



PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIINFLAMATORIAS Y ANTIATEROGÉNICAS DE COMPUESTOS ARILNITRO- ALIFÁTICOS *p*-SUSTITUÍDOS

Nicolás Cataldo

Tesis de Maestría

PEDECIBA – BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

Universidad de la República

Directoras: Dra. Leonor Thomson, Dra. Mercedes González

Índice

1. Resumen	4
1.1. Abreviaturas.....	5
2. Introducción.....	7
2.1. Generalidades de la aterosclerosis.....	7
2.2. Estrés oxidativo.....	8
2.3. Lipoperoxidación.....	13
2.4. Aterosclerosis e inflamación.....	15
2.5. El inflamasoma NLRP3 en aterosclerosis.....	17
2.6. Terapia farmacológica.....	19
2.6.1. Estatinas.....	21
2.6.2. Inhibidores de PCSK9.....	24
2.6.3. AINES.....	25
2.7. Antecedentes de nuestro grupo.....	28
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	31
4.1. Objetivo General.....	31
4.2. Objetivos Específicos.....	31
5. Materiales y métodos.....	32
5.1. Diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de los compuestos.....	32
5.2. Evaluación de la reactividad de los productos con radicales peroxilo.....	34
5.3. Estudio de la capacidad de los compuestos de inhibir la oxidación de LDL y la internalización de LDL oxidada por macrófagos.....	35
5.4. Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la actividad anti-inflamatoria de los compuestos.....	37
5.5. Análisis estadístico.....	38
6. Resultados.....	39
6.1. Síntesis y caracterización química de los compuestos.....	39
6.2. Reactividad con radicales peroxilo.....	46
6.3. Inhibición de la oxidación de LDL.....	51
6.4. Propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas.....	54

7.	Conclusiones	57
8.	Perspectivas	58
9.	Anexos.....	59
10.	Referencias.....	60

1. Resumen

En reportes previos de nuestro grupo se describieron las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de una serie de aril-nitroalquenos *para* sustituidos. En el presente trabajo, partiendo de una biblioteca extendida de derivados aril-nitro-alifáticos exploramos la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antiaterogénica de los compuestos. Además, se incluyó una serie de derivados nitroalcano, racionalmente diseñados para conocer la importancia del doble enlace en las propiedades farmacológicas. La capacidad antioxidante se analizó empleando la técnica de ORAC. El derivado *p*-metiltiofenilo mostró un efecto hasta 3 veces mayor que el Trolox, empleado como compuesto de referencia. La reactividad del derivado *p*-dimetilamino fue aún mayor, siendo las variedades nitroalcano las más efectivas. De hecho, mientras la capacidad antioxidante de los derivados dimetilamino-4-(2-nitro-1z-etenil)-benceno (**1**) y dimetilamino-4-(2-nitro-1z-propenil)-benceno (**2**) fueron 4.2 ± 0.1 y 5.4 ± 0.1 Eq Trolox/mol respectivamente, la obtenida para los derivados etilo (**17**) y propilo (**18**) fue de 13 ± 2 y 10 ± 1 Eq Trolox/mol, respectivamente. Adicionalmente, los derivados *p*-dimetilamino, en especial los nitroalcanos fueron capaces de prevenir el consumo de oxígeno proveniente de la oxidación de LDL mediada por radicales peroxilo. De hecho, el consumo de oxígeno por parte de LDL se vio retardado en presencia de estos últimos compuestos, pero sólo los derivados nitroalcano fueron capaces de interrumpir las cadenas de lipoperoxidación, disminuyendo la velocidad de consumo de oxígeno al agregarlos luego de comenzada esta fase. Aunque la formación de células espumosas no se vio afectada por el agregado de compuestos en presencia de LDL oxidada, sí se observó una menor expresión de IL-1- β en macrófagos activados con LPS-INF- γ .

1.1. Abreviaturas

AAPH. 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-diclorohidrato.

ACV. Accidentes cerebro-vasculares.

AINE. Antiinflamatorios no esteroideos.

ApoE. Apolipoproteína E.

AR. Artritis reumatoidea.

CAD. Enfermedad coronaria aguda.

CETP. Proteína de transferencia de esteres de colesterol.

CLR. Receptores de tipo lectina.

COX. Ciclooxigenasa.

DAMPs. Patrones moleculares asociados al daño.

ECV. Enfermedad cardiovascular

EP/AE. Éter de petróleo/acetato de etilo

ER. Especies reactivas.

ERO. Especies reactivas del oxígeno.

ERN. Especies reactivas del nitrógeno.

IL-1. Interleucina-1.

IM. Infarto de miocardio.

LDL. Lipoproteína de baja densidad.

LDLox. LDL oxidada.

LDLac. LDL acetilada.

LDL-R. Receptor de LDL.

LPS. Lipopolisacárido de la pared bacteriana.

MACE. Eventos cardíacos mayores.

MCP-1. Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MHC-II. Complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

MMP-9. Metalopeptidasa 9 de la matriz.

NF- κ B. Factor nuclear κ B.

NLR. Receptor de tipo NOD.

NLRP3. Proteína 3 con dominios NACHT, LRR y PYD.

ORAC. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno.

PAMPs. Patrones moleculares asociados a patógenos.
PCGL-1. Glicoproteína ligando 1 de P-selectina.
PCR. Proteína C reactiva.
PRR. Receptores de reconocimiento de patrones.
PCK9. Proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9.
PSGL-1. Glicoproteína ligando-1 de P-selectina.
PUFA. Ácidos grasos poliinsaturados.
RLR. Receptor de tipo RIG.
RMN. Resonancia magnética nuclear.
SREBP-2. Proteína de unión al elemento de regulación de esteroides 2.
TLC. Cromatografía en capa fina.
TLR. Receptores tipo *Toll*.
TNF- α . Factor de necrosis tumoral- α .
VCAM-1. Molécula de adhesión vascular 1.
VLA-4. Antígeno muy tardío-4.

2. Introducción

2.1. Generalidades de la aterosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial comprendiendo alrededor del 30% de todas las causas de muerte (Fig. 2.1)[1,2]. Asimismo, los esfuerzos dedicados a la búsqueda de nuevas terapias para su tratamiento no han tenido resultados lo suficientemente efectivos. Debido a ello, es muy importante la búsqueda de nuevos tratamientos para mejorar la expectativa y calidad de vida de los pacientes. Disminuir los niveles de colesterol en sangre, estabilizar los valores de presión arterial y evitar el sobrepeso se encuentran entre las estrategias de prevención más importantes. Si bien el apego a una dieta adecuada y un estilo de vida saludable ayudan a disminuir la incidencia de eventos cardiovasculares mayores (MACE, por su sigla en inglés), existen otros blancos importantes en el tratamiento de la aterosclerosis entre los que se incluyen la inflamación vascular y el estrés oxidativo asociado [3]. De hecho, el estrés oxidativo y el proceso inflamatorio son componentes fundamentales en la formación de la placa de ateroma y la aparición de MACE, entre los que se encuentra el infarto de miocardio (IM) y los accidentes cerebro-vasculares (ACV).

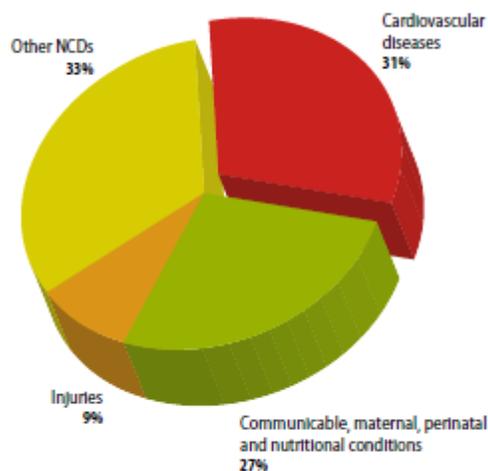


Figura 2.1. Distribución de las causas de muerte a nivel mundial.
Tomado de [2]

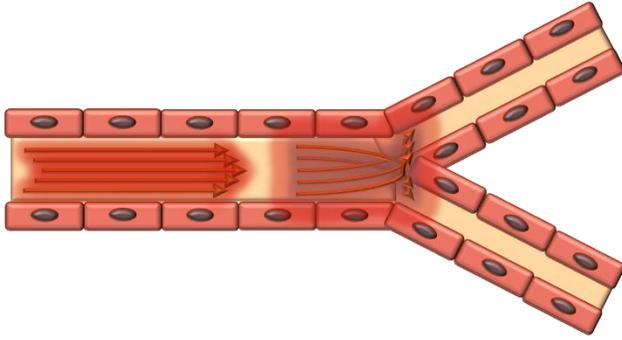


Figura 2.2. Flujo sanguíneo laminar y turbulento en áreas sin y con bifurcaciones, respectivamente.

El endotelio de la mayor parte del árbol vascular está sometido a un flujo pulsátil y a una presión relativamente constante, conocido como *shear stress*. La íntima responde a los cambios en el flujo sanguíneo mediante una serie de mecanismos adaptativos que involucran señales intracelulares particulares que inducen modificaciones en la transcripción génica y la morfología celular con remodelación estructural [4,5]. Sin embargo, en las bifurcaciones del árbol vascular existen zonas sometidas a un flujo turbulento, condición que se agrava en la hipertensión. En estas regiones atero-pronas el flujo sanguíneo se aparta del flujo normal pulsátil y unidireccional para crear zonas con inversión de flujo, oscilaciones y turbulencia ocasional (Fig. 2.2) [4]. Estos cambios en el flujo generan áreas propensas a lesiones de la vasculatura arterial donde se produce pérdida de la continuidad endotelial, y extravasación de los componentes sanguíneos, en particular leucocitos y la lipoproteína de baja densidad (LDL), que pasan al subendotelio e inician la formación de la placa de ateroma [6].

2.2. Estrés oxidativo

Las especies reactivas (ER) son definidas clásicamente como metabolitos parcialmente reducidos del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) que poseen gran capacidad de oxidación. En cuanto al oxígeno, el punto crítico en la generación de ER a nivel endógeno es la formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a través de diversas vías. Espontáneamente, la cadena de transporte electrónico mitocondrial libera pequeñas cantidades de superóxido, principalmente a nivel de los complejos I y III (Fig. 2.3). La producción de $O_2^{\bullet-}$ en los complejos I y III se relaciona directamente con la relación $NADH/NAD^+$ y con el potencial de membrana. En el complejo I, una alta relación

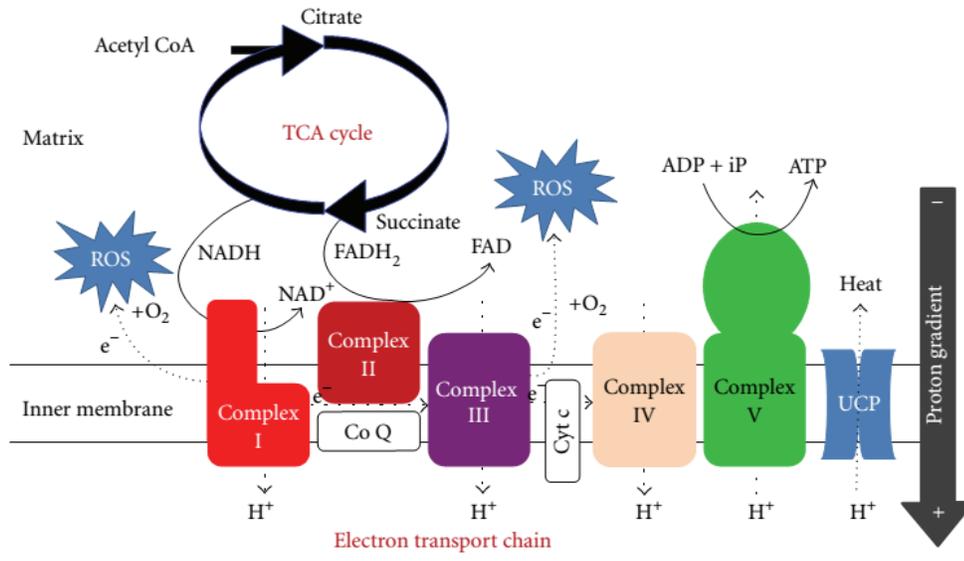
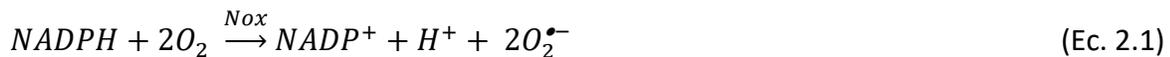


Figura 2.3. Cadena de transporte electrónico mitocondrial como fuente de ROS. Tomado de [7]

NADH/NAD⁺ favorece el movimiento de electrones, aumentando la velocidad de producción de O₂^{•-}. Por otro lado, un alto potencial de membrana, genera la energía necesaria para el transporte reverso de electrones vía coenzima Q reducida, y este proceso ha sido descrito como generador de superóxido [8,9]. Los ciclos de oxidación y reducción de quinona son la principal vía de generación de O₂^{•-} en el complejo III, debido a la formación de semiquinonas inestables, principalmente en condiciones de alto potencial de membrana [10,11].

Por otra parte, la familia de las NADPH oxidasas (Nox) y en particular la isoforma inducible (Nox2) presentes en células fagocíticas, cataliza la formación de superóxido a partir de oxígeno molecular (Ec. 2.1) como herramienta para la eliminación de patógenos.



Exceptuando la Nox 4, estas enzimas se encuentran inactivas en condiciones basales, y requieren de estímulos para el ensamblaje de sus subunidades críticas, tales como la p40, p47 y p67 [12]. Otra vía de generación de ERO es a partir de la xantina oxidasa (XO). La XO es una flavoenzima que cataliza la hidroxilación de xantina a ácido úrico, el paso limitante del catabolismo de purinas. En mamíferos, esta enzima existe en dos formas interconvertibles: xantina oxidasa y xantina

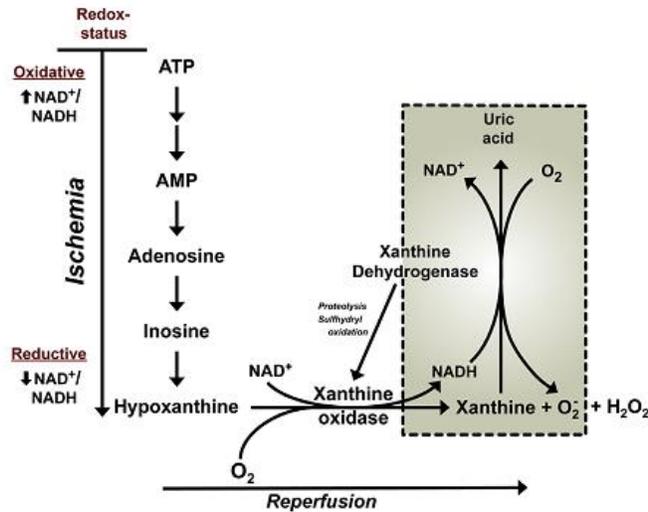


Figura 2.4. Esquema de isquemia/reperfusión donde se observa la formación de ERO por xantina oxidasa. Tomado de [12].

deshidrogenasa (Fig.2.4). En un tejido sano, predomina la primera, que utiliza NAD^+ como aceptor de electrones. Sin embargo, la XO utiliza oxígeno, potencial generador de ERO. Cuando el O_2 actúa como el aceptor de electrones de la hipoxantina, genera tanto $\text{O}_2^{\cdot-}$ como H_2O_2 [13].

Una vez que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ es generado puede reaccionar de diferentes maneras (Fig. 2.5). Por un lado, la dismutación a H_2O_2 , se puede dar de manera espontánea, o catalizada enzimáticamente mediante la familia de superóxido dismutasas (SOD, E.C. 1.15.1.1) (Ec. 2.2).



Posteriormente el H_2O_2 se descompone por acción de enzimas específicas, entre las que se incluyen la catalasa (E.C. 1.11.1.6) y varias peroxidasas [14]. Entre estas, la acción concertada de la seleno-enzima glutatión peroxidasa (E.C. 1.11.1.9) con glutatión (GSH) y la glutatión reductasa dependiente de NADPH (E.C. 1.6.4.2) se destacan en las células de mamífero por la alta concentración del GSH, así como por la efectividad para remover tanto H_2O_2 como hidroperóxidos lipídicos [15]. Adicionalmente, el sistema formado por la familia de las peroxiredoxinas (E.C. 1.11.1.15) y su sistema reductor formado por el par

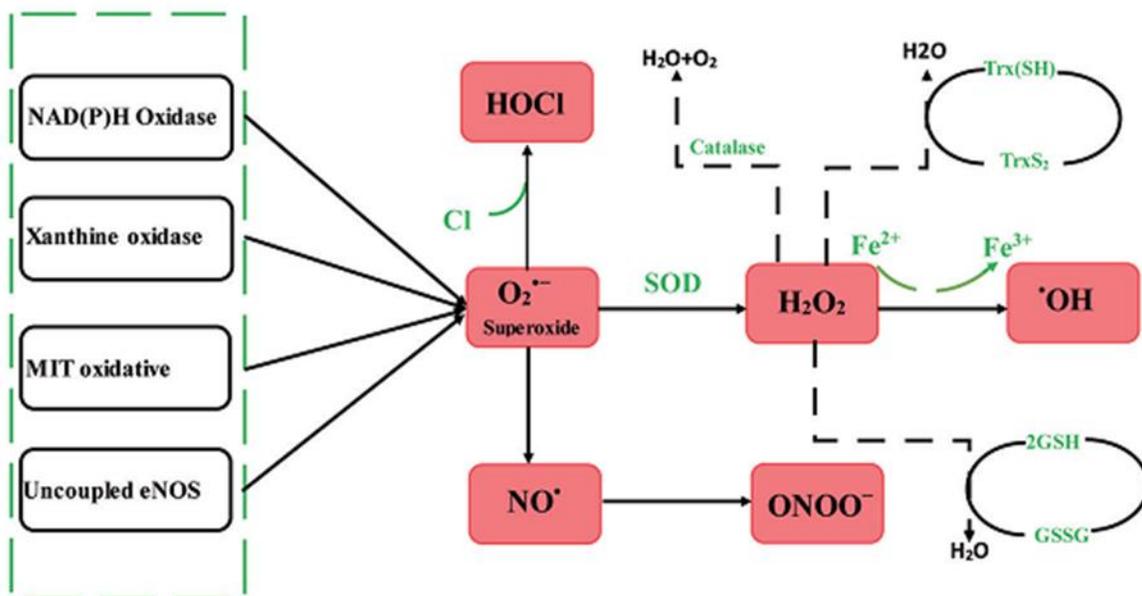


Figura 2.5. Principales vías de formación y descomposición de ER a nivel endógeno. Tomado de [16]

tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (E.C. 1.8.1.9) y NADPH, participan tanto en la rápida remoción del oxidante como en la propagación de los mecanismos de señalización desencadenados por H_2O_2 [17]. En presencia de metales de transición, el H_2O_2 puede reducirse a radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Ec. 2.3) [18,19], un oxidante muy potente.



