de tirosina libre en presencia de HSA muestra siempre un descenso a mayores concentraciones HSA; esto tiene sentido pues la albúmina podrá reaccionar con los radicales derivados del ONOO^- (para las concentraciones de HSA utilizadas, predominará siempre la descomposición por homólisis del ONOO^- que su reacción directa con la HSA, teniendo en cuenta la constante de velocidad de reacción entre el ONOO^- y la HSA sin nada de tiol reducido [92]), dejando disponible una menor cantidad de radicales para llevar a la nitración de la tirosina libre. Que los rendimientos de nitración en presencia de HemHSA hayan sido mayores que en presencia de HSA (aunque no presenten un aumento importante respecto a la nitración en ausencia de HemHSA) está indicando que la hemina unida a HSA está teniendo un efecto en el sistema, probablemente reaccionando con el ONOO^- y generando una mayor producción de especies capaces de promover la nitración de Tyr. A bajas concentraciones de HemHSA, esto generaría que los rendimientos de nitración aumenten levemente, y a mayores concentraciones del complejo, si bien ya no se ve un aumento en la nitración de la Tyr libre, al menos hace que la inhibición de la misma sea menos

pronunciada que la producida por la HSA. El comportamiento observado respecto a la formación de DiTyr a partir de la tirosina libre fue prácticamente el opuesto: a bajas concentraciones de HemHSA no hubo un aumento notorio, pero a concentraciones mayores a 5 μM ocurrió un incremento muy importante en los rendimientos de dimerización de la tirosina libre. Si consideramos que la hemina unida a la HSA está reaccionando con el ONOO⁻ de igual manera que la hemina libre, esto podría deberse a que una gran parte del $\bullet\text{NO}_2$ generado tras la reacción esté siendo consumido por el componente proteico de la HemHSA (a las mayores concentraciones de complejo utilizadas podría competir perfectamente la reacción del $\bullet\text{NO}_2$ con los aminoácidos de la HSA con la del $\bullet\text{NO}_2$ con la tirosina libre), produciendo así radicales centrados en distintos aminoácidos que pudieran a continuación oxidar por un electrón a la tirosina. De este modo se estaría generando una cantidad importante de radical tirosilo que, al haber menos dióxido de nitrógeno, terminaría formando niveles altos de DiTyr y menores de NO₂Tyr. Al igual que para la formación de NO₂Tyr, la presencia de HSA produjo una disminución en la formación del producto DiTyr. Si se miran en conjunto las gráficas 5.13A y 5.13B, se podría concluir que la formación de productos de oxidación y nitración de tirosina libre en presencia de HemHSA aumentan a mayores concentraciones del complejo: a concentraciones < 5 μM se observa un aumento en la formación de NO₂Tyr, mientras que a concentraciones de HemHSA > 5 μM el aumento generado pasa a ser sobre los niveles de DiTyr. Esto indicaría que en efecto la hemina unida a la albúmina retiene una cierta capacidad de promover las modificaciones de nitración y dimerización de tirosina que fueron observadas para la hemina libre, aunque en menor medida que esta última. Es decir, la capacidad de la hemina libre de catalizar la nitración de tirosina mediante el mecanismo ya planteado resulta parcialmente inhibida cuando la hemina se encuentra unida a HSA, teniendo así la HSA un rol protector contra este tipo de toxicidad de la hemina. Si bien esta parece ser la situación, no hay que descartar la posibilidad de que el poco efecto observado de la HemHSA sobre la nitración y oxidación de Tyr respecto al generado por la hemina libre sea porque gran parte de las especies producidas entre la reacción con el ONOO⁻ lleven preferentemente a la oxidación de la propia albúmina que está uniendo hemina.

La albúmina humana contiene un total de 585 aminoácidos (PM de 66 kDa), entre los cuales se destacan 18 tirosinas, 6 metioninas, 1 triptófano, 17 puentes disulfuro y solo 1 cisteína libre [93]. Dicho contenido aminoacídico perfectamente podría estar teniendo un efecto sobre la nitración de tirosina libre por ONOO⁻ en presencia de HemHSA al explicar el por qué la hemina unida

a la albúmina no tiene el mismo efecto pro-oxidante que la hemina libre. Por ejemplo, a una concentración de 25 μM de HemHSA, el complejo hemina-proteína estaría aportando una concentración total de residuos de tirosina de 450 μM ; siendo la concentración de tirosina libre empleada de 500 μM , perfectamente podría competir la propia HSA por las especies oxidantes con la tirosina libre, resultando en una menor oxidación de esta última (obviamente, los residuos de tirosina de la proteína no se oxidan y nitrán con igual facilidad que los de tirosina libre, pues pueden estar poco expuestos al solvente y su difusión en el medio está ligada a la difusión de toda la proteína). De igual modo, los residuos de metionina y triptófano podrían también consumir parte de las especies radicalares que normalmente oxidan a la tirosina libre, contribuyendo así a que el efecto de la hemina unida a HSA de nitrar residuos de tirosina libre sea menor que la de la hemina libre. Dicho efecto fue parcialmente evaluado, observando si la unión de hemina resulta en una mayor nitración de los residuos de tirosina de la HSA respecto a la HSA sin unir hemina. La estructura cristalográfica de la albúmina humana acomplejada con hemina (Figura 6.1) muestra que el sitio de la HSA donde ocurre la unión de la hemina presenta dos residuos de tirosina (la Tyr138 y la Tyr161) en las proximidades del grupo hemo, ocupando uno de ellos uno de los enlaces de coordinación del hierro férrico [94]. Por lo tanto, podría pasar que la reacción entre la HemHSA y el ONOO^- promueva la nitración específica de dichos residuos de tirosina preferentemente, pudiendo esto producir que la capacidad de nitrar tirosina libre del complejo se vea disminuida.