El superóxido también puede reaccionar con haluros, en particular Cl_2 , para generar hipoclorito (OCl^-), reacción muy rápida en presencia de mieloperoxidasa [20] (Fig. 2.5). Por otro lado, el $O_2^{\cdot -}$ es capaz de reaccionar con óxido nítrico ($\cdot NO$), una especie cuya formación acoplada a la oxidación aerobia de L-arginina es catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) [21,22]. Esta reacción rinde peroxinitrito [23], una especie con fuerte carácter oxidante y de vida media corta cuyo producto de protonación, el ácido peroxinitroso se descompone homolíticamente a $\cdot NO_2$ y $\cdot OH$ (Fig. 2.6) [24,25]. Todas las especies resultantes presentan una reactividad muy importante con biomoléculas esenciales, tales como el ADN, proteínas y lípidos, por lo que sus niveles deben

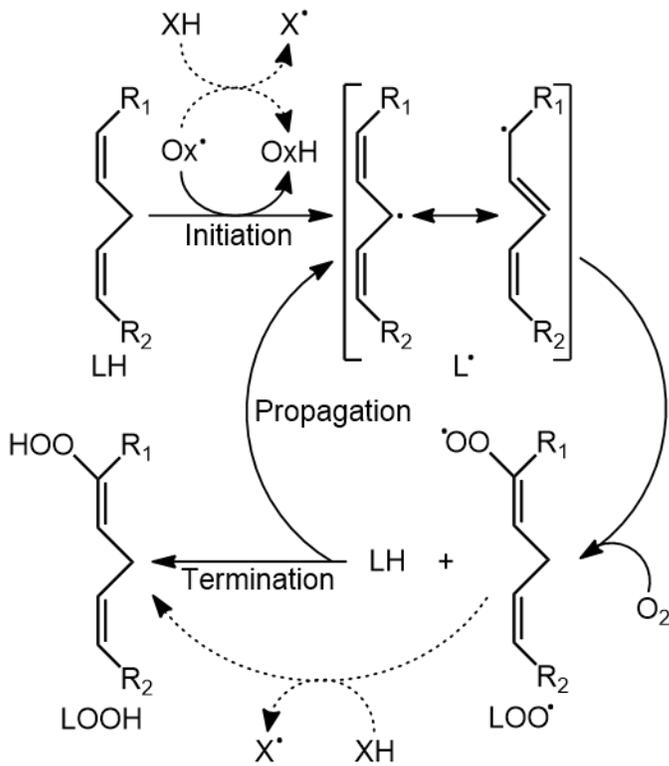


Figura 2.7. Representación esquemática de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Cortesía Bruno Musetti.

2.3. Lipoperoxidación

La lipoperoxidación es un proceso oxidativo que rinde principalmente radicales peróxido (LOO^\bullet). Los fosfolípidos de las membranas biológicas son particularmente susceptibles a este fenómeno, ya que al estar compuestos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por su sigla en inglés), son centros electrofílicos altamente sensibles a la oxidación [28]. La reacción se inicia cuando un radical abstrae un átomo de hidrógeno de una cadena alifática (Fig. 2.7). Dicho ataque produce una estabilización por resonancia del radical lipídico, lo que resulta en la formación de un dieno conjugado, capaz de reaccionar con oxígeno para dar un peróxido lipídico. A su vez, este peróxido lipídico reacciona con otros lípidos adyacentes, propagando el daño oxidativo. Los productos finales de descomposición son moléculas pequeñas entre las que destacan el malondialdehído y diferentes alquenes [29]. Unidos al centro hidrofóbico de la LDL, se encuentra una importante

cantidad de lípidos los cuales son distribuidos a las células en condiciones normales. En un contexto inflamatorio, las especies oxidantes derivadas de la producción de O_2^- por la Nox-2 hacia el espacio extracelular pueden oxidar los lípidos contenidos en la LDL, generando LDL oxidada (LDLox). La LDL modificada oxidativamente o acetilada (LDLac), presenta epítomos reconocibles por la inmunidad innata a través de receptores específicos. De hecho, a nivel leucocitario se expresan varias proteínas de membrana capaces de reconocer e internalizar a la LDL modificada, que a diferencia del receptor de LDL (LDL-R) son no saturables. Entre estos receptores se encuentran los receptores tipo Toll (TLR), en particular TLR 4 y 6, además de los receptores denominados “scavenger”, entre los que se encuentran SRA-I/II y el CD36 [30]. A nivel intracelular también existen receptores capaces de reconocer estos patrones moleculares alterados, como veremos más adelante. El reconocimiento de la LDL modificada lleva a su internalización y acumulación dentro de los macrófagos subendoteliales, los cuales se transforman en células espumosas [6] (Fig. 2.8). Este proceso conduce a la activación de los macrófagos y la liberación de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- κ B. El NF- κ B es un factor de transcripción citosólico el cual, al ser activado luego de la degradación de su inhibidor, migra al núcleo para asociarse a elementos de respuesta específicos (RE) y activar la transcripción de genes relacionados a la respuesta inmune innata [31].

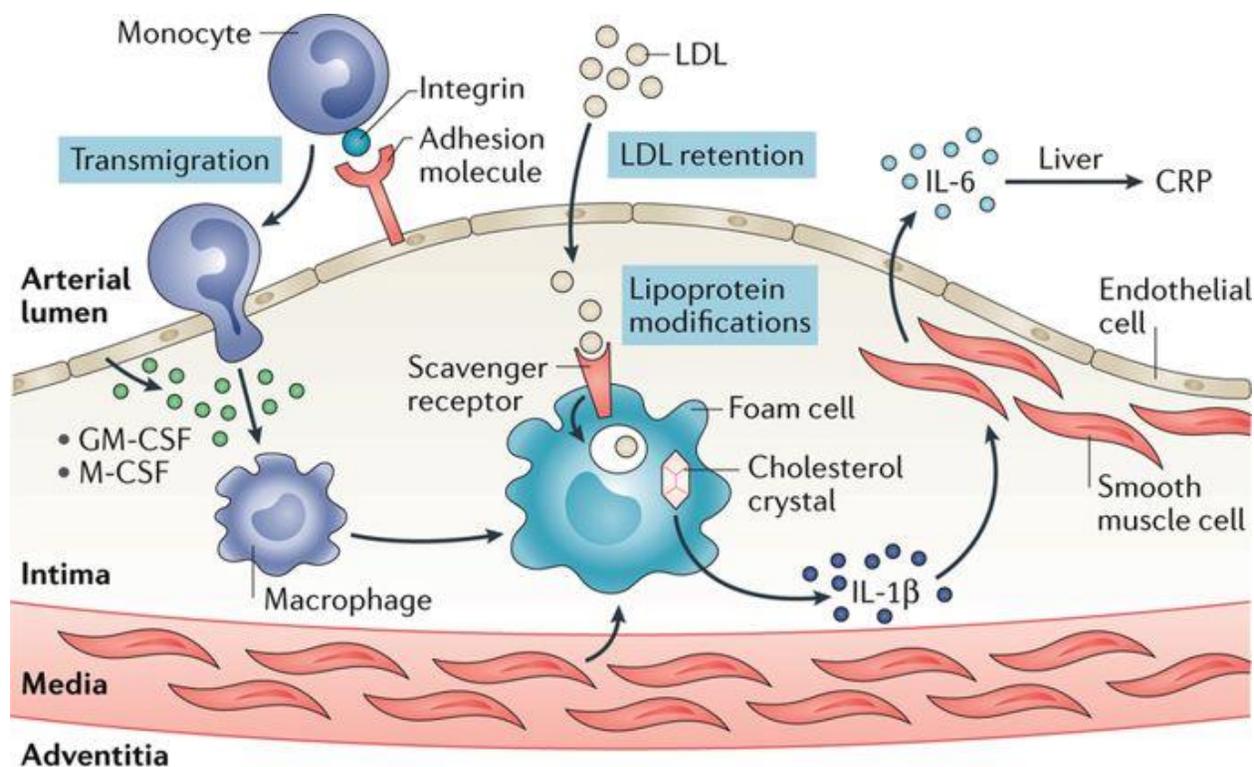


Figura 2.8. Esquema de las fases iniciales en el desarrollo del proceso aterosclerótico. Tomado de [32]

2.4. Aterosclerosis e inflamación

La aterosclerosis era considerada clásicamente como una patología únicamente asociada a hipercolesterolemia y al depósito de lípidos en el subendotelio. Sin embargo, la evolución de la inmunología en el último siglo, llevó a un conocimiento más profundo de los mecanismos de la inmunidad innata involucrados en la generación de la placa de ateroma [33]. Entre ellos, se incluyen la revisión de los factores de riesgo reconocidos para incluir índices sistémicos de inflamación [34–37] y la realización de investigaciones clínicas sobre la eficacia del tratamiento antiinflamatorio [38]. La evolución del concepto de disfunción endotelial y el entendimiento de la existencia de un fenotipo proinflamatorio endotelial ha generado un corrimiento en el

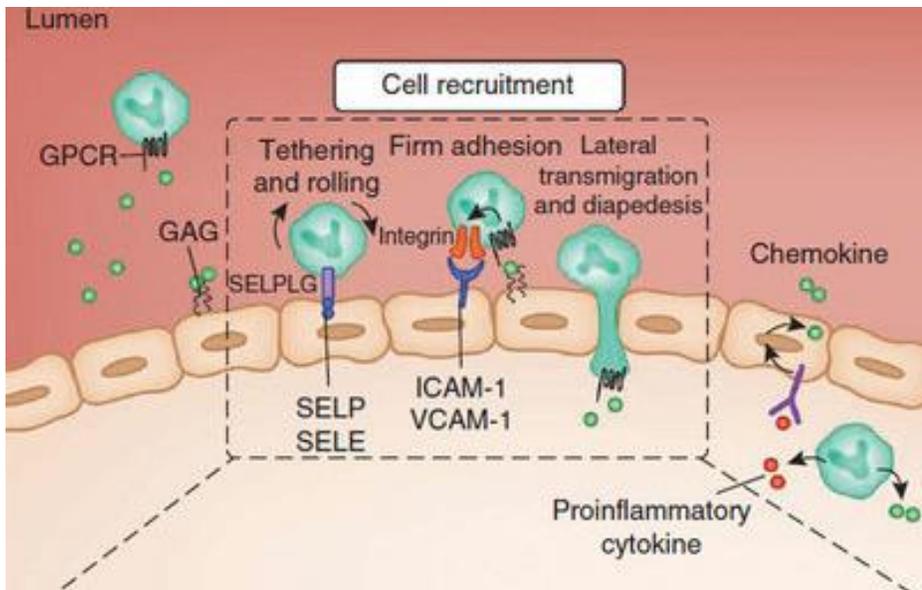


Figura 2.9. Papel de las quimioquinas y sus receptores en la aterogénesis. El reclutamiento de leucocitos implica su rodamiento, adhesión firme, migración lateral y diapedesis transendotelial, controlada por quimioquinas. Mientras que las quimioquinas solubles median en el reclutamiento directo de leucocitos, las quimioquinas inmovilizadas en la superficie de las células endoteliales (EC) activadas a través de glicosaminoglicanos (GAG) desencadenan la detención de los leucocitos a través de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), que activan las integrinas de los leucocitos. Modificado a partir de [39].

paradigma, llevando a importantes avances tanto en la investigación básica como a nivel traslacional [40]. Entre estos, el reconocimiento de la existencia de una modulación dramática en el fenotipo funcional de las células endoteliales en respuesta a productos bacterianos y otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS) ha cambiado la investigación y los enfoques terapéuticos en el área [6]. La respuesta inmune innata puede dispararse también en presencia de moléculas endógenas modificadas mediante patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), en el caso del proceso aterosclerótico tienen particular relevancia las lipoproteínas modificadas [41]. También las citoquinas, como la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón γ (IFN- γ) son inductores del fenotipo endotelial inflamatorio [42]. La característica fundamental de esta forma de respuesta endotelial, denominada activación de tipo II [42,43], es la activación de factores de transcripción pleiotrópica, tales como el NF- κ B, que da como resultado la expresión de varias proteínas efectoras con importantes implicancias fisiopatológicas. Entre las proteínas

efectoras endoteliales se incluyen al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), implicados en la presentación de antígenos; las moléculas de adhesión a leucocitos, tales como la molécula de adhesión de leucocitos-1 (E-selectina) y la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1); moléculas procoagulantes, como el factor tisular; y quimioquinas secretadas, tales como IL-8 y la proteína quimio-atrayente de monocitos-1 [33,44,45]. La expresión inducida de estas moléculas genera la activación coordinada del fenotipo endotelial proinflamatorio [40]. Este fenotipo es detectable *in vivo* en sitios de inflamación en la microvasculatura, tanto en humanos como en animales de experimentación [46,47].

Los monocitos circulantes se asocian inicialmente mediante selectinas a la glicoproteína ligando-1 de P-selectina (PSGL-1) del endotelio vascular [39]. Luego se asocian firmemente a través de las integrinas [48] y finalmente atraviesan el espacio intercelular para invadir el subendotelio [49]. La expresión de moléculas de adhesión a nivel de la membrana apical de las células endoteliales, como VCAM-1, se da en respuesta al aumento del nivel de colesterol selectivamente en zonas proclives a la formación de lesiones. A través de VCAM-1 se genera la asociación y diapédesis leucocitaria, con la consecuente invasión del espacio subendotelial por células inmunes (Fig. 2.9). Luego, la inducción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α , y de factores quimio tácticos como MCP-1, propagan el proceso inflamatorio [50].

2.5. El inflamasoma NLRP3 en aterosclerosis.

Varias señales de peligro (DAMPs y PAMPs) son capaces de activar la formación del inflamasoma al activar los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR) [51]. La activación de inflamasomas, en particular del inflamasoma generado por receptores tipo NOD que contienen dominio pirina 3 (NLRP3), también están involucrados en múltiples enfermedades degenerativas, incluida la aterosclerosis [52,53].

Duewell y colaboradores demostraron que los cristales de colesterol son capaces de activar al inflamasoma NLRP3 en fagocitos *in vitro*. En concordancia con esto, la carencia de componentes

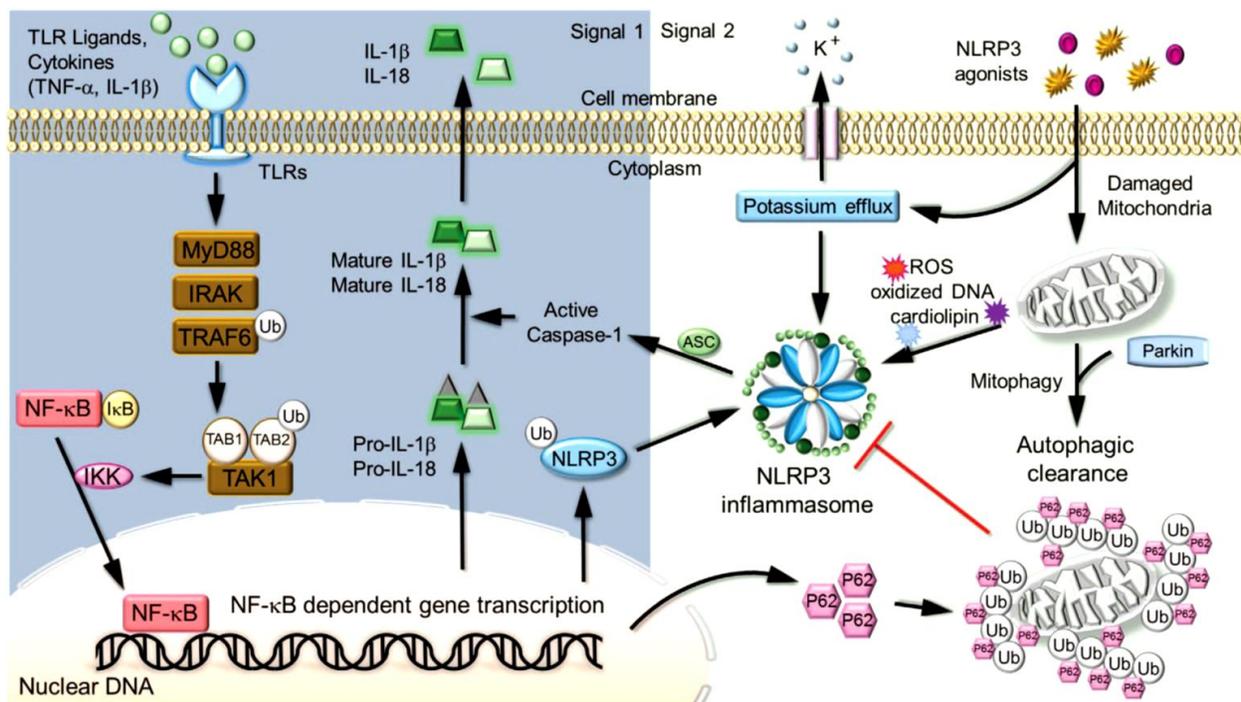


Figura 2.10. Mecanismos de la liberación de IL-1β impulsada por inflammasoma NLRP3. La activación del inflammasoma NLRP3 requiere dos señales, cebado y activación. Un ejemplo prototípico de cebado es la unión de LPS bacteriana a TLR4, que conduce a la activación de la señalización de NF-κB. En el núcleo, el NF-κB activo promueve la transcripción de los genes dependientes de NF-κB, como NLRP3, Pro-IL-1β y Pro-IL-18, que son necesarios para la activación del inflammasoma. La segunda señal de activación del inflammasoma es proporcionada por los agonistas de NLRP3 que activan NLRP3 para desencadenar el ensamblaje de inflammasoma y la secreción de IL-1β madura. Tomado de [54].

del inflammasoma redujo la aterosclerosis temprana en ratones deficientes en el receptor de LDL (LDL-R^{-/-}) sometidos a una dieta alta en colesterol [55], mientras que en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), tanto la LDLox como el TNFα fueron capaces de desencadenar la activación del inflammasoma NLRP3, efecto inhibible por estatinas [56]. Por otro lado, la asociación de LDLox a receptores CD36 de macrófagos llevó a activación del inflammasoma NLRP3 con la consecuente generación de IL-1β. Por su parte, la depleción de CD36 en ratones produjo una disminución en la concentración sérica de esta interleuquina junto con un decrecimiento en la acumulación de cristales de colesterol en las placas ateromatosas [57].

A nivel clínico, un estudio aleatorizado demostró que los niveles de ARNm y proteína de NLRP3 en células mononucleares de sangre periférica son más altos en los pacientes con enfermedad

coronaria y se correlacionan positivamente con los niveles plasmáticos de IL-1 β e IL-18. Adicionalmente, la concentración plasmática de estas citoquinas se redujo significativamente después del tratamiento farmacológico con estatinas durante 8 meses [58]. Por otro lado, la asociación de LDL electronegativa (LDL(-)), una forma de LDL modificada aislada de suero humano, a receptores tipo *Toll* 4 (TLR4) de monocitos y macrófagos es capaz de inducir la iniciación (*priming*) aumentando los niveles de pro-interleucina 1 β (IL-1 β) y el ensamblaje del inflamasoma [59].

La producción y liberación de IL-1 β se regula en dos pasos (Fig. 2.10): una primera etapa consiste en la síntesis transcripcional de pro-IL-1 β , que se continúa en una segunda etapa consistente en el procesamiento proteolítico a una forma madura y activa de la citoquina. Esta activación proteolítica es catalizada por la caspasa-1, activada por asociación al inflamasoma (Fig. 2.10) [54]. Los PRR se clasifican en al menos cuatro grupos: receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG-I (RLR) y receptores de lectina tipo C (CLR) [60]. La regulación transcripcional del ARNm de IL-1 β está mediada por PRR o receptores de citoquinas, incluidos los TLR y el receptor de IL-1 (señal 1), y se conoce como cebado (*priming*). La estimulación de estos receptores activa señales mediadas por NF- κ B y la subsecuente inducción de los genes que codifican para IL-1 β y NLRP3, aumentando su síntesis. Al mismo tiempo se desencadena la regulación postranscripcional del inflamasoma [61]. Posteriormente, la pro-IL-1 β acumulada en el citosol se procesa rápidamente por la caspasa-1 activada por NLRP3 (señal 2) [62]. La acumulación descontrolada de cristales de colesterol a partir de LDL, daña las membranas lisosomales, causando la liberación de peptidasas al citosol que también activan a la caspasa 1 [55].

2.6. Terapia farmacológica

Además de las medidas higiénico-dietéticas imprescindibles para un abordaje integral de la patología, existen fármacos comerciales que mediante diferentes estrategias son capaces de disminuir los niveles de colesterol circulante y/o el proceso inflamatorio. Dada la naturaleza inflamatoria de la lesión ateromatosa se ha dado gran importancia al uso de anti-inflamatorios. Sin embargo, las terapias antiinflamatorias actuales a lo sumo sólo retrasan la progresión de la

aterosclerosis, pueden ser utilizadas solo por un cierto grupo de la población general, y aún están en desarrollo y evaluación, a pesar de su reconocimiento prolongado en el tratamiento de la aterosclerosis [63].

Las terapias farmacológicas empleadas para la aterosclerosis se pueden dividir en cuatro categorías: medicamentos antiinflamatorios "clásicos", biológicos, mediadores lipídicos e inhibidores de las vías intracelulares. Un somero resumen del estado actual de la terapia anti-aterosclerótica se resume en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Principales fármacos en la terapia para la aterosclerosis [64].