A diferencia de lo que podía esperarse, cuando se expuso a HemHSA y HSA a ONOO^- , se detectó una mayor señal de NO_2Tyr empleando anticuerpos anti- NO_2Tyr en las muestras de HSA que en las de HemHSA (Figura 5.14). En principio, esto estaría indicando que ocurrió una mayor nitración de residuos de tirosina en la HSA que en la HSA ligando hemina. Teniendo en cuenta el efecto observado para la hemina libre y en menor medida para la propia HemHSA, que produjeron un aumento en los rendimientos de nitración de tirosina libre por ONOO^- , era de esperar que los niveles de NO_2Tyr detectados fueran mayores para la HemHSA que para la HSA. En principio, puede haber dos explicaciones para el resultado observado. En primer lugar, el hecho de que los niveles de NO_2Tyr detectados por Dot-Blot hayan sido menores para la HemHSA que para la HSA podría deberse a que en la HemHSA esté ocurriendo una nitración de residuos de tirosina sitio-específica dirigida por la hemina, mientras que en la HSA ocurriría una nitración de los residuos de tirosina más expuestos al solvente que resultan en una mayor detección mediante el empleo de anticuerpos. Un efecto como

este había sido observado previamente para la MnSOD, donde por Western Blot utilizando anticuerpos específicos anti-NO₂Tyr se detectó una mayor intensidad de proteína nitrada para la Apo-MnSOD (es decir, la MnSOD a la cual se le removió el átomo de Mn³⁺) que para la MnSOD [83].

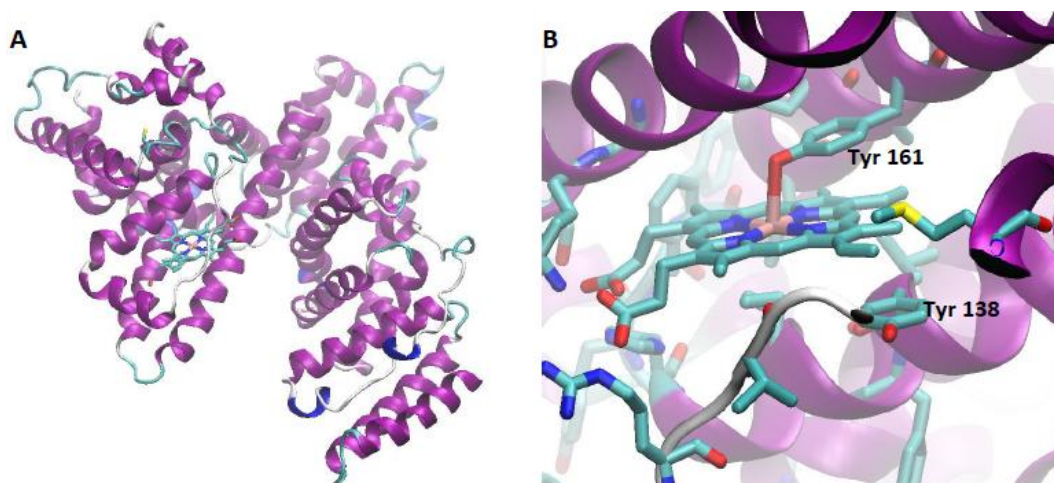


Figura 6.1. Estructura cristalográfica de la albúmina humana con hemina como ligando. Se muestra la estructura tridimensional del complejo hemina albúmina (PDB ID: 1O9X) determinada por cristalografía de Rayos X [75]. **(A)** Estructura completa de la HSA con la hemina unida; se representa esquemáticamente la estructura secundaria de la misma. **(B)** Ampliación del sitio de unión de la hemina. El esqueleto de la proteína se representa como estructura secundaria, mientras que en bastones se representa la hemina, los residuos de tirosina y aquellos demás residuos ubicados a 4 Å de la hemina. Se especifica la ubicación de las tirosinas 161 y 138. Referencia de colores: Celeste = C; Rojo= O; Azul= N; Amarillo= S; Rosado= Fe. Imágenes preparadas utilizando el software VMD.

Entonces, en la HemHSA el ONOO⁻ reaccionaría directamente con la hemina formando las especies oxidantes $\bullet\text{NO}_2$ y Hem(Fe⁴⁺=O) que llevarían preferentemente a la oxidación y nitración de las tirosinas más próximas al sitio de formación de dichas especies, es decir, la Tyr161 y la Tyr138. Por el contrario, en el caso de la HSA, la nitración de los residuos de tirosina es llevada a cabo por los radicales derivados de la homólisis del ONOOH, que generará una nitración más aleatoria, principalmente de los residuos de tirosina más fácilmente accesibles. Este tipo de patrón de nitración produciría una mayor superficie expuesta de residuos nitrados que serían más fácilmente detectados que los residuos nitrados menos accesibles que se generarían producto de la nitración sitio-específica dirigida por la hemina. Esto podría estar explicando en parte el resultado obtenido de nitración por ONOO⁻ de la HemHSA y la HSA, donde en