Fármacos	Eficacia	Desarrollo
Anti-inflamatorios "clásicos"		
AINEs	Se describe en el texto	En venta
Metotrexato	Reduce la mortalidad e IM en pacientes con AR [65]; pero no los eventos vasculares en pacientes con CAD (METIS) [66].	Fase III
Colchicina	Reduce el riesgo de IM [67,68].	Fase III
Alopurinol	Aumenta la tolerancia al ejercicio y disminuye la mortalidad en pacientes con CAD [69]	Fase II
Biológicos		
Anti-TNF (etanercept, infliximab, adalimumab)	y Disminuye el riesgo de ECV, los niveles de PCR, e IL-6 y aumenta los niveles de HDL en pacientes con AR [70,71].	Fase III
Anti-IL-1 (canakinumab)	Disminuye PCR e IL-6 (NSTE-ACS) (MRC-ILA Heart Study). Reduce PCR, fibrinógeno, e IL-6 en pacientes con diabetes tipo 2 [72,73]	Fase III
Mediadores lipídicos		
Inhibidores de la absorción de colesterol (ezetimibe)	sPLA ₂ Reduce significativamente los niveles de LDL, CRP y sPLA ₂ -IIA y el número de lesiones ateroscleróticas con atorvastatina (ACS-FRANCIS); asociado con un mayor riesgo de IM (VISTA-16) [74,75].	Fase III
Estatinas	Se describe en el texto	En venta
Inhibidores de PCSK-9	Reduce el nivel de LDL-C en 15–22%. Estudios clínicos respaldan su administración como terapia de segunda línea en pacientes con intolerancia o contraindicación para las estatinas (PRECISE-IVUS; IMPROVE IT) [76,77].	Fase III
ácidos grasos n-3	Se describe en el texto	Fase III
	Disminuyen los TG hasta 45%; sin efectos significativos sobre eventos CVD [78].	Fase III
Inhibidores de las vías intracelulares		

inhibidores de p38 MAPK	SB203580 atenuó la aterosclerosis [79]; dilmapimod disminuyó la PCR [80]; losmapimod mejoró la función endotelial y disminuyó la PCR (SOLSTICE) [81–83].	Fase II
Inhibidores de la Fosfodiesterasa (PDE)	Roflumilast disminuyó la expresión de citoquinas y la incidencia de ECV en pacientes con EPOC [84,85]	Fase IV
Antioxidantes (succinobucol)	Disminuyó los casos de diabetes y la muerte por ECV, paro cardíaco, IM y ACV en pacientes con IM o angina inestable (ARISE); mejoró los efectos sobre las dimensiones del lumen en los vasos con stent y los niveles de MPO en plasma (CART-2) [86,87].	Fase III

2.6.1. Estatinas

Las estatinas son inhibidores competitivos de la hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA R), la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de colesterol. Estos fármacos representan al día de hoy el primer nivel terapéutico en pacientes con hipercolesterolemia. Los componentes estructurales esenciales de todas las estatinas son una unidad de ácido dihidroxiheptanoico y un sistema de anillos con diferentes sustituyentes (Fig. 2.11 y 2.12). El farmacóforo de las estatinas es un ácido hidroxiglutarico modificado, estructuralmente similar al sustrato endógeno HMG-CoA y al estado de transición. Las estatinas difieren con respecto a la estructura del anillo y sus sustituyentes. Estas diferencias en la estructura afectan las propiedades farmacológicas de las estatinas, tales como la afinidad por el sitio activo de la enzima y la biodisponibilidad [88]. Por la estructura química se puede distinguir dos tipos fundamentales. La estructura de las estatinas tipo 1 se basa en la estructura decalina cíclica encontrada en la primera estatina descubierta, la mevastatina, aislada por Akira Endo en la década del 70 de *Penicillium citrinum* [89]. Pertenecen a este grupo la lovastatina, la pravastatina, y la simvastatina, entre otras (Fig. 2.11). Una de las principales diferencias entre las estatinas tipo 1 y tipo 2 es la sustitución del grupo butirilo de la estatina tipo 1 por el grupo fluorofenilo de la estatina tipo 2. Este grupo es responsable de interacciones polares adicionales que causan enlaces más fuertes con la enzima. A las estatinas de tipo 2 pertenecen la fluvastatina, la cerivastatina, la atorvastatina, la rosuvastatina y la pitavastatina (Fig. 2.12).

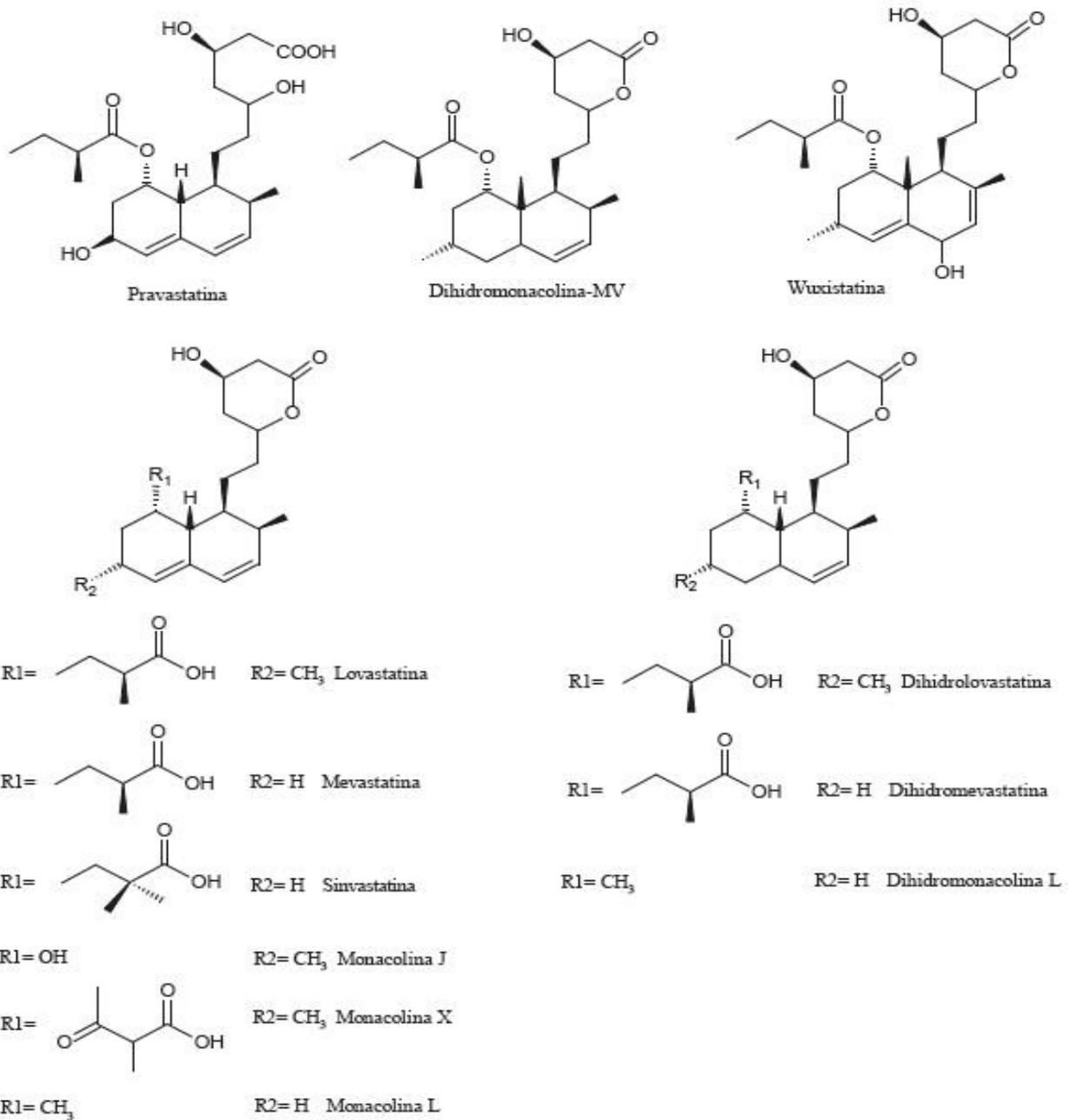


Figura 2.11. Estructura química de las estatinas tipo 1.

Estudios clínicos demostraron que en pacientes post-IM que recibieron el tratamiento con pravastatina tuvieron niveles reducidos de riesgo ECV (23%) y de ACV (31%) (CARE) [90], mientras que los hombres con hipercolesterolemia moderada sin antecedentes de IM redujeron significativamente la incidencia de IM y la muerte por causas ECV sin afectar el riesgo de muerte

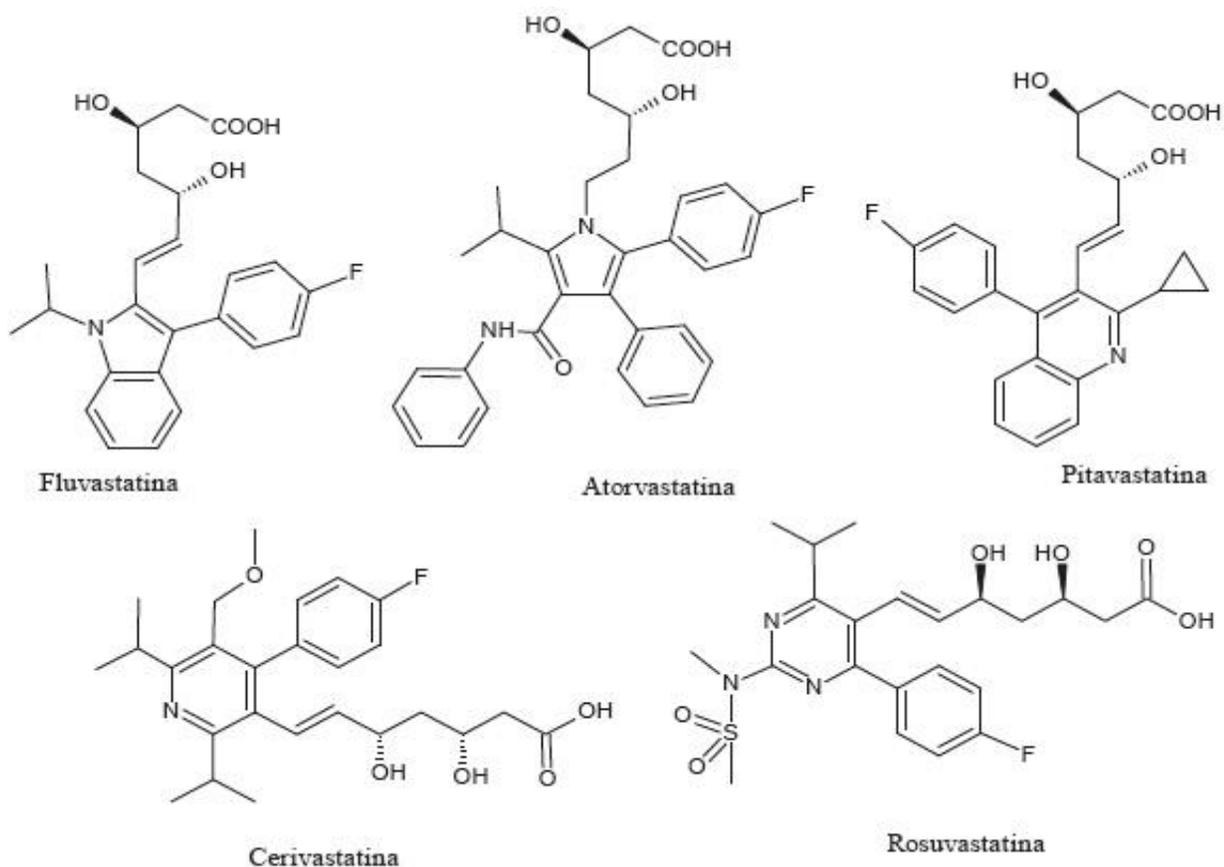


Figura 2.12. Estructura química de las estatinas tipo 2.

por factores no CV (WOSCOP) [91]. Para lovastatina, los pacientes sin antecedentes de patología CV tuvieron una reducción significativa en los eventos graves y solo los pacientes con niveles de LDL <150 mg/dL y niveles de PCR > 2 mg/L tuvieron un beneficio clínico significativo (AFCAPS / TexCAPS) [92]; para simvastatina, los pacientes con angina de pecho o IM previo habían mejorado la supervivencia (4S) [93]; para atorvastatina, los pacientes que recibieron el tratamiento tuvieron una reducción significativa en los niveles de PCR y LDL (PROVE IT-TIMI-22) [94]; para la rosuvastatina, las dosis de 40 mg/día resultaron en una regresión significativa de la aterosclerosis entre 507 pacientes con ensayos de ultrasonido intravascular (ASTEROID) [95], las dosis máximas de rosuvastatina y atorvastatina dieron como resultado una regresión significativa de la aterosclerosis coronaria (SATURN) [96,97]. En suma, múltiples estudios clínicos mostraron que

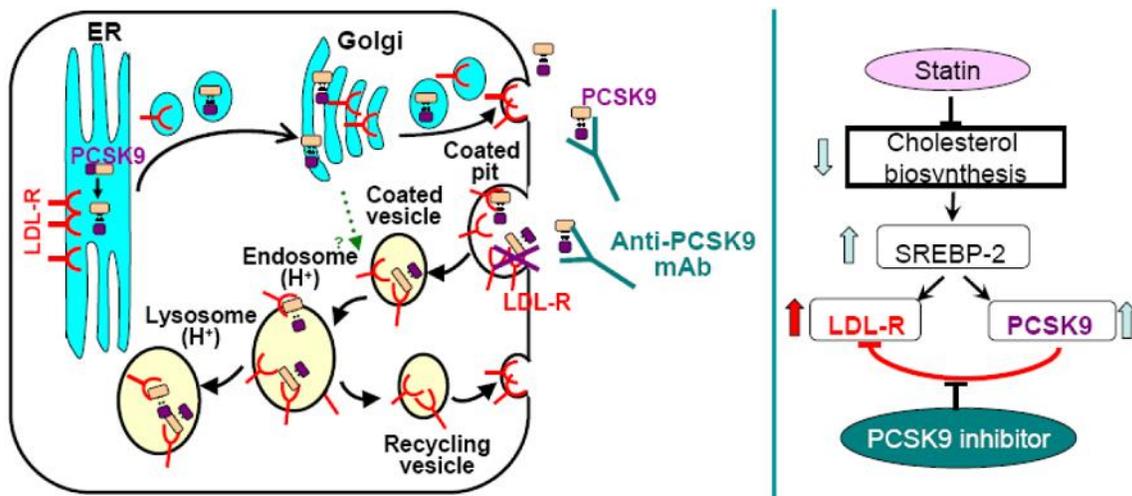


Figura 2.13. Mecanismos de acción y vías interrumpidas por estatinas e inhibidores de PCSK-9. Tomado de [98]

independientemente del nivel de referencia de LDL-C y del riesgo cardiovascular, se produjo una reducción del 22% en el riesgo de eventos CV gracias a la terapia con estatinas [99,100]. Sin embargo, efectos secundarios asociados al tratamiento han sido reportados, tales como diabetes o enfermedades del músculo esquelético [101]. Esto podría deberse a que la inhibición de la HMG-CoA reductasa conlleva una depleción de los metabolitos intermedios y finales de sus vías de acción, tales como proteínas isopenteniladas, colesterol, dolicol y ubiquinona. Como resultado, se interrumpen las cascadas de señalización asociadas, induciendo apoptosis [102,103]. Asimismo, estudios transversales han demostrado que pacientes tratados con estatinas mantuvieron niveles altos de colesterol asociado a LDL, siendo aún más prevalente en pacientes de bajo riesgo, y en pacientes diabéticos [104–106]. Esto sugiere que en gran parte de los casos se debería aumentar las dosis prescritas, o bien combinar el tratamiento con otros fármacos para obtener el objetivo deseado [104]. El aumento de las dosis e incluso el empleo de terapias combinadas enfrenta la posibilidad del aumento en el riesgo de iatrogenia.

2.6.2. Inhibidores de PSCK9

Otro grupo de fármacos aprobados para el uso comercial son los inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PSCK9). Esta enzima se une al dominio del factor de

crecimiento epidérmico A (EGFA) del receptor extracelular de LDL, inhibiendo el reciclaje de LDL, lo que limita la eliminación de las partículas de LDL de la circulación [107,108]. Una vez la PCSK9 es secretada a la circulación, puede encontrarse sola o unida a proteínas, y su actividad es regulada por los niveles intracelulares de colesterol, por lo cual posee un importante rol en la homeostasis. La transcripción de los genes que codifican para el receptor de LDL y de PCSK9, son regulados positivamente por la proteína de unión al elemento de regulación de esteroides 2 (SREBP-2, fig. 2.13). Por lo cual, una depleción en colesterol, no disminuye significativamente los niveles de LDL plasmáticos, y ello podría explicar la baja efectividad observada en un importante número de pacientes tratados con estatinas [109]. Una serie de anticuerpos monoclonales que se unen e inhiben PCSK9 cerca del dominio catalítico se comenzaron a usar en ensayos clínicos a partir de 2014 [110]. A partir de julio de 2015, la UE aprobó estos medicamentos. En el estudio multicéntrico GLAGOV (*Global Assessment of Plaque Regression With a PCSK9 Antibody as Measured by Intravascular Ultrasound*) que involucró a 968 pacientes con enfermedad coronaria diagnosticada por angiografía, se demostró que la adición del inhibidor de PCSK9 evolocumab a la terapia con estatinas produjo una mayor disminución de LDL-colesterol (93.0 vs 36.6 mg/dL) y regresión de la placa de ateroma (64.3% vs 47.3%) que las estatinas solas [74]. Un metanálisis de 24 ensayos clínicos ha demostrado que los anticuerpos monoclonales contra PCSK9 pueden reducir el colesterol, los eventos cardíacos y la mortalidad por todas las causas [111]. Un posible efecto secundario del anticuerpo monoclonal podría ser la irritación en el lugar de la inyección. Antes de las infusiones, los participantes recibieron corticosteroides orales, bloqueadores de los receptores de histamina y acetaminofeno para reducir el riesgo de reacciones relacionadas con la infusión, que por sí mismas causarían varios efectos secundarios [112]. En ensayos clínicos se demostró que evolocumab y alirocumab podrían disminuir el volumen de ateroma y los eventos CV [113]. El costo de estos nuevos medicamentos, es elevado y para varios autores consideran que no se justifica su uso por la elevada relación costo-beneficio [114].

2.6.3. AINES

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son inhibidores de la prostaglandina H sintasa o ciclooxigenasa (COX), la enzima encargada del paso limitante en la síntesis de prostaglandinas y

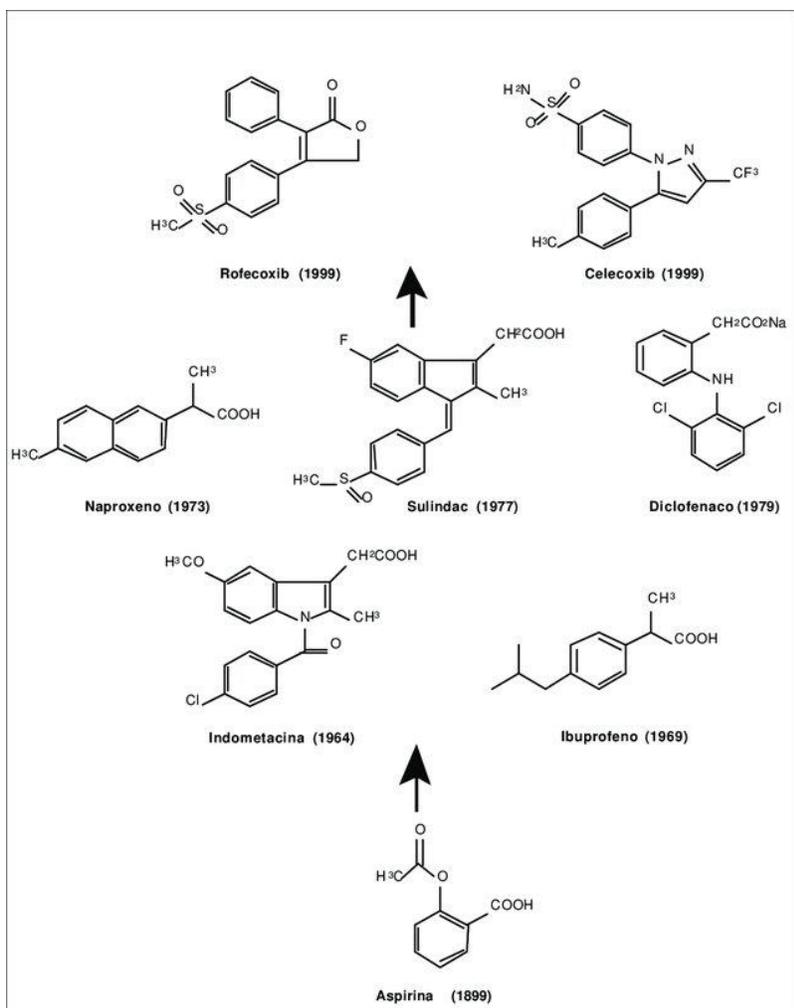


Figura 2.14. Estructura química de los AINE.
Tomado de [115].

tromboxanos (fig. 2.14) [116]. Como clase terapéutica, proporcionan actividades antipiréticas, analgésicas y anti-inflamatorias, pero el grado relativo de estos efectos varía notablemente entre los compuestos (por ejemplo, el paracetamol tiene efectos antipiréticos y analgésicos pero poca actividad antiinflamatoria). Además, los AINE comparten los efectos secundarios a nivel gastrointestinal, inhibición de la motilidad uterina, inhibición de la función renal mediada por PG y las reacciones de hipersensibilidad. Las frecuencias relativas de estos efectos secundarios, sin embargo, varían notablemente entre los miembros de la clase [117]. Estos se dividen en inhibidores no específicos y específicos para COX-2. La aspirina, es inhibidor irreversible de ambas isoformas, llevando a una inhibición permanente de la COX-1 en las plaquetas [118]; las dosis altas de aspirina podrían inhibir la COX-2 y prevenir la disfunción endotelial mediada por

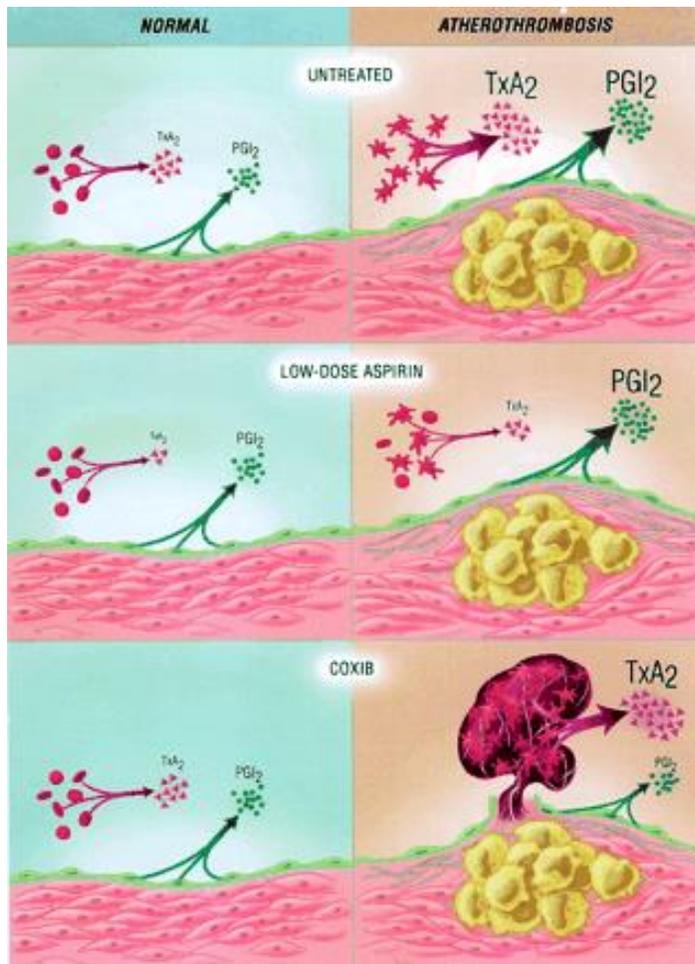


Figura 2.15. Consecuencias de la inhibición de COX-2 a nivel vascular. La ilustración muestra a las células endoteliales como fuente de PGI₂ y las plaquetas como fuente de TxA₂ bajo condiciones no tratadas (arriba) o tratado con aspirina en dosis bajas (medio) o un inhibidor de COX-2 (abajo), en una arteria normal (izquierda) y arteria aterosclerótica (derecha). COX-1 es la única isoenzima expresada en las plaquetas; células endoteliales expresar tanto COX-1 como COX-2. En la arteria normal, el equilibrio favorece a PGI₂. En la arteria aterosclerótica, tanto la producción de PGI₂ como la de TxA₂ aumentan. Aspirina en dosis bajas selectivamente reduce la generación de TxA₂ por COX-1. El uso de Coxib suprime la producción de PGI₂ por la COX-2 en células endoteliales, Tomado de [117].

inflamación y liberar los efectos de IL-7. Un estudio multicéntrico retrospectivo de Dinamarca mostró que el uso de diclofenac e ibuprofeno se asoció con un riesgo significativamente mayor de complicaciones cardiovasculares [119]. Por otro lado los inhibidores de la COX-2 se asociaron con un mayor riesgo de ECV que llevó al retiro del mercado de rufecoxib (Vioxx) [120]; celecoxib demostró un número menor de eventos cardiovasculares en comparación con ibuprofeno y naproxeno (PRECISION) [121]. Respecto a los efectos adversos de la inhibición de la COX-2 se concluyó que llevaría a una disminución de la generación de prostaciclina (PGI₂, anti-agregante plaquetario y vasodilatador) por la enzima endotelial, y por tanto a la prevalencia a nivel vascular del efecto del tromboxano (TxA₂, pro-agregante plaquetario) generado por la COX-1 plaquetaria no inhibida, con el consecuente aumento del riesgo cardiovascular (Fig. 2.15) [117].

2.7. Antecedentes de nuestro grupo

En trabajos previos, desarrollamos una serie de derivados simples de arilnitroalqueno con diferentes propiedades estereoelectrónicas, capaces de liberar $\cdot\text{NO}$ (Fig. 2.16) y eliminar los productos altamente reactivos de la descomposición de peroxinitrito, $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ [122]. Nuestros compuestos líder, el 1-dimetilamino-4- (2-nitro-1Z-etenil) benceno (**1**) y 1-dimetilamino-4- (2-nitro-1Z-propenil) benceno (**2**), y en menor medida el 5-(2-nitro-1Z-propenil) benzo [d] [1,3] dioxol (**4**) (Fig. 6.1.A), mostraron además importantes propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antiartríticas en modelos animales [123]. Los efectos farmacológicos fueron, al menos en parte, mediados por la inhibición de la COX, pero los compuestos también pudieron prevenir la activación de metalopeptidasa 9 de la matriz (MMP-9) [123]. Existe evidencia de que la IL-1 β induce la producción de MMP-9 a través de la activación de p42 / p44 MAPK, p38 MAPK, JNK y NF- κ B [124]. Teniendo en cuenta lo anterior, las propiedades antiinflamatorias de los derivados nitroalqueno también podrían deberse a la interferencia en uno o más pasos relacionados, o activados por el ensamblaje del inflammasoma. En consecuencia, podrían ser adecuados para la protección del sistema cardiovascular como una terapia “multitarget”, previniendo la oxidación de LDL y también aliviando la inflamación. Para probar esta hipótesis y con el interés de saber más sobre la relación entre la estructura y la actividad biológica, la capacidad de 20 arilnitroderivados de reaccionar con los radicales peroxilo, evitando la oxidación de LDL y disminuyendo la producción de IL-1 β inducida en macrófagos murinos activados en presencia de LPS/INF- γ , fue analizada.

En nuestros estudios anteriores [122,123], encontramos que la presencia de sustituyentes con carácter electrón-dador en el grupo fenilo desempeñan funciones relevantes para la bioactividad. Por ello, diseñamos nuevos derivados de fenilo sustituidos en posición *para* respecto a la cadena nitroalifática, con propiedades electrónicas similares (Figura 6.1). Por otro lado, para explorar la relevancia del doble enlace adyacente al grupo nitro en la porción nitroalqueno y, como se sabe poco sobre la bioactividad de los nitroalcanos, diseñamos y probamos varios derivados reducidos (Fig. 6.1.B).

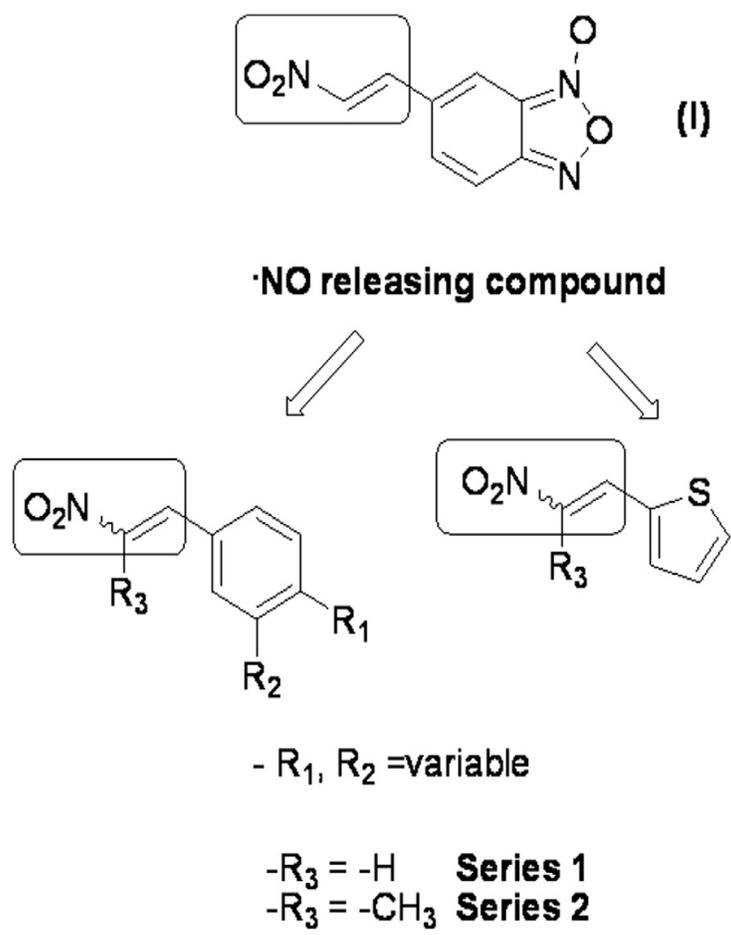


Figura 2.16. Estructura de nitroalquenos aromáticos empleados en [122].

3. Hipótesis

Los nitro-derivados aromáticos tienen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, por tanto, serían potenciales quimioterápicos para el tratamiento de patologías con ambos componentes, como la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Diseño, síntesis, y caracterización fisicoquímica de nitro-compuestos aromáticos; evaluación de sus propiedades antioxidante, anti-inflamatoria y ateroprotectora.

4.2. Objetivos Específicos

- Diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de los compuestos.
- Estudiar la reactividad de los productos con radicales peroxilo.
- Explorar la capacidad de los compuestos de inhibir la oxidación de LDL y la internalización de LDL oxidada por macrófagos.
- Investigar los mecanismos moleculares involucrados en la actividad anti-inflamatoria de los compuestos reportada previamente por nosotros.

5. Materiales y métodos

5.1. Diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de los compuestos.

Todos los materiales fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (USA) y Across Organic (Janssen Pharmaceutical, Geel, Bélgica). Todos los solventes se destilaron por métodos convencionales previos al uso, y la síntesis se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno. Los compuestos **1-6**, **9-16** y **18** fueron preparados según describimos en [122]. Los compuestos sintetizados fueron químicamente caracterizados mediante cromatografía en capa fina (TLC) y resonancia magnética nuclear (RMN). Para las TLC se utilizaron placas de sílica Alugram SIL G/UV254 de 0.2 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Duren, Alemania). La pureza de los compuestos se determinó mediante análisis elemental llevado a cabo en un analizador elemental Carlo Erba Modelo EA1108 luego del destilado de las muestras a vacío por 48 horas. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker DPX 400 (400MHz), usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno con el solvente deuterado indicado. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales se expresa como singulete (s), doblete (d), o triplete de doblete (td).

5.1.1. Procedimiento general para la síntesis y caracterización de nitroalquenos.

En un balón de vidrio se agregó el aldehído correspondiente (0.8 mmol), nitrometano anhidro (3 mL) y acetato de amonio (0.8 mmol). La mezcla se agitó a 100°C por 2 horas. El solvente se evaporó a vacío y el residuo se trató con 30 mL de agua destilada, posteriormente se extrajo en acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica fue sucesivamente lavada con agua (2 x 50 mL), HCl (1M, 2 x 25 mL) y solución de NaCl saturado (2 x 20 mL), y posteriormente secada con sulfato de sodio anhidro. Luego de filtrado y evaporado a vacío, el sólido resultante se lavó con *n*-hexano para dar el producto de interés.

Las características de los nitroalquenos nuevos fue:

1-metiltio-4-(2-nitro-1Z-etenil) benceno (7): sólido amarillo (0.11mg, 61%). ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz) δ ppm: 7.60 (d, 1H, J = 12.00), 7.47 (d, 1H, J = 12.00), 7.29 (d, 2H, J = 8.00), 7.27 (m, 2H), 2.55 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100MHz) δ ppm: 145.0, 138.6, 136.1, 129.0, 125.3, 14.0.

1-acetamino-4-(2-nitro-1Z-etenil) benceno (8): sólido amarillo (0.10g, 78%). ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz) δ ppm: 7.69 (d, 1H, J = 12.00), 7.62 (d, 1H, J = 12.00), 7.36 (d, 2H, J = 8.00), 7.25 (d, 2H, J = 8.00), 2.06 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100MHz) δ ppm: 168.9, 142.8, 138.8, 130.9, 124.4, 118.5, 39.5.

5.1.2. Procedimiento general para la síntesis y caracterización de los nitroalcanos.

En un balón de vidrio de 25 mL se disolvió el nitroalqueno correspondiente (0.5 mmol), en THF (1.6 mL) y MeOH (0.2 mL). Luego de enfriamiento a 0°C , se agregó NaBH_4 (2.5 mmol) en 4 fracciones, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 40 minutos. Luego de destilar el disolvente a vacío, el residuo se trató con solución salina de NaCl (10 mL), y se extrajo en éter etílico (3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, y el disolvente se destiló a vacío. Los productos se purificaron en columna de SiO_2 (gradiente de hexano/acetato de etilo). Se obtuvieron los siguientes compuestos:

1-Dimetilamino-4-(nitroetil) benceno (17): sólido amarillo (0.03g, 86%). ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz): 7.08 (d, 2H, J = 8.00), 6.70 (d, 2H, J = 8.00), 4.56 (t, 2H, J = 8.00), 3.24 (t, 2H, J = 8.00), 2.94 (s, 6H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100MHz) δ ppm: 149.8, 129.0, 122.5, 112.2, 76.5, 40.3, 32.3.

1-Metiltio-4-(2-nitroetil) benceno (19): aceite amarillo (0.03g, 86%). ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz): 7.23 (d, 2H, J = 8.00), 7.08 (d, 2H, J = 8.00), 4.95 (td, 1H, J = 8.00, J = 12.00), 4.80 (td, 1H, J = 8.00, J = 12.00), 3.19 (td, 1H, J = 8.00, J = 12.00), 3.08 (td, 1H, J = 8.00, J = 12.00), 2.50 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100MHz) δ ppm: 140.0, 130.2, 128.8, 126.8, 77.0, 32.0, 14.1

1-acetamino-4-(2-nitroetil) benceno (20): sólido amarillo (0.03g, 78%). ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400MHz): 7.48 (d, 2H, J = 8.00), 7.18 (d, 2H, J = 8.00), 4.60 (t, 2H, J = 8.00), 3.30 (t, 2H, J = 8.00), 2.18 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100MHz) δ ppm: 168.3, 137.5, 131.0, 129.4, 120.0, 76.0, 32.3, 24.6.

Preparación de las soluciones stock:

Las soluciones stock se prepararon en DMSO, y a partir de estas en buffer fosfato a pH y fuerza iónica acorde a cada experimento. En todos los experimentos se llevaron a cabo controles de DMSO y de auto-fluorescencia de los compuestos cuando correspondía.

5.2. Evaluación de la reactividad de los productos con radicales peroxilo.

5.2.1. Efecto del radical peroxilo sobre el espectro UV-Vis de los compuestos.

Para el estudio de los cambios espectrales de los compuestos por exposición a radical peroxilo, se utilizó 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-diclorohidrato (AAPH) como generador de radicales. Los compuestos fueron solubilizados en DMSO, y posteriormente diluidos a la concentración de trabajo (25 μM) en buffer fosfato 75 mM, 0.1mM DTPA, pH 6.8. Se expuso las muestras a AAPH 30 mM, durante 2 horas a 37 °C, y se realizaron espectros de las muestras cada 20 minutos empleando un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent Technologies).

5.2.2. Método de ORAC.

La capacidad antioxidante de las moléculas se evaluó utilizando el método de capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC). El decaimiento de la fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$ debido a la oxidación de la fluoresceína 7.5 nM por radicales peroxilo se midió en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Electron Co., Finland) en buffer fosfato 75 mM pH 7.4, con 100 μM DTPA a 37°C. Los radicales peroxilo se generaron por descomposición térmica del AAPH. Como antioxidante estándar, se usó el ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromanoico (Trolox, 1.5-24 μM). Para el análisis, las curvas de fluorescencia vs. tiempo en ausencia y presencia de compuestos (1.3-13 μM) fueron normalizadas al valor de la fluorescencia inicial (F_i/F_0). El área bajo la curva se calculó según la ecuación 5.1:

$$ABC = 1 + \sum_{i=1}^{i=140} F_i/F_0 \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Donde F_i representa la fluorescencia a tiempo i . El valor neto se obtuvo a partir de la resta de las áreas bajo la curva (ABC) obtenida en presencia de cada concentración de compuesto menos el

ABC del blanco, en ausencia de antioxidante. La pendiente obtenida por la regresión lineal de ABC en función de la concentración de antioxidante, se utilizó para determinar los equivalentes de Trolox (TEq) para cada compuesto, según Ec. 5.2:

$$\text{Valor ORAC (TEq)} = \frac{\text{Pendiente compuesto}}{\text{Pendiente Trolox}} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

5.3. Estudio de la capacidad de los compuestos de inhibir la oxidación de LDL y la internalización de LDL oxidada por macrófagos.

5.3.1. Purificación de LDL a partir de plasma humano.

El plasma humano se obtuvo a partir de donaciones voluntarias en el Departamento de Hemoterapia y Medicina Transfusional del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de la UdelaR. Los procedimientos se apegaron a los acuerdos plasmados en la Declaración de Helsinki, y el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas. Cada donante firmó un consentimiento informado. La sangre total fue colectada en una bolsa primaria conteniendo 63 mL de solución anticoagulante CPD (129 mM dextrosa, 105 mM citrato y 16 mM fosfato, Terumo Corp, Tokyo, Japón), como se describe en [125]. La sangre se centrifugó usando una centrífuga para bolsas de sangre Roto Silenta 63 RS (Hettich, Alemania) a 20°C, 2200 rpm. Posteriormente el plasma fue transferido a bolsas satélite, y enfriado a -20 °C previo al uso (máximo de 2 semanas). La lipoproteína de baja densidad (LDL) fue aislada del plasma mediante centrifugación en gradiente de densidad. Para ello se utilizó 0.28 g de KBr por mL de plasma. Luego se agregaron 0.15 mM de NaCl lentamente y contra la pared del tubo para que las soluciones no se mezclaran. Luego se centrifugó a 300.000 g por 90 minutos a 4°C. Se aisló la banda naranja central, correspondiente a la LDL. La concentración de proteína se midió a 280 nm ($\varepsilon = 1 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/mL})^{-1}$).