principio se esperaba ver una mayor nitración en la albúmina que presentaba hemina unida. De todos modos, para confirmar esto es preciso analizar mediante otras técnicas las dos poblaciones de proteína nitrada (por ejemplo, por espectrometría de masa) para identificar qué residuos de tirosina resultaron nitrados en cada caso y en qué nivel ocurrió cada nitración. Más allá de esto, puede haber otra explicación bastante diferente al resultado obtenido, que implicaría que en verdad hubo una nitración menor de la HemHSA respecto a la HSA producto de un tipo diferente de reacción entre la HemHSA y el ONOO^- que la planteada para la hemina libre. Estudios anteriores realizados por Ascenzi *et al.* [95] postulan que la reacción entre la HemHSA y el ONOO^- es una reacción de isomerización del peroxinitrito a nitrato llevada a cabo de manera catalítica con una constante de velocidad de $4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Lógicamente, si la reacción entre la HemHSA y el ONOO^- fuera de este tipo, tendría sentido que la nitración detectada para la HemHSA sea menor que la detectada para la HSA, pues la isomerización del peroxinitrito a nitrato no produciría especies capaces de oxidar a la tirosina. Sin embargo, una reacción de isomerización no explicaría el hecho de que el complejo HemHSA aumentó levemente los rendimientos de nitración y oxidación de tirosina libre por ONOO^- . De hecho, en el trabajo mencionado se observó que la HemHSA inhibe de manera dosis dependiente la nitración de tirosina libre, mucho más incluso que la HSA, lo cual en principio constituye un fundamento muy fuerte de que la reacción es una isomerización. Las diferencias obtenidas respecto a dicho trabajo pueden estar dadas en parte por las condiciones experimentales en que se realizó la reacción de tirosina libre y ONOO^- en presencia de distintas concentraciones de HemHSA; en dicho trabajo, la inhibición observada fue realizada para 0,1 mM Tyr expuesta a 0,2 mM ONOO^- y para concentraciones 0-50 μM de HemHSA a pH 7,2. Esto no aparenta ser muy diferente de las condiciones empleadas aquí (0,5 mM Tyr; 0,5 mM ONOO^- y 0-25 μM HemHSA), pero principalmente el hecho de que la concentración de peroxinitrito utilizada en el presente trabajo fuera más del doble respecto a la utilizada por Ascenzi *et al.* para prácticamente el mismo rango de concentraciones de HemHSA podría provocar diferencias respecto al tipo de reacción entre HemHSA y ONOO^- y a la eficiencia de una posible isomerización. No obstante, sería importante para determinar el tipo de reacción que ocurre que en dicho experimento se cuantifique además de la nitrotirosina formada la DiTyr, que fue un producto que tendió a aumentar en las condiciones experimentales presentes, para tener la certeza de que se inhibió la oxidación de la tirosina libre y el descenso visto por los autores en la nitración no fue porque hubo un aumento de la dimerización. Por lo tanto, la naturaleza de la reacción

entre HemHSA y ONOO⁻ no resulta del todo clara aun, y hace falta una mayor profundización en la misma para tener la certeza de si en verdad es una isomerización (como se ha observado para la metahemoglobina y la metamioglobina [96]) o es una oxidación por un electrón de manera similar a la que sucede con la hemina libre pero que no ocurre con la misma facilidad (motivo por el cual no incrementa tanto los rendimientos de nitración de tirosina libre como la hemina libre). Cabe la posibilidad de que ambos comportamientos coexistan y que se manifieste preferentemente uno u otro según las condiciones experimentales, es decir, dependiendo de la concentración de HemHSA y de ONOO⁻. Nuevamente, es imprescindible el uso de técnicas más precisas para elucidar con claridad el tipo de reacción, sobre todo teniendo en cuenta las limitaciones existentes al momento de realizar detecciones con anticuerpos como las realizadas en el presente trabajo.

En resumen, la hemina liberada al espacio intravascular durante eventos de hemólisis severa puede participar en un gran número de reacciones oxidativas, causando daño a biomoléculas esenciales y generando un estado de estrés oxidativo capaz de disminuir la biodisponibilidad del óxido nítrico y promover una respuesta inflamatoria; esta situación podrá derivar finalmente en la disfunción endotelial. En este contexto, la capacidad de la hemina de promover la nitración de residuos de tirosina por ONOO⁻, tanto en fase acuosa como en membranas, podría estar jugando un rol importante en la generación del estado de estrés nitro-oxidativo intravascular, favoreciendo así la activación de las células endoteliales y el establecimiento de una respuesta inflamatoria como mecanismos capaces de progresivamente llevar al desarrollo del estado de disfunción endotelial (Figura 6.2).

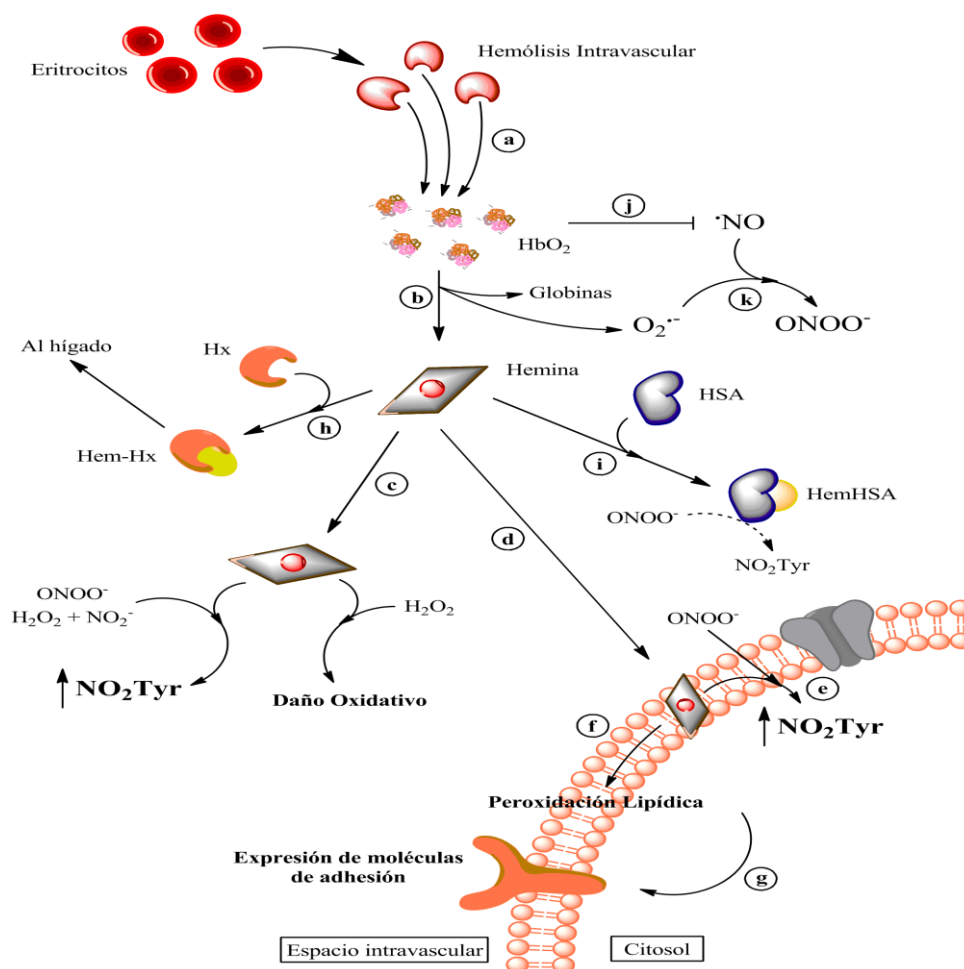


Figura 6.2. Mecanismos implicados en la toxicidad de la hemina libre durante hemólisis intravascular severa. En diversas situaciones patológicas, puede ocurrir una hemólisis intravascular aumentada que deriva en la liberación de grandes cantidades de hemoglobina (HbO_2) al plasma **(a)**. La liberación del grupo hemo y su oxidación resulta en la generación de hemina libre y $\text{O}_2^{\bullet-}$ **(b)**. La hemina libre podrá promover en reacciones oxidativas en plasma al reaccionar con H_2O_2 o con ONOO^- , incrementando notoriamente la nitración de residuos de tirosina **(c)**; dada su gran hidrofobicidad, tenderá a acumularse en membranas celulares (por ejemplo de células endoteliales) **(d)**, donde es capaz de incrementar considerablemente la nitración de tirosina ONOO^- dependiente **(e)** y de iniciar procesos de lipoperoxidación **(f)**. Este estado de estrés nitro-oxidativo podrá derivar en la activación endotelial **(g)**, creando un ambiente pro-inflamatorio. Estos efectos pro-oxidantes de la hemina pueden evitarse si la misma es captada por la hemopexina (Hx), que se encarga de transportarla al hígado para su degradación **(h)**; en caso de saturación de la Hx, la albúmina (HSA) podrá captar parte de la hemina libre restante, inhibiendo parcialmente sus efectos pro-oxidantes **(i)**. Además de estos efectos promovidos por la hemina, la propia HbO_2 inicialmente liberada puede consumir parte del NO presente en plasma **(j)**, mientras que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ liberado por oxidación del grupo hemo a hemina también puede dar cuenta del óxido nítrico, llevando a la formación de ONOO^- **(k)**. En conjunto, todos estos efectos contribuyen a la disfunción endotelial observada en patologías que cursan con eventos de hemólisis graves. Imagen creada en el software ChemBioDraw Ultra 12.0.

7. Conclusiones

En fase acuosa, se verificó la capacidad de diversos complejos de bajo peso molecular de metales de transición (Fe^{3+} y Mn^{3+}) de promover la oxidación y nitración de tirosina por peroxinitrito. Dicha capacidad implica la reacción directa entre el ONOO⁻ y el complejo metálico, que lleva a la formación de las especies $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$ y $\bullet\text{NO}_2$ en rendimientos mayores que la formación de $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ que surgen cuando, en ausencia de metales, el ONOO⁻ decae por homólisis catalizada por protón. De este modo, tras la reacción con los metales, la especie $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$ actúa como principal oxidante por un electrón de la tirosina, generando el radical tirosilo, que a continuación reaccionaría con el $\bullet\text{NO}_2$ llevando así a la formación de 3- NO_2Tyr con grandes rendimientos. En base a los resultados obtenidos, no existe evidencia de que la nitración de residuos de tirosina por ONOO⁻ catalizada por metales de transición transcurra a través de un mecanismo no radicalar como el que fue propuesto inicialmente.