5.3.2. Oxidación de LDL por AAPH.

La capacidad de los compuestos para inhibir la oxidación de la LDL, se evaluó como la velocidad de consumo de oxígeno, usando un equipo Oxigraph 2K (Oroboros Instruments Corp.). El

consumo de oxígeno por 0.2 mg/mL de LDL y 30 mM AAPH se midió a 37°C y pH 7.4, en presencia y ausencia de los compuestos (20 μ M). La velocidad de consumo de oxígeno se calculó empleando el programa Graphpad Prisma y se expresó como pmol O₂/s mL.

5.3.3. Marcaje fluorescente de la LDL.

La fracción LDL se marcó con el fluoróforo (2Z)-2-[(E)-3-(3,3-dimetil-1-octadecilindol-1-il-2-il) prop-2-eniliden]-3,3-dimetil-1-octadecilindol (Dil, Anaspec, Fermont, California), y posteriormente se oxidó como se describió en [126,127]. Brevemente, la fracción de LDL aislada según lo descrito previamente fue burbujeada con nitrógeno para remover el oxígeno e incubada en presencia de 50 μ M de Dil (3 mg/mL en DMSO) por mg de LDL toda la noche en la oscuridad a 37°C. Al día siguiente la solución Dil-LDL (0.1 mg/mL) se oxidó mediante incubación con 5 μ M CuSO₄ a 37°C por 24 horas, protegida de la luz. Luego de ello, el complejo Dil-LDLox se centrifugó a 300.000 g por 5 horas a 4°C. La banda distribuida en la región central, conteniendo Dil-LDL se aisló y dializó contra PBS con EDTA 0.24 mM. El contenido de proteínas se determinó empleando la técnica de ácido bicinonínico (Sigma-Aldrich). Las muestras se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4° C, por un máximo de 3 semanas.

5.3.4. Cultivo de macrófagos J774.

Los macrófagos de la línea J774 (ATCC-TIB-67, American Type Culture Collection), fue mantenida mediante pasajes en medio Eagle modificado por *Dulbecco* (DMEM, Gibco, Invitrogen), conteniendo glutamina (4 mM), piruvato de sodio (110 mg/mL), glucosa (4.5 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 mg/L) y 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado térmicamente. Las células se plaquearon e incubaron a 37°C en una atmosfera con 95% aire y 5% CO₂.

5.3.5. Formación de células espumosas.

Siguiendo los procedimientos previamente publicados las células J774 en un 80% de confluencia se incubaron en placas de 24 pocillos en ausencia y presencia de 5 μ M de los compuestos analizados en DMEM por 1 hora, luego de este período de adaptación el complejo Dil-LDL ox (10 μ g/mL) se adicionó a los pocillos, y las células se incubaron por 4 horas a 37°C y 5% CO₂.

Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS con 2mg/mL BSA, y dos veces con PBS. La captación celular de Dil-LDLox- se observó en un microscopio ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratoires Inc. Hercules, CA), usando un filtro rojo para Dil, y uno azul para Hoescht. Alternativamente, el cultivo celular se hizo en placa negras de 96 pocillos, las células se trataron de la misma manera, y se cuantificó la captación del complejo por fluorescencia empleando el lector de placas Varioskan Flash (Thermo Electron Co., Finland), como se describe en [128]. Los resultados se expresaron como la relación entre la fluorescencia emitida por Dil ($\lambda_{ex} = 549\text{nm}$, $\lambda_{em} = 565\text{nm}$) y la fluorescencia emitida por Hoescht ($\lambda_{ex} = 352\text{nm}$, $\lambda_{em} = 461\text{nm}$) [128].

5.4. Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la actividad anti-inflamatoria de los compuestos.

5.4.1. Ensayo de citotoxicidad

La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción de MTT (Sigma-Aldrich, MO, USA) a formazan dependiente de la mitocondria. Los macrófagos en confluencia fueron incubados en presencia de 0.3-10 μM de compuestos por 2 y 24 horas en DMEM a 37°C y 5% CO_2 . Luego el medio se substituyó por DMEM conteniendo MTT (0.1 mg/mL) y las células se incubaron por 3 horas adicionales. Los cristales de formazan fueron disueltos en DMSO (90:10) en buffer glicina, conteniendo 0.1 M de NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM glicina, pH 10.5. Se midió la absorbancia a 560 nm en el Varioskan Flash (Thermo Electron Co., Finland).

5.4.2. Activación del inflamasoma.

Monocapas de células confluentes se incubaron en placas de 24 pocillos en presencia y ausencia de derivados dimetilamino 5 μM , por 1 hora. Posteriormente las células fueron activadas con interferón γ 400 U/mL (Sigma) y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolisacárido de Salmonella entérica (LPS, Sigma L7770) por 4 horas en DMEM, a 37°C, 5% CO_2 , como se describió previamente [122]. Luego, las células fueron colectadas y las proteínas recuperadas a partir de los lisados celulares fueron resueltas por electroforesis en SDS-PAGE 15%, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-IL1 β (Abcam Inc., Cambridge, MA), seguido de

anticuerpo IgG de asno anti-IgG de conejo H&L conjugado a Alexa Fluor 680 (Abcam Inc., Cambridge, MA). Los resultados fueron escaneados empleando G-Box, Chemi XT4 (Syngene, Cambridge, UK). La intensidad de las bandas se evaluó mediante el software Image J 1.47v (NIH, USA). Geles apareados teñidos con Colloidal Blue se emplearon como control de carga proteica.

5.5. Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como promedio \pm desvío estándar de por lo menos 3 experimentos. Los gráficos, cálculos de ajustes lineales (ORAC) y análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Softwares, Inc.). Los análisis estadísticos se realizaron mediante 2way ANOVA seguido de Tukey's para comparaciones múltiples, considerando significativas diferencias con $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Síntesis y caracterización química de los compuestos

6.1.1. Síntesis y evaluación de los nitroalquenos.

La primera parte de este trabajo se centró en el diseño y la síntesis de los nitroalquenos, compuestos por un núcleo aromático, una función 2-nitroetenilo o 2-nitropropenilo en la posición 1, y diversos grupos sustituyentes en la posición 4, con propiedades estereoelectrónicas diferentes (Fig. 6.1).

Las reacciones se desarrollaron mediante un mecanismo de Henry, donde un nitroalcano de cadena corta, previamente activado por una base catalizadora, ataca al carbonilo de un aldehído,

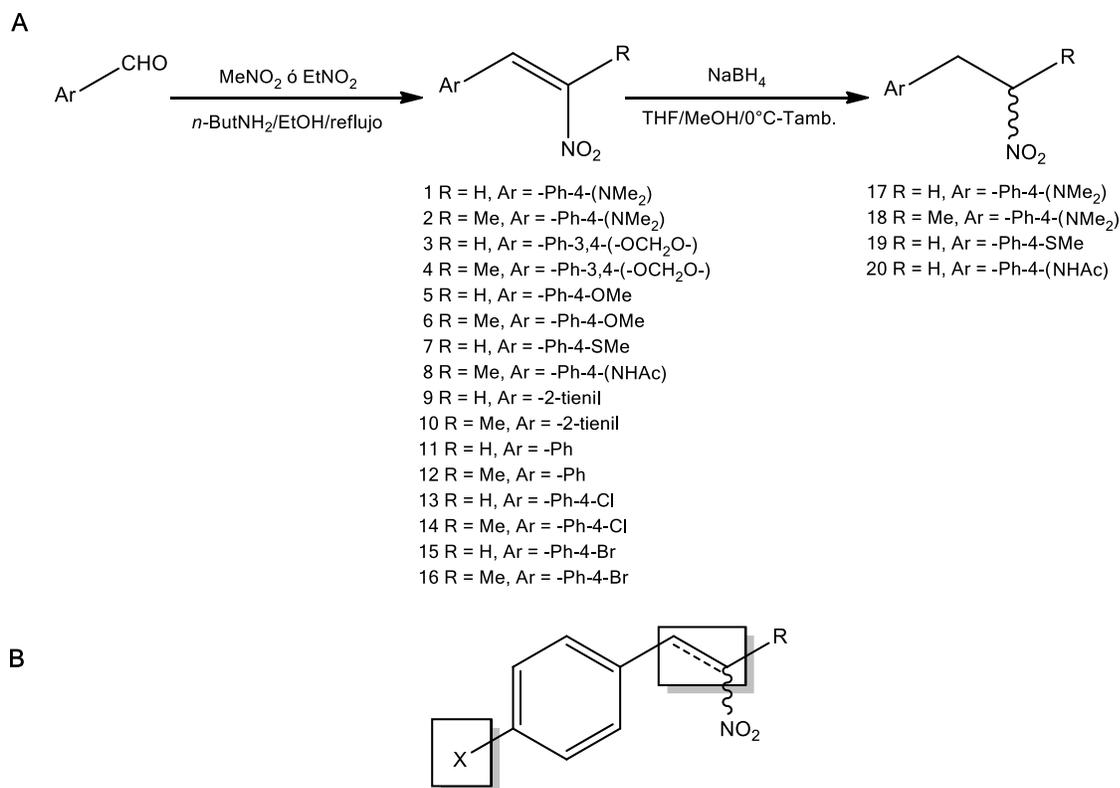


Figura 6.1. Derivados sintetizados. A. Procedimientos sintéticos para nitroalquenos (obtenidos como isómeros Z) y nitroalcanos. **B.** Sitios en donde se proponen las modificaciones estructurales en los compuestos fenólicos.

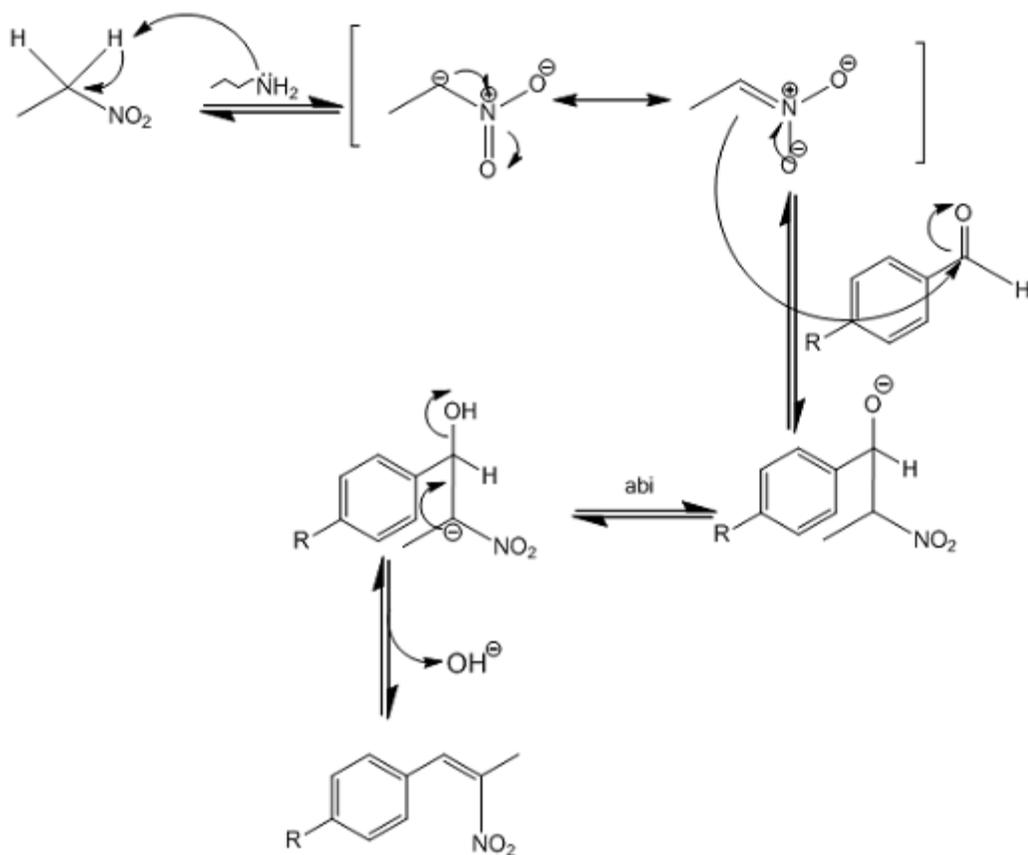


Figura 6.2. Esquema general de la condensación nitro-aldólica. El aldehído correspondiente fue disuelto en nitrometano anhidro (o etanol, con agregado de nitrometano en proporciones adecuadas) y acetato de amonio o *n*-butilamina, según correspondiera como se detalla en Materiales y Métodos. La mezcla se agitó a 100°C por 2 horas, y se siguió el avance de la reacción mediante TLC (EP/AE 8:2).

el nitronato que se adiciona genera un intermediario nitroaldol, y la subsecuente eliminación de agua rinde el producto deseado (Fig. 6.2). El rendimiento descrito en la literatura para esta reacción se sitúa entre 65-95% [129]. La utilización de etanol como disolvente y de *n*-butilamina

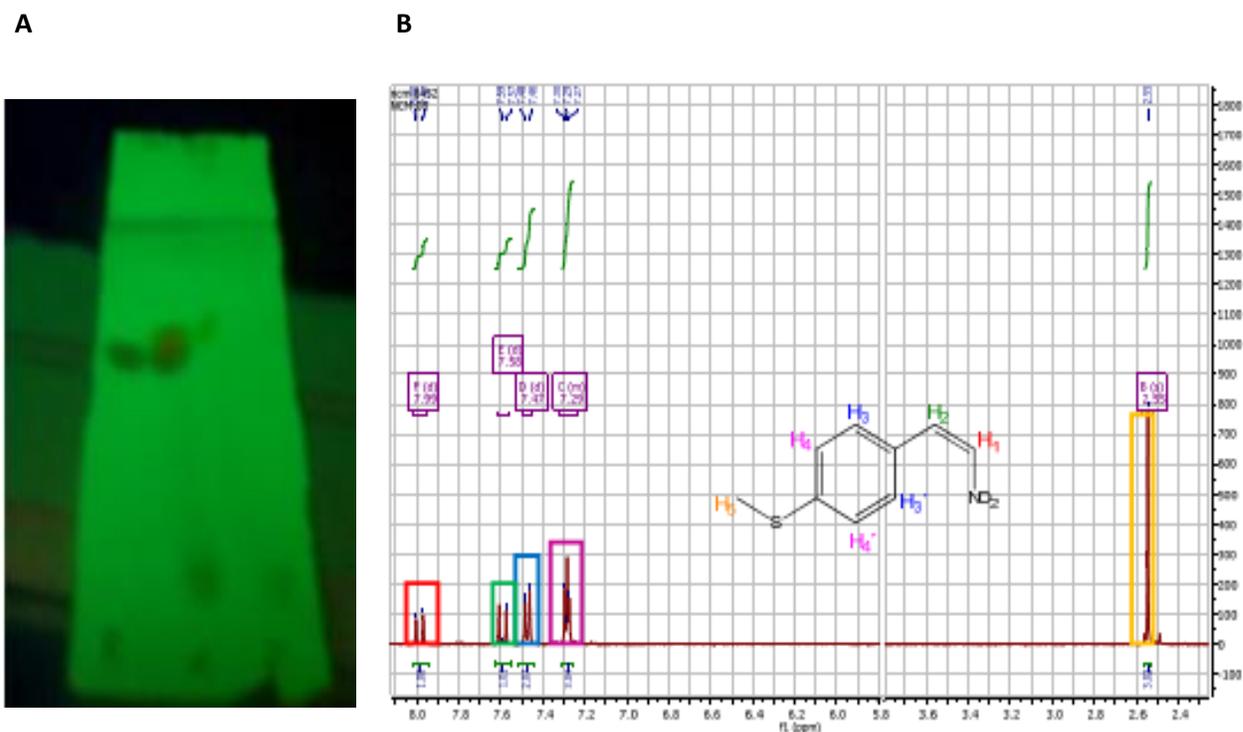


Figura 6.3. Caracterización de los nitroalquenos. **A.** Perfil de TLC del compuesto **7**. Las señales de la izquierda (mayor polaridad) corresponden al reactivo de partida, la del medio a la cosembra, y la de la derecha (menor polaridad) al producto obtenido. **B.** Espectro de ¹H del compuesto **7**. Los espectros se generaron en un espectrómetro Bruker DPX 400 (400MHz), usando TMS como estándar interno en solvente deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm, y la multiplicidad de señales se expresan como singulete (s), doblete (d), o triplete de doblete (td). En violeta y azul Las señales correspondientes a los protones aromáticos; en verde y rojo los protones metilénicos; y en amarillo los protones metílicos.

ya se encontraba estandarizada en trabajos previos del grupo [122,123], por lo cual se empleó para obtener varios compuestos. Sin embargo, la utilización de nitrometano como reactivo-disolvente, así como la sustitución de la base *n*-butilamina por acetato de amonio, tal como describen Mock y colaboradores [130], fue necesaria para mejorar la eficacia de algunas reacciones. Este es el caso de los derivados (Z)-4-(1-etenil-2-nitrofenil)-acetamida (**8**) y (Z)-(1-etenil-2-nitro)-4-metiltiobenceno (**7**). Todas las reacciones se llevaron a cabo en condiciones de reflujo y su avance se siguió mediante TLC (EP/AE 8:2) (Fig. 6.3.A). Los productos se purificaron por recristalización con etanol y por cromatografía en columna (EP/AE 8:2). Los compuestos

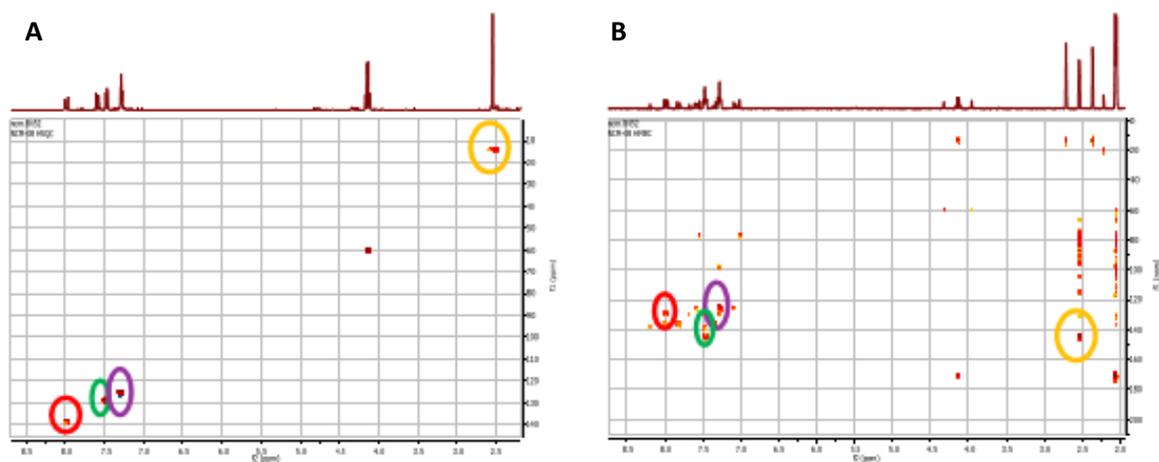
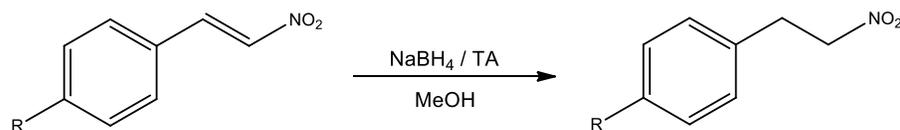


Figura 6.4. Análisis mediante RMN. Espectro HMBC (A) y HSQC (B) del compuesto **7**. Los espectros fueron generados en un espectrómetro Bruker DPX 400 (400MHz), usando TMS como estándar interno en cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. En violeta las señales correspondientes a los protones aromáticos; en verde y rojo los protones metilénicos; y en amarillo los protones metílicos.

mostrados en la figura 6.1.A se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear de protón y carbono trece (HMBC, HSQC). En la figura 6.3.B se muestra el espectro RMN de protón obtenido para el compuesto **7**. Las señales del espectro de ^1H RMN se ven afectadas por la presencia de heteroátomos, por lo que los desplazamientos químicos de protones adyacentes a éstos presentaron diferencias en virtud de cada sustituyente. Las señales correspondientes a los protones aromáticos, se pueden visualizar como dobletes desplazados a campo bajo a ~ 7.2 y ~ 7.5 ppm, debido a la alta electrofilicidad que le confiere el anillo. Asimismo, los protones olefínicos se pueden evidenciar en forma de dobletes desplazados a campo bajo, ya que se encuentran adyacentes al nitrógeno, que posee un fuerte carácter electrón-atrayente. Por lo tanto, su presencia se puede evidenciar entre 7.6 y 8.0 ppm. Estas señales se correlacionan con la presencia de protones metínicos, según datos de tablas [131]. Por otra parte, la aparición de estos grupos de señales, es a su vez coherente con la ausencia de señales en el entorno de las 10 ppm, las cuales son características del grupo carbonilo del aldehído de partida.