Dentro de los complejos que produjeron un incremento en los niveles de nitración de tirosina por ONOO⁻, se destaca, por su relevancia biológica, a la hemina. En solución acuosa, la hemina produjo un incremento de los rendimientos de nitración de un 9% a un 17%. Dicho incremento, si bien resulta importante, fue menor que el efecto previamente observado para la nitración de un análogo hidrofóbico de la tirosina (BTBE) incorporado en liposomas de fosfatidilcolina (aumento de 3% a 15%). Por lo tanto, debido a la hidrofobicidad de la hemina y su gran tendencia a intercalarse en bicapas lipídicas, este efecto capaz de aumentar la nitración de tirosina por ONOO⁻ sería más relevante en entornos hidrofóbicos, como membranas plasmáticas o lipoproteínas.

Si bien en condiciones normales la hemina que resulta liberada en plasma es rápidamente removida por acción de la hemopexina principalmente y en menor medida por la albúmina, en situaciones patológicas que transcurren con una hemólisis intravascular severa (por ejemplo, anemia hemolítica o falciforme) estos sistemas se saturarían, resultando en la presencia de grandes cantidades de hemina libre. En dichas situaciones, la hemina es capaz de ejercer un gran número de efectos tóxicos que implican principalmente reacciones oxidativas; dentro de estos efectos se puede incluir su capacidad de catalizar la nitración de tirosina por ONOO⁻, principalmente en membranas biológicas, donde tenderá a concentrarse por su hidrofobicidad. Así, este mecanismo de toxicidad de la hemina apreciado en este trabajo podría estar implicado en la generación de una condición de estrés nitro-oxidativo severa, contribuyendo de este modo a la

patogénesis de las distintas alteraciones fisiológicas asociadas a los eventos de hemólisis intravascular grave y sostenida, como la disfunción endotelial.

La habilidad de la HSA de unir hemina proporcionaría una protección parcial contra estos efectos, al limitar la capacidad de la hemina de promover la nitración de tirosina dependiente de ONOO^- . Si bien el complejo HemHSA tuvo igualmente un leve efecto aumentando la nitración de tirosina, una parte importante de su efecto protector sería removiendo hemina de membranas biológicas (o evitando su ingreso a las mismas desde la fase acuosa), donde su efecto pro-oxidante es más pronunciado e implica no solo el incremento en la nitración de tirosina sino también otros procesos como la lipoperoxidación.

8. Agradecimientos

Antes que nada, a Rafael y a Silvina, por haber aceptado participar como orientadores del trabajo, siendo por demás imprescindibles para el aprendizaje tanto teórico como práctico dentro de una temática novedosa y muy atractiva, sobre la cual desconocía mucho al momento de comenzar (y probablemente desconozca más ahora).

En segundo lugar, me gustaría agradecer especialmente a tres personas que colaboraron mucho en diferentes aspectos de este trabajo, sea para discutir conceptos y resultados o en cuestiones prácticas. Mi más profundo agradecimiento a Madia Trujillo, Verónica Demicheli y Sebastián Carballal por el tiempo dedicado a ayudarme siempre que les fui a molestar.

Por último, también quisiera expresar mi agradecimiento al resto del Departamento, por el apoyo brindado siempre, aunque fuera en la más mínima cuestión. Sin duda que es todo más fácil de llevar adelante existiendo tantas personas a quienes pedirle ayuda, sobre todo si abarcan áreas de trabajo diverso; cualquier invento que uno quiera hacer siempre tiene a quién consultar para saber cómo hacerlo.

9. Referencias

- [1] Nelson, David L., Cox, Michael M. "Lehninger Principios de Bioquímica", 4ª Edición, Ediciones Omega, 2006.

- [2] Radi, R. "Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects", *Accounts of Chemical Research* 2013, 46, 550-559.
- [3] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. "Biología Molecular de la Célula", 4ª Edición, Ediciones Omega, 2004.
- [4] Gunther, M. R., Sturgeon, B. E., & Mason, R. P. "Nitric oxide trapping of the tyrosil radical – chemistry and biochemistry", *Toxicology* 2002, 177, 1-9.
- [5] Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, V. W. "Harper Bioquímica Ilustrada", 14ª Edición, Manual Moderno, 2005.
- [6] Sokolovsky, M., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. "Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosil Residues in Proteins", *Biochemistry* 1966, 5, 3582-3589.
- [7] Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S., & Chaudhuri, G. "Pharmacological Evidence that Endothelium-Derived Relaxing Factor is Nitric Oxide: Use of Pyrogallol and Superoxide Dismutase to Study Endothelium-Dependent and Nitric Oxide-Elicited Vascular Smooth Muscle Relaxation", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1988, 244, 181-189.
- [8] Blough, N. V. & Zafiriou, O. C. "Reaction of Superoxide with Nitric Oxide to Form Peroxynitrite in Alkaline Aqueous Solution", *Inorg. Chem.* 1985, 24, 3502-3504.
- [9] Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 1620-1624.
- [10] Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide", *Arch. Biochem. Biophys.* 1991, 288, 481-487.
- [11] Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. "Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide", *The Journal of Biological Chemistry* 1991, 266, 4244-4250.
- [12] Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., & Beckman, J. S. "Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration Catalyzed by Superoxide Dismutase", *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 298, 431-437.
- [13] Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J. C., & Tsai, M. "Kinetics of Superoxide Dismutase- and Iron-Catalyzed Nitration of Phenolics by Peroxynitrite", *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 298, 438-445.