A



B

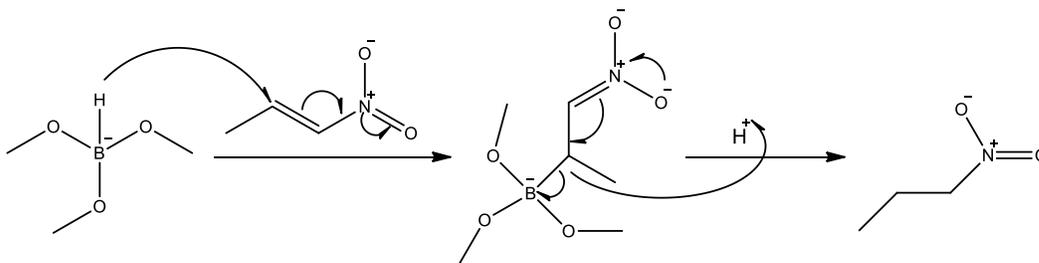


Figura 6.5. Esquema de reducción de nitroalquenos. A. Reducción de nitroalquenos con NaBH₄ **B.** Mecanismo de reacción, mostrando que la formación de metoxi-borohidruro favorece la selectividad de la reducción.

Con el objetivo de estudiar la distribución de los carbonos, se analizaron los espectros de correlación heteronuclear bidimensional ¹H – ¹³C, HMBC y HSQC. En el experimento HSQC, se observan solamente los desplazamientos químicos de los protones unidos a carbono, mientras que en el HMBC se observa el acoplamiento entre cada protón y los carbonos situados a dos o tres enlaces del protón en cuestión. En la figura 6.4, se muestran los espectros obtenidos para el compuesto **7** (las características espectrales de los nitroalquenos restantes se describen en [122] o se muestran en el material suplementario de [132], ambos adjuntos. La presencia de 2 señales en el espectro de HMBC a 7.48 ppm (correspondiente a protones aromáticos) demuestra que el protón en cuestión se encuentra acoplado a las señales de dos carbonos, por lo que dicha señal pertenece al protón H4. Los valores de constantes de acoplamiento obtenidos (J=12 Hz) a partir de los espectros de ¹H RMN de cada compuesto para los protones olefínicos sugiere que los productos aislados presentan una isomería geométrica de tipo Z en todos los casos.

6.1.2. Síntesis de nitroalcanos.

Para la síntesis de los nitroalcanos se aplicó una reducción del doble enlace de los nitroalquenos previamente obtenidos, empleando un agente reductor suave (borohidruro de sodio). Este

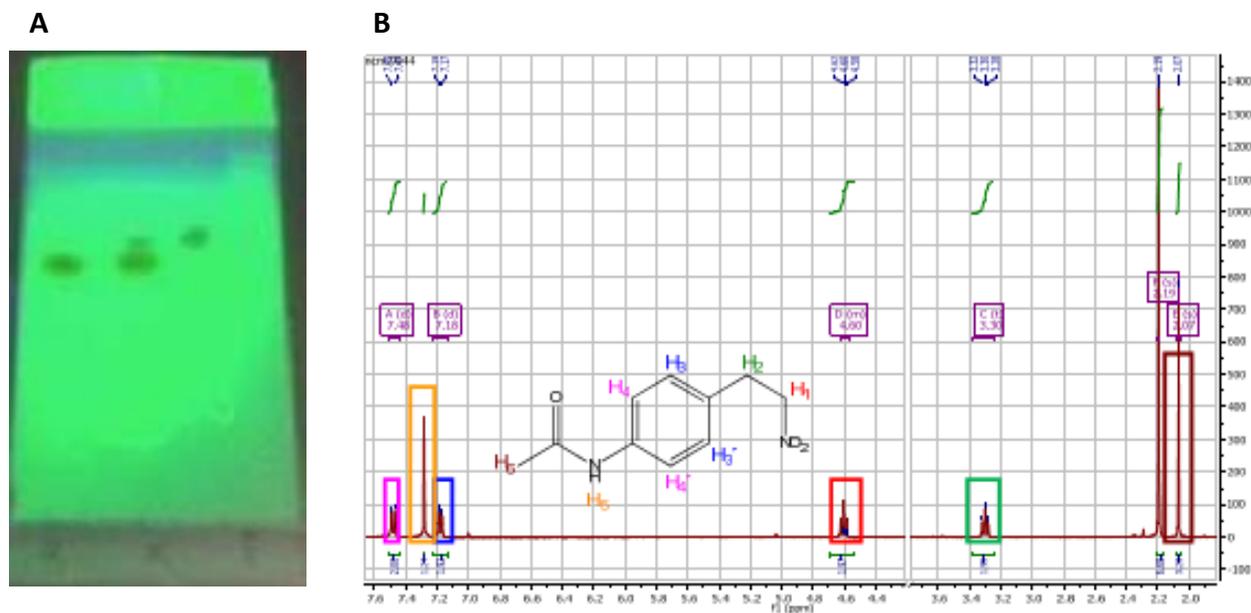


Figura 6.6. Caracterización de los nitroalcanos. A. Perfil de TLC del compuesto **20**. Las señales de la izquierda (mayor polaridad corresponden al nitroalqueno de partida, las del medio son la cosiempra, y las de la derecha corresponden al producto (menor polaridad) **B.** Espectro de ¹H del compuesto **20**. Los espectros fueron generados usando como estándar interno TMS en solvente deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. Se muestran en verde y rojo los protones metilénicos del alcano; en violeta y azul los correspondientes al anillo aromático; en amarillo la señal del protón de amida; en marrón el protón metílico.

reductor generó el producto deseado sin la obtención de productos secundarios y con buenos rendimientos [133,134]. En dicho proceso, se utiliza un mol del correspondiente nitroalqueno por cada 2 moles del agente reductor. Una mejora de la técnica descrita se obtuvo mediante la inclusión de metanol como disolvente, ya que se favorece la metoxilación del borohidruro. La formación de este intermedio favorece la selectividad de la reducción, evitándose así la reducción del grupo nitro (Fig. 6.5).

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se controló el avance de las mismas mediante TLC (EP/AE 9:1). A su vez, fue necesaria la implementación de una atmósfera de nitrógeno, ya que el borohidruro de sodio es capaz de reaccionar débilmente con el agua del ambiente lo cual puede llevar a leves pérdidas de rendimiento. Dado que la polaridad de los nitroalquenos y de los nitroalcanos es muy similar se observa como una señal doble en las cosiembras de reactivos y productos en las TLC, visibles tanto por exposición a la luz UV como por tinción con vapores de yodo. Estas señales dobles reflejan la presencia de una segunda especie

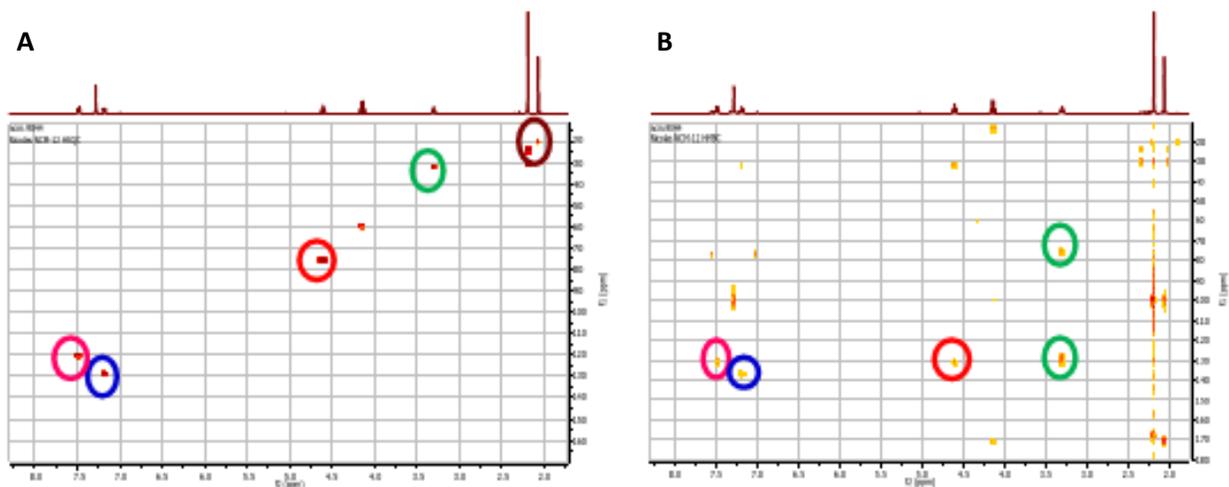


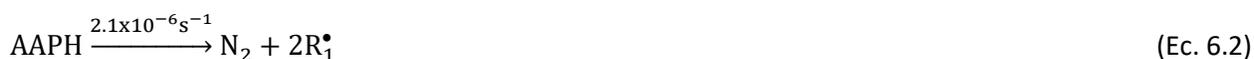
Figura 6.7. Análisis mediante RMN de nitroalcanos. Espectro HMBC (A) y HSQC (B) del compuesto **20**. Los espectros fueron generados usando TMS como estándar interno con solvente deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm.

de menor polaridad que se corresponde con el nitroalcano, lo cual es consistente con la aparición del producto de interés (Fig. 6.6.A). Una vez finalizadas las reacciones y el proceso de work-up, los excesos de reactivo, así como de intermedios de reacción se eliminaron mediante cromatografía en columna (EP/AE 8:2). Por último, los productos ya purificados fueron analizados mediante espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C . En el espectro ^1H RMN (Fig. 6.6.B), la presencia del producto de interés se evidencia por la aparición de dos tripletes a campo alto, con la consiguiente desaparición de los dobletes característicos de los protones olefínicos a campo bajo (7.7 ppm), por la reducción del doble enlace. El significado físico de lo anterior es que, al perderse la insaturación, los protones metilénicos ahora poseen dos protones vecinos cada uno. Esto resulta en la aparición de señales triples en vez de dobles, y el corrimiento de señales de los protones del anillo aromático. El patrón de señales obtenido es coherente con lo esperado teóricamente según datos de tablas (Fig. 6.6 y material suplementario en [132]). En el espectro se pueden visualizar grupos de señales de baja intensidad a 3.2 y 4.6 ppm, lo cual comparado con los valores obtenidos de tablas, se correlaciona con la presencia de metilenos adyacentes a grupos aromáticos y a heteroátomos respectivamente [131]. Asimismo, el desdoblamiento de dichas señales en tripletes, es coherente con lo esperable para grupos metileno. El estudio de la distribución de los carbonos, se realizó mediante experimentos HSQC y HMBC. En la figura 6.7 se

muestran a modo de ejemplo los espectros obtenidos para el nitroalcano **20**. La señal observable a 2.2 ppm está asociada directamente a un carbono que se desplaza a 24 ppm, y presenta acoplamiento con un carbono cuyo desplazamiento es de 168 ppm. Por lo tanto, este es el protón correspondiente al metilo del sustituyente acetamida.

6.2. Reactividad con radicales peroxilo.

Una vez finalizada la etapa de obtención de los compuestos, se procedió a la evaluación de sus propiedades antioxidantes. En vista de la reactividad de los arilnitroalquenos previamente reportados con oxidantes biológicos, se decidió explorar la reactividad de estos compuestos con radicales peroxilo, por su similitud con los radicales derivados de la oxidación lipídica, para lo cual se ensayó el efecto de los productos de la descomposición del AAPH. Las principales vías de degradación del AAPH en solución acuosa, la descomposición térmica (Ec. 6.1) y la hidrólisis (Ec. 6.2) generan radicales centrados en carbono (R^\bullet) poco estables.



Estos radicales reaccionan a velocidad controlada por difusión con oxígeno molecular rindiendo radicales peroxilo (ROO^\bullet) (Ec. 6.3), que se descomponen principalmente a radicales alcoxilo (RO^\bullet) (Ec. 6.4) [135].



Ambas especies presentan alta reactividad con compuestos reducidos (XH) (Ec. 6.5).



En primera instancia se intentó objetivar mediante espectrometría UV/Vis la reacción, observando los cambios en las absorbancias máximas de los compuestos [122]. En la figura 6.8 se muestra el espectro de dos de los compuestos sintetizados (**1** y **3**) y las constantes de decrecimiento de la absorbancia a la longitud de onda de sus respectivos máximos. En el caso del

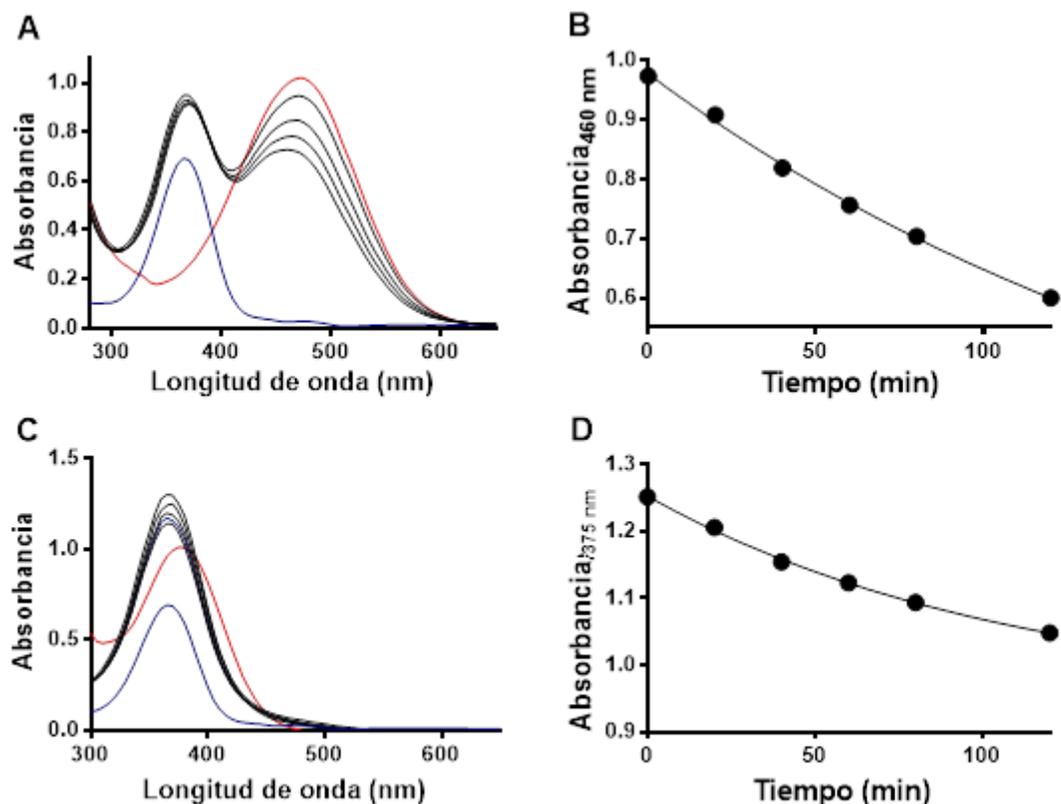


Figura 6.8. Cambios espectrales inducidos por AAPH en los compuestos. A. Espectro del compuesto **1** (250 μM) antes (línea roja) y tomado cada 20 minutos después de la adición de AAPH (30 mM, líneas negras). Las cinéticas se realizaron a 37 $^{\circ}$ C. En el gráfico se muestra también el espectro de AAPH solo (línea azul). **B.** Evolución temporal de la absorbancia a 460 nm para la misma mezcla que en A. **C.** Efecto del AAPH (30 mM) sobre el espectro UV/Vis del compuesto **3** (250 μM). **D.** Evolución temporal de la absorbancia a 375 nm para la misma mezcla que en C.

derivado dimetilamino (**1**) la banda en el visible, alejada de la banda de absorción máxima del oxidante permitió determinar una constante de reacción del orden de $20 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En cambio, en el caso del derivado dioxol (**3**) y de varios de los compuestos, su absorbancia máxima en la región del UV, coincidente o cercana a la banda de absorción máxima del AAPH (370 nm), y la ausencia de una banda clara en algunos casos dificultó el análisis, por lo que se plantearon estudios de “competencia”. Con este fin se empleó una técnica estandarizada (ORAC por sus siglas en inglés). En dicho ensayo, se cuantifica la pérdida de auto fluorescencia por parte de la fluoresceína al ser expuesta a un generador de radicales sintético (AAPH).

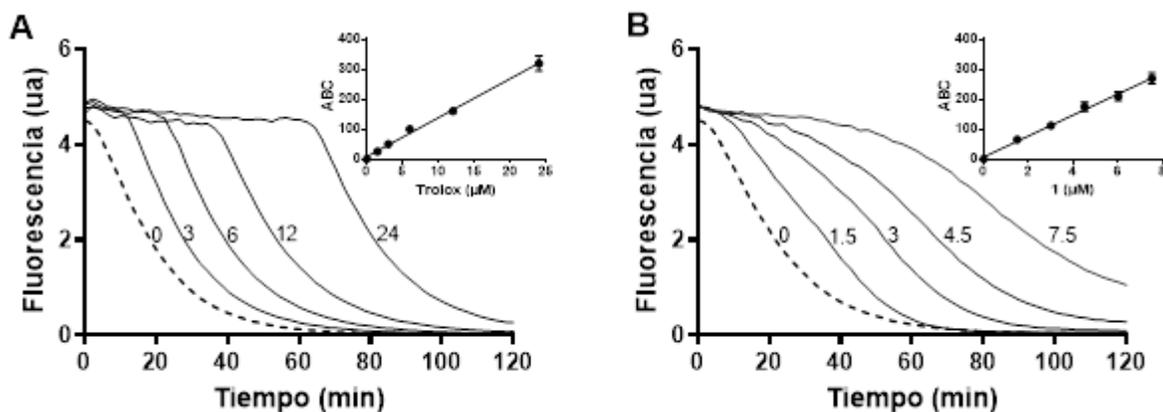


Figura 6.9. Curso temporal de oxidación de fluoresceína. Fluoresceína (75nM) se expuso a AAPH (30mM) a 37°C en buffer fosfato 75 mM pH 7.4, con DTPA 100 μM en presencia de Trolox (3 - 24 μM) (A) y compuesto **1** (1.5 - 7.5 μM) (B), midiéndose la cinética de desaparición de fluorescencia a $\lambda_{ex} = 485\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 512\text{ nm}$. La oxidación de la fluoresceína en ausencia de antioxidantes se observa en líneas punteadas. Los números arriba de las curvas representan las concentraciones de antioxidante adicionado en μM. Los insertos muestran los gráficos de área bajo la curva en función de la concentración de antioxidante. Los valores de área bajo la curva (ABC) son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes.

Si el compuesto en estudio es capaz de reaccionar eficientemente con los radicales generados, la fase de decaimiento de la fluorescencia es más lenta, y se observa un aumento en el área bajo la curva de fluorescencia vs tiempo, a concentraciones crecientes. La reactividad de los compuestos sintetizados se comparó con la de un antioxidante sintético hidrosoluble análogo de la vitamina E (Trolox), utilizado como estándar en esta prueba. Los derivados dimetilamino fueron los de mayor actividad antioxidante, conforme con los reportado anteriormente, y se obtuvieron aún mejores resultados con los análogos reducidos. La cinética de oxidación de la fluoresceína en presencia de Trolox y de uno de los compuestos (**1**) se observa en la Figura 6.9. Como puede observarse en la Tabla 6.1, los compuestos **1** y **2** mostraron una capacidad 4 y 5 veces mayor a la del Trolox, respectivamente. Sorpresivamente la reducción del doble enlace de estos compuestos para generar los compuestos **17** y **18** llevó a una protección de la fluoresceína más de 10 veces mayor al antioxidante de referencia.