- [14] Ischiropoulos, H., Zhu, L., & Beckman, J. S. "Peroxynitrite Formation from Macrophage-Derived Nitric Oxide", *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 298, 446-451.
- [15] Radi, R. "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 4003-4008.
- [16] Souza, J. M., Peluffo, G., & Radi, R. "Protein tyrosine nitration – Functional alteration or just a biomarker?", *Free Radical Biology & Medicine* 2008, 45, 357-366.
- [17] Abello, N., Kerstjens, H. A. M., Postma, D. S., & Bischoff, R. "Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins".
- [18] Yang, H., Zhang, Y., & Pöschl, U. "Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins", *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 879-886.
- [19] Moreno, D. M., Marti, M.A., De Biase, P. M., Estrín, D. A., Demicheli, V., Radi, R., & Boechi, L. "Exploring the molecular basis of human superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration", *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, 507, 304-309.
- [20] Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A., & Radi, R. "Cytochrome c nitration by peroxynitrite", *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 21409-21415.
- [21] Batthyany, C., Souza, J. M., Duran, R., Cassina, A., Cervenansky, C., & Radi, R. "Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite", *Biochemistry* 2005, 44, 8038-8046.
- [22] Souza, J. M., Castro, L., Cassina, A. M., Batthyany, C., & Radi, R. "Nitrocytochrome c: Synthesis, Purification and Functional studies", *Methods in Enzymology* 2008, 441, 197-215.
- [23] Vadseth, C., Souza, J. M., Thomson, L., Seagraves, A., Nagaswami, C., Scheiner, T., Torbet, J., Vilaire, G., Bennet, J. S., Murciano, J. C., Muzykantov, V., Penn, M. S., Hazen, S. L., Weisel, J. W., & Ischiropoulos, H. "Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species", *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279, 8820-8826.
- [24] Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J. M., Bhatnagar, A., Tang, X. L., Wang, O., Cardwell, E., Ping, P. "Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon-RACK2 interactions: a novel mechanism of no-

- triggered activation of PKCepsilon", *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 15021-15027.
- [25] Ji, Y., Neverova, I., Van Eyk, J. E., & Bennet, B. M. "Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione S-transferase by peroxynitrite", *The Journal of Biological Peroxynitrite* 2006, 281, 1986-1991.
- [26] Hodara, R., Norris, E. H., Giasson, B. I., Mishizen-Eberz, A. J., Lynch, D. R., Lee, V. M., & Ischiropoulos, H. "Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation", *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279, 47746-47753.
- [27] Crow, J. P., Ye, Y. Z., Strong, M., Kirk, M., Barnes, S., & Beckman, J. S. "Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L", *J. Neurochem.* 1997, 69, 1945-1953.
- [28] Pehar, M., Vargas, M. R., Robinson, K. M., Cassina, P., England, P., Beckman, J. S., Alzari, P. M., & Barbeito, L. "Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons", *Free Radical Biology and Medicine* 2006, 41, 1632-1644.
- [29] Zou, M., Martin, C., & Ullrich, V. "Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite", *Biological Chemistry* 1997, 378, 707-713.
- [30] Blanchard-Fillion, B., Souza, J. M., Friel, T., Jiang, G. C., Vrana, K., Sharov, V., Barron, L., Schoneich, C., Quijano, C., Álvarez, B., Radi, R., Przedborski, S., Fernando, G. S., Horwitz, J., & Ischiropoulos, H. "Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite", *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276, 46017-46023.
- [31] Trostchansky, A., O'Donnel, V. B., Goodwin, D. C., Landino, L. M., Marnett, L. J., Radi, R., & Rubbo, H. "Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: a free radical mechanism of inactivation", *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 42, 1029-1028.
- [32] Berlett, B. S., Levine, R. L., & Stadtman, E. R. "Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 2784-2789.
- [33] Guittet, O., Ducastel, B., Salem, J. S., Henry, Y., Rubin, H., Lemaire, G., & Lepoivre, M. "Differential sensitivity of the tyrosil radical of mouse

- ribonucleotide reductase to nitric oxide and peroxynitrite", *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 273, 22136-22144.
- [34] Savvides, S. N., Scheiwein, M., Bohme, C. C., Arteel, G. E., Karplus, P. A., Becker, K. & Schirmer, R. H. "Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite", *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 2779-2784.
- [35] Roberts, E. S., Lin, H., Crowley, J. R., Vuletich, J. L., Osawa, Y., & Hollenberg, P. F. "Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1", *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 1067-1074.
- [36] Seidel, E. R., Ragan, V., & Liu, L. "Peroxynitrite inhibits the activity of ornithine decarboxylase", *Life Sci.* 2001, 68, 1477-1483.
- [37] Knapp, L. T., Kanterewicz, B. I., Hayes, E. L., & Klann, E. "Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and inhibition of protein kinase C", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 286, 764-770.
- [38] Marcondes, S., Turko, I. V., & Murad, F. "Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase in rats after endotoxin administration", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 7146-7151.
- [39] Bartesaghi, S., Ferrer-Sueta, G., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B., & Radi, R. "Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments", *Amino Acids* 2007, 32, 501-515.
- [40] Shao, B., Pennathur, S., & Heinecke, J. W. "Myeloperoxidase Targets Apolipoprotein A-I, the Major High Density Lipoprotein Protein, for Site-Specific Oxidation in Human Atherosclerotic Lesions", *The Journal of Biological Chemistry* 2012, 287, 6375-6386.
- [41] Isobe, C., Abe, T., & Terayama, Y. "Remarkable increase in 3-nitrotyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with lacunar stroke", *Brain Research* 2009, 1305, 132-136.
- [42] Montoliu, C., Cauli, O., Urios, A., El Mlili, N., Serra, M. A., Giner-Duran, R., González-Lopez, O., Del Olmo, J. A., Wassel, A., Rodrigo, J. M., & Felipe, V. "3-Nitro-Tyrosine as a Peripheral Biomarker of Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients With Liver Cirrhosis", *The American Journal of Gastroenterology* 2011, 106, 1629-1637.
- [43] Baldus, S., Eiserich, J. P., Brennan, M. L., Jackson, R. M., Alexander, C. B., & Freeman, B. A. "Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases", *Free Radical Biology and Medicine* 2002, 33, 1010-1019.