Tabla 6.1. Valores de ORAC.

EF ^a	Derivado	TEq ^{b,c}	Derivado	TEq ^{b,c}
med^d	1	4.2 ± 0.1	17	13 ± 2
	2	5.4 ± 0.1	18	10 ± 1
	3	0.72 ± 0.01		
	4	1.6 ± 0.2		
	5	0.46 ± 0.03		
	6	0.46 ± 0.02		
	7	3.5 ± 0.3	19	2.8 ± 0.2
	8	0.63 ± 0.07	20	0.26 ± 0.06
	9^e	0.43 ± 0.07		
	10^e	0.54 ± 0.01		
we^f	11	0.29 ± 0.01		
	12	0.37 ± 0.06		
med-iew^g	13	0.44 ± 0.01		
	14	0.39 ± 0.02		
	15	0.44 ± 0.04		
	16	0.45 ± 0.06		

^aEF: efecto electrónico de los sustituyentes arilo.

^bEquivalentes de Trolox (TEq) se

determinaron mediante la técnica de ORAC como en Fig. 6.8.

^cLos resultados son el promedio de tres experimentos independientes ± SD.

^dmed: grupo donador de electrones por efecto mesomérico.

^ebioisómeros de los derivados **11** y **12**, respectivamente.

^fwe: sin efecto electrónico.

^gmed-iew: grupo donador de electrones por efecto mesomérico y grupo de extracción de electrones por efecto inductivo.

Por otra parte, los derivados metilitio (**7** y **19**) resultaron también 3 o más veces más activos que Trolox en prevenir la oxidación de fluoresceína. Por su parte, la capacidad antioxidante de los derivados con el sistema 1,3-dioxol fue cercana (**3**) o mayor (**4**) que la del Trolox. Las diferencias entre ambas moléculas se encuentran en concordancia con las diferencias en la capacidad para atrapar oxidantes y anti-inflamatoria previamente reportada por nosotros para ambas moléculas [122,123]. Por su parte las moléculas portando otros sustituyentes como el grupo metoxilo (**5**, **6**), hidrógeno (**11**, **12**) y haluros (**13**, **14**, **15** y **16**) fueron aproximadamente un 50% menos efectivas que el Trolox, sin ninguna diferencia consistente atribuible a la presencia del grupo metilo adicional en R. Además, estudiamos la capacidad antioxidante de los derivados **9** y **10**, los cuales poseen un heterociclo tiofeno en lugar del grupo fenilo, bioisómeros potenciales de los derivados **11** y **12**, respectivamente. Los derivados **9** y **10** mostraron mayor actividad que **11** y **12**, probablemente como resultado de la habilidad dadora de electrones por efecto mesomérico

del azufre en el heterociclo. En la tabla 6.1 se muestra un resumen de los valores ORAC de todos los compuestos desarrollados en este trabajo. Un breve análisis estructural del sistema en estudio, muestra la importancia de las propiedades electrónicas de los grupos sustituyentes (Tabla 6.2). Las moléculas que mostraron mejores resultados presentan constantes de Hammett e inductivas de cero o cercanas a cero en los *p*-sustituyentes al grupo fenilo, como es el caso de los derivados dimetilamina (-N(Me)₂). Este grupo sustituyente presenta una constante de Hammett $\sigma_p = -0.83$ y constante inductiva $\sigma_I = 0.06$ [136].

Tabla 6.2. Propiedades electrónicas de los sustituyentes.

Sustituyente	Constante de Hammett (σ_p)	Constante inductiva (σ_I)
-N(Me) ₂	-0.83	0.06
-SMe	0.00	0.23
-NAc	-0.15	0.26
-OMe	-0.27	0.27
-Cl	0.23	0.47

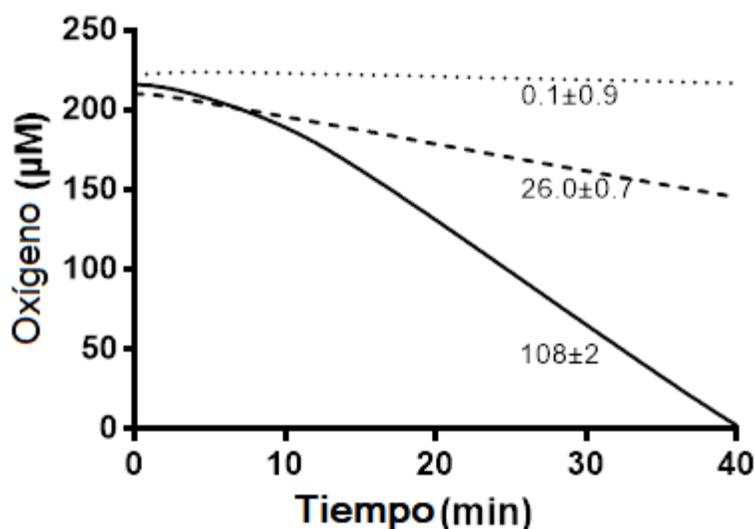


Figura 6.10. Fig. 3. Oxidación de LDL por AAPH. El consumo de oxígeno por LDL ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, línea de puntos), AAPH (30 mM , línea discontinua) y LDL ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) más AAPH (30 mM) (línea continua) se analizó a 37°C en tampón fosfato 75 mM , pH 7,4, utilizando un electrodo de oxígeno de alta resolución como se describe en Materiales y métodos.

6.3. Inhibición de la oxidación de LDL.

Luego de los experimentos de ORAC, en donde se demostró buena protección antioxidante por parte de los derivados dimetilamino (tanto nitroalquenos como nitroalcanos), se evaluó la capacidad de dichas moléculas de prevenir la oxidación de la LDL. El objetivo de esta prueba fue conocer el perfil de consumo de oxígeno por parte de la LDL y AAPH en presencia y ausencia de compuestos, y de esa manera estudiar una posible interrupción del proceso de lipoperoxidación.

Para este trabajo se volvió a utilizar el AAPH como generador de especies reactivas y la cinética de oxidación de LDL se siguió por oximetría de alta resolución. Los resultados obtenidos muestran una cinética característica de lipoperoxidación, donde se observa una primera fase de latencia, debido a la presencia de antioxidantes endógenos asociados a la LDL, y una posterior fase de propagación (Fig. 6.10). La fase lenta de oxidación de la LDL por AAPH, mostró una velocidad de consumo de oxígeno ($30 \pm 1 \text{ pmol O}_2 \text{ mL}^{-1}\text{s}^{-1}$) similar a la determinada en presencia del AAPH solo ($26 \pm 0.7 \text{ pmol O}_2 \text{ mL}^{-1}\text{s}^{-1}$). Luego de ~ 7 minutos se produjo el ingreso a la fase de propagación,

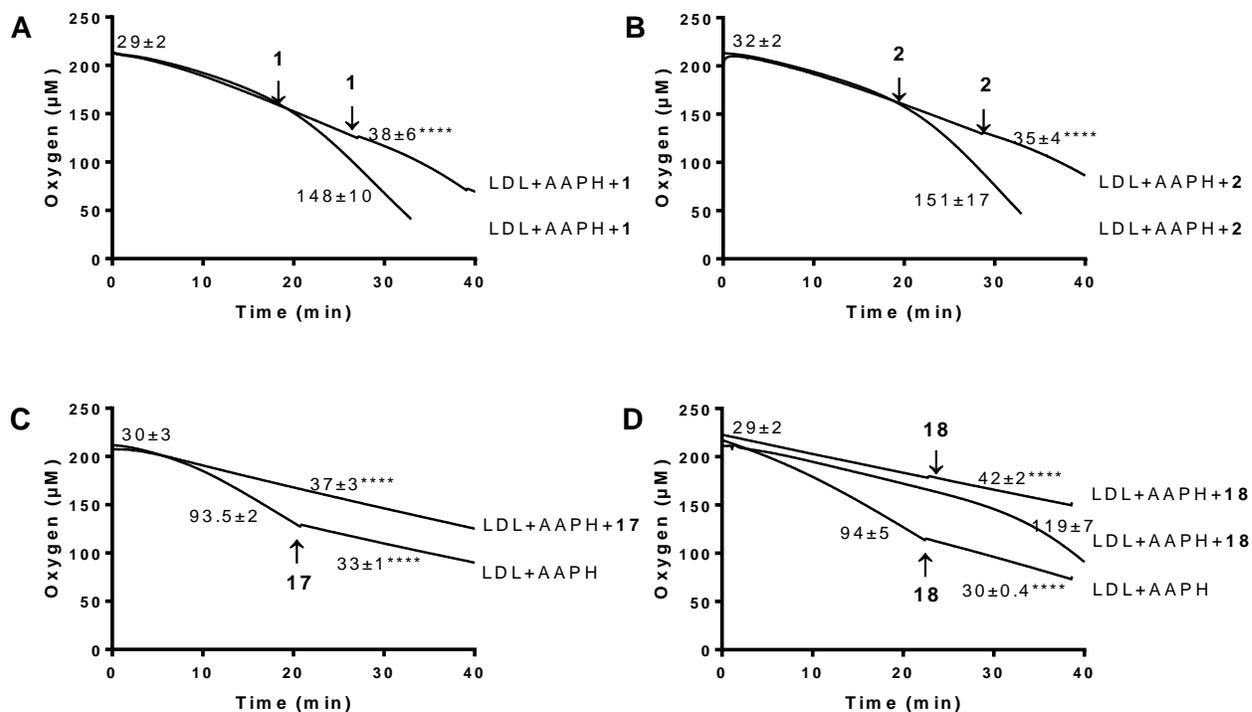


Figura 6.11. Efecto de los NA en la oxidación de la LDL por AAPH. Gráficos representativos de consumo de oxígeno por parte de LDL ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) más AAPH (30mM) en presencia y ausencia de compuestos 1 (A), 2 (B), 17 (C) y 18 (D). Las flechas indican el agregado de bolos de compuestos en el transcurso de la reacción. Los números debajo de las curvas representan los promedios \pm SD de las pendientes de consumo en 3 experimentos independientes $p < 0.0001$. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para las pendientes de consumo en presencia y ausencia de compuestos (**** $p < 0.0001$).

con un fuerte aumento en la velocidad de consumo de oxígeno, la que pasó a ser de $138 \pm 2 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Los resultados obtenidos mostraron buena protección tanto por parte de nitroalquenos como de nitroalcanos cuando fueron parte de la mezcla de reacción inicial (Fig. 6.11). La adición de $20 \mu\text{M}$ de los compuestos seleccionados (1, 2, 17 y 18) a la mezcla desde el principio, generó una fase de latencia más prolongada que en ausencia para todos los casos. Mientras que la fase de propagación en presencia de los nitroalquenos 1 y 2 comenzó ~ 20 min después de la adición de AAPH, los nitroalcanos 17 y 18 fueron más efectivos protegiendo a la LDL de la oxidación

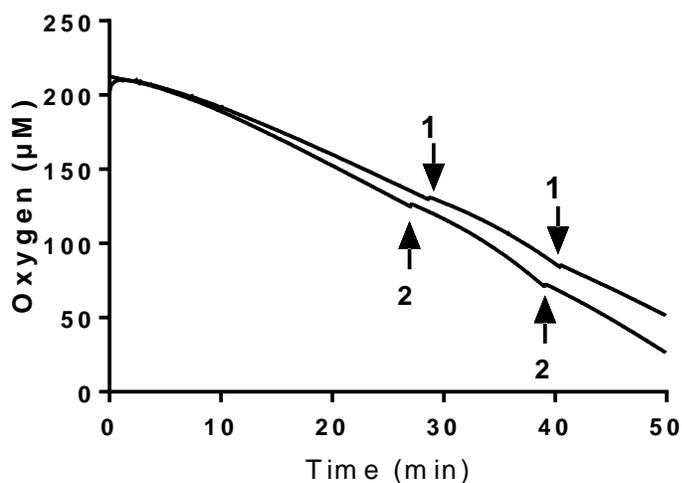


Figura 6.12. Efecto de 1 y 2 sobre el consumo de oxígeno mediado por LDL. El consumo de oxígeno se midió en presencia de 0.2 mg mL^{-1} LDL más 30 mM AAPH. Los nitroalquenos **1** y **2** ($20 \text{ } \mu\text{M}$) se adicionaron después del comienzo de la fase de propagación donde se indica por las flechas.

mediada por radicales peroxilo. De hecho, en presencia del compuesto **18** la fase de latencia se prolongó por ~ 30 min, mientras que en presencia de **17** el comienzo de la fase de propagación se retardó más de 40 min. La adición de bolos sucesivos de **1** y **2** antes del comienzo de la fase de propagación retrasó su aparición, sin embargo, ambos compuestos fueron inefectivos cuando se adicionaron después del comienzo de esa fase (Fig. 6.12). Por el contrario, los nitroalcanos **17** y **18** fueron capaces de detener el proceso oxidativo aun al agregarlos luego de comenzada la fase de propagación, revirtiendo el consumo de oxígeno a los valores iniciales (Fig. 6.11 C y D).

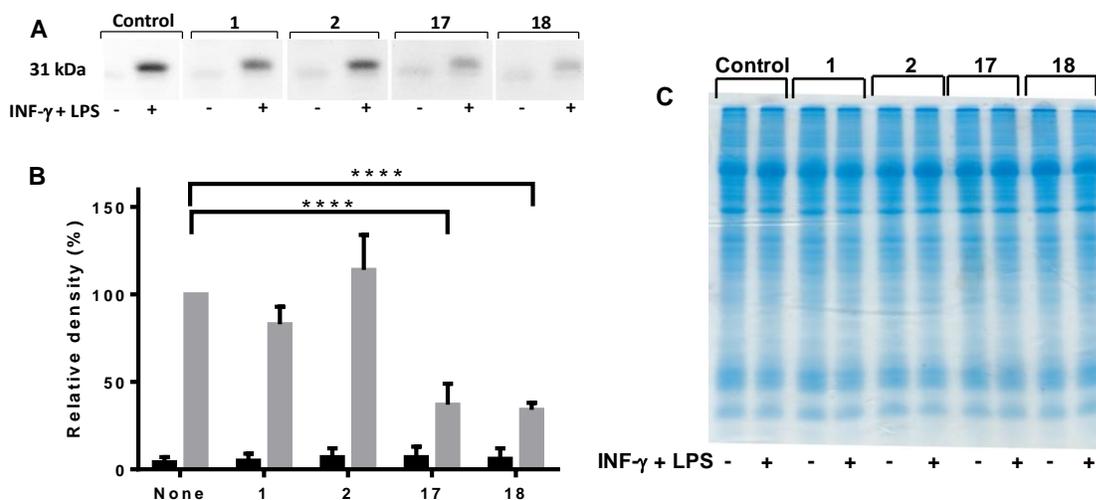


Figura 6.13. Efecto de los compuestos sobre la expresión de la IL-1 β . **A.** Las células J774 se incubaron 1h en ausencia y presencia de compuesto **1**, **2**, **17** y **18** (5 μ M), se trataron por 4h con INF- γ (400 U/mL) y LPS (8 μ g/mL). Las proteínas se corrieron en SDS-PAGE 15% y las proteínas y se transfirieron a membranas de PVDF para probarlas con el anticuerpo anti-IL1 β . **B.** Análisis por densitometría de western blots obtenidos de tres experimentos independientes (****, $p < 0.001$). Las barras muestran promedios \pm SD. Las barras grises representan las células tratadas y las negras sin tratar con LPS/INF- γ . **C.** Control de carga. Los extractos proteicos obtenidos de las células J774 tratados como en A se corrieron en SDS-PAGE 15% y las proteínas se tiñeron Colloidal blue.

6.4. Propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas.

Para conocer los mecanismos involucrados en las propiedades anti-inflamatorias, tanto de los nitroalquenos previamente reportados [122], como de sus derivados reducidos, se estudió la capacidad de los compuestos de inhibir la inducción de la expresión de IL-1 β por INF- γ /LPS. Para ello se incubaron macrófagos de murinos (J774) por 4 horas en presencia de INF- γ y LPS, y se estudió la expresión de IL-1 β mediante western-blot. Acorde a lo esperado, estas moléculas indujeron un aumento significativo en la expresión de IL-1 β (Fig. 6.13). Por su parte, el agregado de los derivados dimetilamino (5 μ M) redujo la expresión de IL-1 β , siendo los nitroalcanos (**17** y **18**) significativamente más efectivos que los nitroalquenos (**1** y **2**) en bloquear el efecto estimulador.

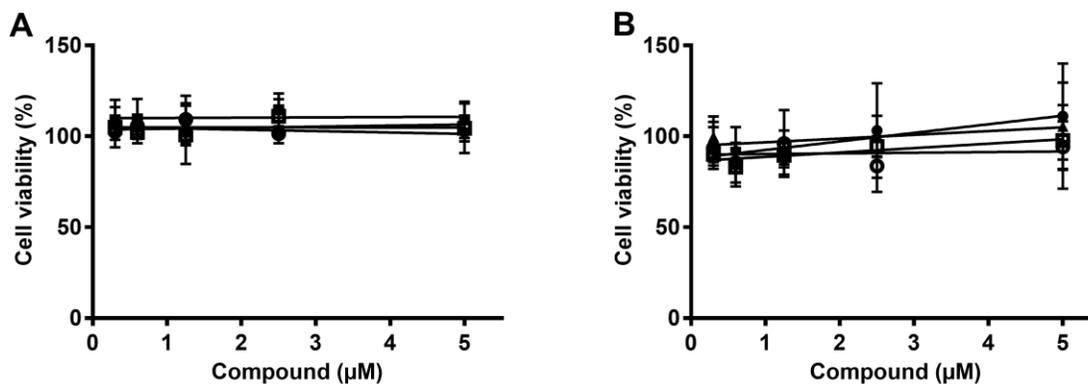


Figura 6.14. Efecto sobre la internalización de LDLox. **A.** Células confluentes en monocapa se incubaron durante 2 h en presencia de concentraciones crecientes (0,3-5 μM) de **1** (●), **2** (○), **17** (■) y **18** (□) y el efecto sobre la viabilidad celular se midió mediante el ensayo de reducción de MTT. **B.** Como en A, pero la viabilidad celular se midió después de 24 h de incubación con los compuestos.

Para probar que el efecto observado no se debió a la muerte celular, se analizó la viabilidad celular investigando la reducción de MTT (Fig. 6.14). En presencia de concentraciones de 0.3-5 μM de nitrocompuestos, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de viabilidad celular incubando a las células con los compuestos por 2 y 24 horas, observándose valores similares a los obtenidos para el vehículo.

Por otro lado, en nuestras condiciones experimentales, ni la LDL nativa ni la oxidada fueron capaces de inducir la expresión de pro-IL-1 β . Debido a ello, y a que la internalización de la LDL se asocia a la formación de células espumosas en la pared arterial, se exploró la capacidad de los compuestos de prevenir la internalización de LDL oxidada. El complejo formado por LDLox y Dil fue efectivamente internalizado por las células J774 (Fig. 6.15). La señal fluorescente se apreció tanto en presencia como en ausencia de los compuestos. A su vez, el agregado de concentraciones crecientes de nitroalquenos aumentó la fluorescencia de la proteína marcada, lo cual descarta la posibilidad de una inhibición del proceso de internalización.