- [44] Taverne, Y., Bogers, J., Duncker, D. J., & Merkus, D. "Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, Volume 2013, Article ID 862423.
- [45] Newsholme, P., Rebelato, E., Abdulkader, F., Krause, M., Carpinelli, A., & Curi, R. "Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids", *Journal of Endocrinology* 2012, 214, 11-20.
- [46] Liochev, S. I., & Fridovich, I. "The effects of superoxide dismutase on H_2O_2 formation", *Free Radical Biology & Medicine* 2007, 42, 1465-1469.
- [47] Fridovich, I. "Superoxide Anion Radical, Superoxide Dismutases, and Related Matters", *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 18515-18517.
- [48] Ferrer-Sueta, G., & Radi, R. "Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals", *ACS Chemical Biology* 2009, 4, 161-177.
- [49] Storz, P. "Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondria-to-Nucleus Signaling: A Key to Aging and Radical-Caused Diseases", *Science Signaling* 2006 (332), re3.
- [50] Jones, C. W., & Clark, J. H. "Applications of Hydrogen Peroxide and Derivates", RSC Clean Technology Monographs 1999.
- [51] Winterbourn, C. C., & Metodiewa, D. "Reactivity of Biologically Important Thiol Compounds with Superoxide and Hydrogen Peroxide", *Free Radical Biology and Medicine* 1999, 27, 322-328.
- [52] Mitozo, P. A., de Souza, L. F., Loch-Neckel, G., *et al.* "A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism", *Free Radical Biology and Medicine* 2011, 51, 69-77.
- [53] Stone, J. R., & Yang, S. "Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger", *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 243-270.
- [54] Slivka, A., & Cohen, G. "Hydroxyl Radical Attack on Dopamine", *The Journal of Biological Chemistry* 1985, 260, 15466-15472.
- [55] Buettner, G. R. "The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993, 300, 535-543.
- [56] Kehrer, J. P. "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity", *Toxicology* 2000, 149, 43-50.
- [57] van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B., & Cross, C. E. "Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite", *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 7617-7625.

- [58] Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., & De Menezes, S. L. "Nitrogen Dioxide and Carbonate Radical Anion: Two Emerging Radicals in Biology", *Free Radical Biology and Medicine* 2002, 32, 841-859.
- [59] Szabó, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics", *Nat. Rev. Drug Discovery* 2007, 6, 662-680.
- [60] Radi, R., Peluffo, G., Álvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. "Unraveling Peroxynitrite Formation in Biological Systems", *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 30, 463-488.
- [61] Rines, A. K., & Ardehali, H. "Transition metals and mitochondrial metabolism in the heart", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2013, 55, 50-57.
- [62] Argüello, J. M., Raimunda, D., & González-Guerrero, M. "Metal Transport across Biomembranes: Emerging Models for a Distinct Chemistry", *The Journal of Biological Chemistry* 2012, 287, 13510-13517.
- [63] Dean, K. M., Qin, Y., & Palmer, A. E. "Visualizing metal ions in cells: An overview of analytical techniques, approaches, and probes", *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1823, 1406-1415.
- [64] Anderson, C. P., Shen, L., Eisenstein, R. S., & Leibold, E. A. "Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins", *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1823, 1468-1483.
- [65] Frey, P. A., & Reed, G. H. "The Ubiquity of Iron", *ACS Chemical Biology* 2012, 7, 1477-1481.
- [66] Ganz, T., & Nemeth, E. "Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals", *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, 1763, 690-699.
- [67] Kumar, S., & Bandyopadhyay, U. "Free heme toxicity and its detoxification systems in humans", *Toxicology Letters* 2005, 157, 175-188.
- [68] Turski, M. L., & Thiele, D. J. "New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease", *The Journal of Biological Chemistry* 2009, 284, 717-721.
- [69] Xu, W., Barrientos, T., & Andrews, N. C. "Iron and Copper in Mitochondrial Diseases", *Cell Metabolism* 2013, 17, 319-328.
- [70] Gaetke, L. M., & Chow, C. K. "Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients", *Toxicology* 2003, 189, 147-163.
- [71] Reaney, S. H., Kwik-Urbe, C., & Smith, D. R. "Manganese Oxidation State and Its Implications for Toxicity", *Chem. Res. Toxicol.* 2002, 15, 1119-1126.

- [72] Martinez-Finley, E. J., Gavin, C. E., Aschner, M., & Gunter, T. E. "Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species", *Free Radical Biology and Medicine* 2013, 62, 65-75.
- [73] Farina, M., Avila, D. S., Teixeira da Rocha, J. B., & Aschner, M. "Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury", *Neurochemistry International* 2013, 62, 575-594.
- [74] Aschner, J. L., & Aschner, M. "Nutritional aspects of manganese homeostasis", *Molecular Aspects of Medicine* 2005, 26, 353-362.
- [75] Robinson, S. R., Dang, T. N., Dringen, R., & Bishop, G. M. "Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke", *Redox Report* 2009, 14, 228-234.
- [76] Vinchi, F., & Tolosano, E. "Therapeutic Approaches to Limit Hemolysis-Driven Endothelial Dysfunction: Scavenging Free Heme to Preserve Vasculature Homeostasis", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 2013:396527.
- [77] Thomas, D., Espey, M. G., Vitek, M. P., Miranda, K. M., & Wink, D. A. "Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: An alternative to the NO/O₂⁻ reaction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 12691-12696.
- [78] Reed, J. W., Ho, H. H., & Jolly, W. L. "Chemical synthesis with a quenched flow reactor. Hydroxytrihydroborate and peroxyxynitrite", *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, 1248-1249.
- [79] Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A., & Anderson, S. R. "Dityrosine: preparation, isolation and analysis", *Anal. Biochem.* 1996, 242, 202-213.
- [80] Batinic-Haberle, I., Cuzzocrea, S., Reboucas, J. S., Ferrer-Sueta, G., Mazzon, E., Di Paola, R., Radi, R., Spasojevic, I., Benov, L., & Salvemini, D. "Pure MnTBAP selectively scavenges peroxyxynitrite over superoxide: Comparison of pure and comercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-especific *Escherichia coli* model and carrageenan-induced pleurisy", *Free Radical Biology and Medicine* 2009, 46, 192-201.
- [81] Chen, R. F. "Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment", *The Journal of Biological Chemistry* 1967, 242, 173-181.
- [82] Pfeiffer, S., Schmidt, K., & Mayer, B. "Dityrosine Formation Outcompetes Tyrosine Nitration at Low Steady-state Concentrations of Peroxyxynitrite", *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 6346-6352.

- [83] Ferrer-Sueta, G., Quijano, C., Álvarez, B., & Radi, R. "Reactions of Manganese Porphyrins and Manganese-Superoxide Dismutase with Peroxynitrite", *Methods in Enzymology* 2002, 349, 23-37.
- [84] Ferrer-Sueta, G., Vitturi, D., Batinic-Haberle, I., Fridovich, I., Goldstein, S., Czapski, G., & Radi, R. "Reactions of Manganese Porphyrins with Peroxynitrite and Carbonate Radical Anion", *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278, 27432-27438.
- [85] Ferrer-Sueta, G., Ruiz-Ramírez, L., & Radi, R. "Ternary Copper Complexes and Manganese (III) Tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin Catalyze Peroxynitrite-Dependent Nitration of Aromatics", *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10, 1338-1344.
- [86] Ramezani, M. S., Padmaja, S., & Koppenol, W. H. "Nitration and Hydroxylation of Phenolic Compounds by Peroxynitrite", *Chem. Res. Toxicol.* 1996, 9, 232-240.
- [87] Bartesaghi, S., Valez, V., Trujillo, M., Peluffo, G., Romero, N., Zhang, H., Kalyanaraman, B., & Radi, R. "Mechanistic Studies of Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration in Membranes Using the Hydrophobic Probe *N*-t-BOC-L-tyrosine *tert*-Butyl Ester", *Biochemistry* 2006, 45, 6813-6825.
- [88] Santos, C. X., Bonini, M. G., & Augusto, O. "Role of the Carbonate Radical Anion in Tyrosine Nitration and Hydroxylation by Peroxynitrite", *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, 377, 146-152.
- [89] Warren, J. J., Winkler, J. R. & Gray, H. B. "Redox properties of Tyrosine and Related Molecules", *FEBS Lett.* 2012, 586, 596-602.
- [90] Prütz, W. A., Mönig, H., Butler, J., & Land, E. J. "Reactions of Nitrogen Dioxide in Aqueous Model Systems: Oxidation of Tyrosine Units in Peptides and Proteins", *Arch. Biochem. Biophys.* 1985, 243, 125-134.
- [91] Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C. D., Mason, R. P., & Denicola, A. "Reaction of Human Hemoglobin with Peroxynitrite: Isomerization to Nitrate and Secondary Formation of Protein Radicals", *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278, 44049-44057.
- [92] Álvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., & Radi, R. "Kinetics of Peroxynitrite Reaction with Amino Acids and Human Serum Albumin", *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274, 842-848.
- [93] Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., & Álvarez, B. "Sulfenic Acid Formation in Human Serum Albumin by Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite", *Biochemistry* 2003, 42, 9906-9914.

- [94] Zunszain, P., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., & Curry, S. "Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid", *BMC Structural Biology* 2003, 3, 6.
- [95] Ascenzi, P., di Masi, A., Coletta, M., Ciaccio, C., Fanali, G., Nicoletti, F. P., Smulevich, G., & Fasano, M. "Ibuprofen Impairs Allosterically Peroxynitrite Isomerization by Ferric Human Serum Heme-Albumin", *The Journal of Biological Chemistry* 2009, 284, 31006-31017.
- [96] Herold, S., & Shivashankar, K. "Metmyoglobin and Methemoglobin Catalyze the Isomerization of Peroxynitrite to Nitrate", *Biochemistry* 2003, 42, 14036-14046.