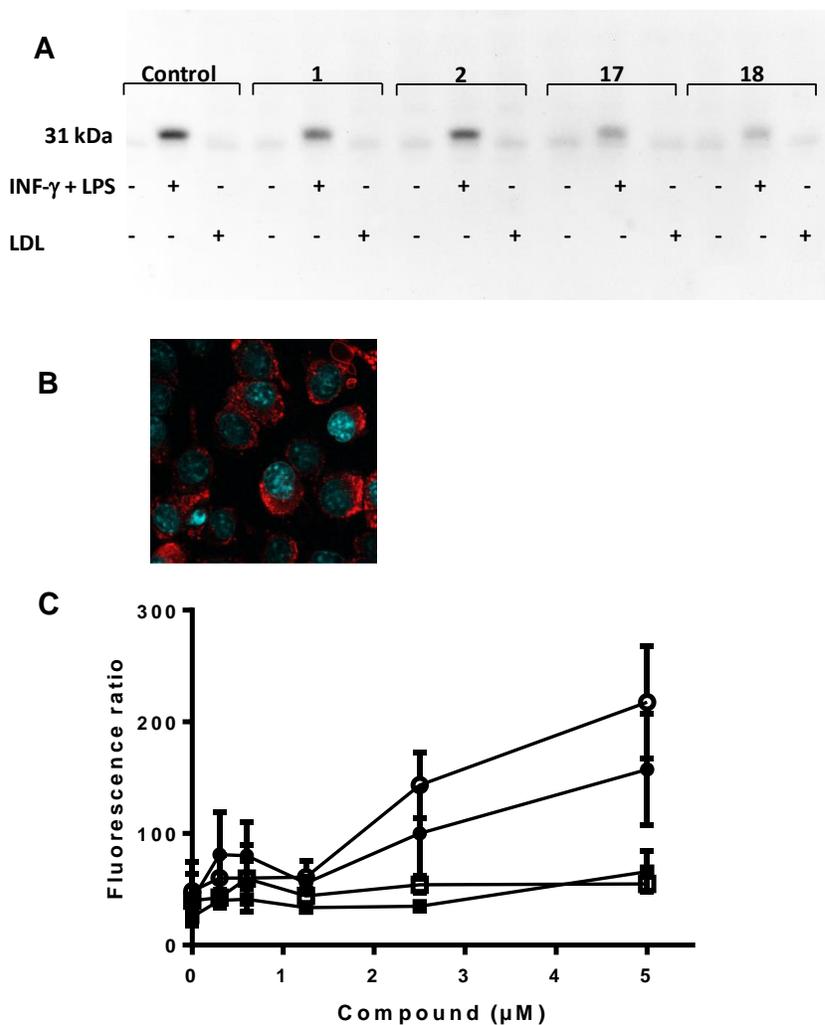


Figura 6.15. Efecto en la expresión de la IL-1 β y en la internalización de la LDL-ox. **A.** Western blot representativo de la expresión de IL-1 β por células J774 incubadas por 1 h en ausencia (Control) y presencia de **1**, **2**, **17** y **18** (5 μM), y desafiadas por 4 h con INF- γ (400 U.mL $^{-1}$) y LPS (8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y LDLox (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), según se indica. Luego de lisar las células las proteínas se separaron en 15% SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se revelaron con el anticuerpo policlonal anti-IL-1 β . **B.** Imagen representativa de la internalización de LDL-Dil (rojo) y de núcleos teñidos con Hoescht 3342 (azul) por células J774. **C.** Fluorescencia relativa de Dil ($\lambda_{\text{ex}} = 549 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 565 \text{ nm}$) / Hoescht ($\lambda_{\text{ex}} = 352 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$) en función de la concentración de los nitro-compuestos **1**, **2**, **17** y **18**. Las células se incubaron en placas de 96 pocillos, en presencia de concentraciones crecientes (0.2-5 μM) de compuesto por 1h, y luego por 4h con LDL-Dil. La fluorescencia de ambas sondas se midió empleando un lector de placas como se especifica en Materiales y Métodos.

7. Conclusiones

- Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron por RMN 20 nitro derivados aromáticos, 16 alquenos y 4 alcanos, con propiedades estereo-electrónicas diferentes.
- Como esperábamos, estos cambios estructurales provocaron diferencias en la reactividad.
- Los compuestos sintetizados fueron capaces de reaccionar en mayor o menor medida, con los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH, inhibiendo la oxidación de fluoresceína.
- Los derivados dimetilamino inhibieron la oxidación de LDL mediada por radicales peroxilo.
- Además demostramos que las propiedades anti-inflamatorias previamente reportadas por nosotros [123] estarían al menos en parte mediadas por el inhibición de la fase de priming inflamatorio, inhibiendo la inducción de la síntesis de IL-1 β .
- Observamos además que los derivados dimetilamino no producen muerte celular ni inhibición de la internalización de LDL por macrófagos murinos.

8. Perspectivas

- Profundizar los estudios de los mecanismos involucrados en la inhibición del proceso inflamatorio en cultivo de macrófagos
 - Estudio del mecanismo subyacente a la inhibición de la expresión de IL-1 β
 - Estudiar el efecto sobre el ensamblaje del inflamasoma
- Estudios “in vivo” en modelos murinos (LDL-R^{-/-}) del efecto sobre el desarrollo de la placa de ateroma.

9. Anexos

- Cataldo N, Musetti B, Celano L, Carabio C, Cassina A, Cerecetto H, González M, Thomson L. Inhibition of LDL oxidation and inflammasome assembly by nitroaliphatic derivatives. Potential use as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. *Eur J Med Chem*. 2018 Nov 5;159:178-186. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.09.062. Epub 2018 Sep 26. PubMed PMID: 30292895.
- Supplementary Cataldo et al, 2018
- Celano L, Cupertino Da Silva YK, Cataldo N, Gabay M, Merlino A, Alexandre-Moreira MS, Lima LM, Cerecetto H, González M, Thomson L. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Arylnitroalkenes. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2015;14(1):19-28. PubMed PMID: 26490661.
- Celano L, Carabio C, Frache R, Cataldo N, Cerecetto H, González M, Thomson L. Arylnitroalkenes as scavengers of macrophage-generated oxidants. *Eur J Med Chem*. 2014 Mar 3;74:31-40. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.12.029. Epub 2014 Jan 3. PubMed PMID: 24440380.

10. Referencias

- [1] J. Holtzman and M. Gross. Lipids, Oxidation, and Cardiovascular Disease. In: *Atherosclerosis and Oxidant Stress*. Springer; 2008. p. 79–95.
- [2] Mendis S, Puska P, Norrving, B editors. WHO | Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO no date;
- [3] McIntyre TM, Hazen SL. Lipid oxidation and cardiovascular disease: introduction to a review series. *Circ Res* 2010;107:1167–1169.
- [4] Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:16–26.
- [5] Zhou J, Li Y-S, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2191–2198.
- [6] Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci* 2018;132:1243–1252.
- [7] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1–13.
- [8] Starkov AA. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1147:37–52.
- [9] Chen Yeong-Renn, Zweier Jay L. Cardiac Mitochondria and Reactive Oxygen Species Generation. *Circ Res* 2014;114:524–537.
- [10] Lenaz G. Mitochondria and Reactive Oxygen Species. Which Role in Physiology and Pathology? In: Scatena R, Bottoni P, Giardina B, editors. *Advances in Mitochondrial Medicine*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 93–136.
- [11] Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 2015;6:524–551.
- [12] Lee M-C, Velayutham M, Komatsu T, et al. Measurement and Characterization of Superoxide Generation from Xanthine Dehydrogenase: A Redox-Regulated Pathway of Radical Generation in Ischemic Tissues. *Biochemistry* 2014;53:6615–6623.
- [13] Orrico, F., Moller, M., Cassina, A., et al. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. *Free Radic Biol Med* 2018;
- [14] Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995;251:3–7.
- [15] Netto LES, Antunes F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells* 2016;39:65–71.

- [16] Horstman JA, Wrona MZ, Dryhurst G. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorganic Chem* 2002;30:371–382.
- [17] Koppenol WH. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1993;15:645–651.
- [18] Zheng L, Nukuna B, Brennan M-L, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529–541.
- [19] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298:249–258.
- [20] Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:217–230.
- [21] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-1437.
- [22] Bartsaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol* 2018;14:618–625.
- [23] Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, et al. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev* 2018;118:1338–1408.
- [24] Thomson L. 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis. *Dis Markers* 2015;2015:708282.
- [25] Yang X, Li Y, Li Y, et al. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol* 2017;8:600.
- [26] Agarwal D, Haque M, Sriramula S, et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Redox Homeostasis in Exercise-Induced Delayed Progression of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 2009;54:1393–1400.
- [27] Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482:419–425.
- [28] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81–128.
- [29] Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 2009;50:S282–S286.
- [30] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49–62.
- [31] Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, et al. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:9238–9242.
- [32] Ridker PM, Buring JE, Rifai N, et al. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA* 2007;297:611–619.

- [33] Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, et al. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation* 2008;118:2243–2251, 4p following 2251.
- [34] Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, et al. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2018;391:319–328.
- [35] Wilson PW, D’Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837–1847.
- [36] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317–325.
- [37] Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118:620–636.
- [38] Zhou W, Chen C, Chen Z, et al. NLRP3: A Novel Mediator in Cardiovascular Disease. *J Immunol Res* 2018;2018:.
- [39] Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990;70:427–451.
- [40] Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537–544.
- [41] Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788–791.
- [42] Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577–584.
- [43] Cotran RS, Gimbrone MA, Bevilacqua MP, et al. Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med* 1986;164:661–666.
- [44] Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol* 1989;135:121–133.
- [45] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17:1410–1422.
- [46] Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:228–232.
- [47] Reglero-Real N, Colom B, Bodkin JV, et al. Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:2048–2057.

- [48] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–1143.
- [49] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol* 2015;4:296–307.
- [50] Abais JM, Xia M, Zhang Y, et al. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal* 2015;22:1111–1129.
- [51] Xia M, Boini KM, Abais JM, et al. Endothelial NLRP3 inflammasome activation and enhanced neointima formation in mice by adipokine visfatin. *Am J Pathol* 2014;184:1617–1628.
- [52] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* 2010;464:1357–1361.
- [53] Wang S, Xie X, Lei T, et al. Statins Attenuate Activation of the NLRP3 Inflammasome by Oxidized LDL or TNF α in Vascular Endothelial Cells through a PXR-Dependent Mechanism. *Mol Pharmacol* 2017;92:256–264.
- [54] Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 2013;14:812–820.
- [55] Satoh M, Tabuchi T, Itoh T, et al. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2014;126:233–241.
- [56] Estruch M, Rajamäki K, Sanchez-Quesada JL, et al. Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1 β release in human monocytes and macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:1442–1449.
- [57] Liu T, Zhang L, Joo D, et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017;2:17023.
- [58] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805–820.
- [59] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 2016;41:1012–1021.
- [60] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002;10:417–426.
- [61] Bäck M, Hansson GK. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2015;12:199–211.
- [62] Yu M, Tsai S-F, Kuo Y-M. The Therapeutic Potential of Anti-Inflammatory Exerkines in the Treatment of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2017;18:.

- [63] Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatol Oxf Engl* 2010;49:295–307.
- [64] Moreira DM, Vieira JL, Gottschall CAM. The effects of METHotrexate therapy on the physical capacity of patients with ISchemic heart failure: a randomized double-blind, placebo-controlled trial (METIS trial). *J Card Fail* 2009;15:828–834.
- [65] Crittenden DB, Lehmann RA, Schneck L, et al. Colchicine use is associated with decreased prevalence of myocardial infarction in patients with gout. *J Rheumatol* 2012;39:1458–1464.
- [66] Deftereos S, Giannopoulos G, Angelidis C, et al. Anti-Inflammatory Treatment With Colchicine in Acute Myocardial Infarction: A Pilot Study. *Circulation* 2015;132:1395–1403.
- [67] Kanbay M, Solak Y, Gaipov A, et al. Allopurinol as a kidney-protective, cardioprotective, and antihypertensive agent: hype or reality? *Blood Purif* 2014;37:172–178.
- [68] Jacobsson LTH, Turesson C, Gülfe A, et al. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:1213–1218.
- [69] Popa C, Netea MG, Radstake T, et al. Influence of anti-tumour necrosis factor therapy on cardiovascular risk factors in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:303–305.
- [70] Morton AC, Rothman AMK, Greenwood JP, et al. The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes: the MRC-ILA Heart Study. *Eur Heart J* 2015;36:377–384.
- [71] Ridker PM, Howard CP, Walter V, et al. Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation* 2012;126:2739–2748.
- [72] Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, et al. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;316:2373–2384.
- [73] Rosenson RS, Hislop C, Elliott M, et al. Effects of varespladib methyl on biomarkers and major cardiovascular events in acute coronary syndrome patients. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1079–1088.
- [74] Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, et al. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2015;372:2387–2397.
- [75] Tsujita K, Sugiyama S, Sumida H, et al. Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention: The Multicenter Randomized Controlled PRECISE-IVUS Trial. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:495–507.

- [76] Kotwal S, Jun M, Sullivan D, et al. Omega 3 Fatty acids and cardiovascular outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:808–818.
- [77] Seeger FH, Sedding D, Langheinrich AC, et al. Inhibition of the p38 MAP kinase in vivo improves number and functional activity of vasculogenic cells and reduces atherosclerotic disease progression. *Basic Res Cardiol* 2010;105:389–397.
- [78] Sarov-Blat L, Morgan JM, Fernandez P, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces inflammation after coronary vascular injury in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2256–2263.
- [79] Cheriyan J, Webb AJ, Sarov-Blat L, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase improves nitric oxide-mediated vasodilatation and reduces inflammation in hypercholesterolemia. *Circulation* 2011;123:515–523.
- [80] Elkhawad M, Rudd JHF, Sarov-Blat L, et al. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on vascular and systemic inflammation in patients with atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012;5:911–922.
- [81] Melloni C, Sprecher DL, Sarov-Blat L, et al. The study of LoSmapimod treatment on inflammation and InfarCtSizE (SOLSTICE): design and rationale. *Am Heart J* 2012;164:646-653.e3.
- [82] Chong J, Leung B, Poole P. Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;9:CD002309.
- [83] White WB, Cooke GE, Kowey PR, et al. Cardiovascular safety in patients receiving roflumilast for the treatment of COPD. *Chest* 2013;144:758–765.
- [84] Tardif J-C, Grégoire J, L’Allier PL, et al. Effects of the antioxidant succinobucol (AGI-1067) on human atherosclerosis in a randomized clinical trial. *Atherosclerosis* 2008;197:480–486.
- [85] Tardif J-C, McMurray JJV, Klug E, et al. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2008;371:1761–1768.
- [86] De Angelis G. The influence of statin characteristics on their safety and tolerability. *Int J Clin Pract* 2004;58:945–955.
- [87] Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 1976;29:1346–1348.
- [88] Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The Effect of Pravastatin on Coronary Events after Myocardial Infarction in Patients with Average Cholesterol Levels. *N Engl J Med* 1996;335:1001–1009.
- [89] Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301–1308.

- [90] Downs JR, Clearfield M, Tyroler HA, et al. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TEXCAPS): additional perspectives on tolerability of long-term treatment with lovastatin. *Am J Cardiol* 2001;87:1074–1079.
- [91] 4S. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet Lond Engl* 1994;344:1383–1389.
- [92] Ray KK, Cannon CP, McCabe CH, et al. Early and late benefits of high-dose atorvastatin in patients with acute coronary syndromes: results from the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1405–1410.
- [93] Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006;295:1556–1565.
- [94] Puri R, Nissen SE, Shao M, et al. Sex-related differences of coronary atherosclerosis regression following maximally intensive statin therapy: insights from SATURN. *JACC Cardiovasc Imaging* 2014;7:1013–1022.
- [95] Stegman B, Shao M, Nicholls SJ, et al. Coronary atheroma progression rates in men and women following high-intensity statin therapy: A pooled analysis of REVERSAL, ASTEROID and SATURN. *Atherosclerosis* 2016;254:78–84.
- [96] Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. *Neth Heart J* 2017;25:231–242.
- [97] Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet Lond Engl* 2010;376:1670–1681.
- [98] Thompson PD, Panza G, Zaleski A, et al. Statin-Associated Side Effects. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2395–2410.
- [99] Chatzizisis YS, Koskinas KC, Misirli G, et al. Risk factors and drug interactions predisposing to statin-induced myopathy: implications for risk assessment, prevention and treatment. *Drug Saf* 2010;33:171–187.
- [100] Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A, et al. Molecular basis of statin-associated myopathy. *Atherosclerosis* 2009;202:18–28.
- [101] Gitt AK, Drexel H, Feely J, et al. Persistent lipid abnormalities in statin-treated patients and predictors of LDL-cholesterol goal achievement in clinical practice in Europe and Canada. *Eur J Prev Cardiol* 2012;19:221–230.
- [102] Marques da Silva P, Massano Cardoso S, Ferreira AM, et al. Persistent lipid abnormalities in statin-treated patients: Portuguese diabetic subpopulation of the Dyslipidaemia International Study (DYSIS). *Prim Care Diabetes* 2015;9:283–289.
- [103] Wei Y, Guo H, The E, et al. Persistent lipid abnormalities in statin-treated coronary artery disease patients with and without diabetes in China. *Int J Cardiol* 2015;182:469–475.

- [104] Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154–156.
- [105] Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7100–7105.
- [106] Eslami SM, Nikfar S, Ghasemi M, et al. Does Evolocumab, as a PCSK9 Inhibitor, Ameliorate the Lipid Profile in Familial Hypercholesterolemia Patients? A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Soc Can Sci Pharm* 2017;20:81–96.
- [107] Lambert G, Sjouke B, Choque B, et al. The PCSK9 decade Thematic Review Series: New Lipid and Lipoprotein Targets for the Treatment of Cardiometabolic Diseases. *J Lipid Res* 2012;53:2515–2524.
- [108] Navarese EP, Kolodziejczak M, Schulze V, et al. Effects of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antibodies in Adults With Hypercholesterolemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med* 2015;163:40.
- [109] Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet* 2014;383:60–68.
- [110] Schmidt AF, Pearce LS, Wilkins JT, et al. PCSK9 monoclonal antibodies for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;4:CD011748.
- [111] Hlatky MA, Kazi DS. PCSK9 Inhibitors: Economics and Policy. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2677–2687.
- [112] Brooks PM, Day RO. Nonsteroidal antiinflammatory drugs--differences and similarities. *N Engl J Med* 1991;324:1716–1725.
- [113] Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 2005;112:759–770.
- [114] Li L, Geraghty OC, Mehta Z, et al. Age-specific risks, severity, time course, and outcome of bleeding on long-term antiplatelet treatment after vascular events: a population-based cohort study. *Lancet Lond Engl* 2017;390:490–499.
- [115] Sondergaard KB, Weeke P, Wissenberg M, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use is associated with increased risk of out-of-hospital cardiac arrest: a nationwide case-time-control study. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 2017;3:100–107.
- [116] Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001;286:954–959.
- [117] Pepine CJ, Gurbel PA. Cardiovascular safety of NSAIDs: Additional insights after PRECISION and point of view. *Clin Cardiol* 2017;40:1352–1356.

- [118] Celano L, Carabio C, Frache R, et al. Arylnitroalkenes as scavengers of macrophage-generated oxidants. *Eur J Med Chem* 2014;74:31–40.
- [119] Celano L, Cupertino Da Silva YK, Cataldo N, et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Arylnitroalkenes. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2015;14:19–28.
- [120] LIANG K-C, CHIANG-WEN LEE, WEI-NING LIN, et al. Interleukin-1 β Induces MMP-9 Expression Via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and Nuclear Factor- κ B Signaling Pathways in Human Tracheal Smooth Muscle Cells. *Journal of Cellular Physiology* 2007;759–770.
- [121] Amen F, Machin A, Touriño C, et al. N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion. *Arch Biochem Biophys* 2017;621:31–37.
- [122] Liu Z, Wang J, Huang E, et al. Tanshinone IIA suppresses cholesterol accumulation in human macrophages: role of heme oxygenase-1. *J Lipid Res* 2014;55:201–213.
- [123] Xu S, Huang Y, Xie Y, et al. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and Dil-oxLDL uptake. *Cytotechnology* 2010;62:473–481.
- [124] Fisher TS, Surdo PL, Pandit S, et al. Effects of pH and Low Density Lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL Receptor Regulation. *J Biol Chem* 2007;282:20502–20512.
- [125] Brown, B.R. Nitroalkenes and nitroalkynes. In: *The Organic Chemistry of Aliphatic Nitrogen Compounds*. United States: Oxford University Press; 1994. p. 470–471.
- [126] Mock GA, Moffatt JG. An approach to the total synthesis of sinefungin. *Nucleic Acids Res* 1982;10:6223–6234.
- [127] Seoane G., Risso M. *Tablas espectroscópicas para elucidación estructural*. Facultad de Química; 2006.
- [128] Cataldo N, Musetti B, Celano L, et al. Inhibition of LDL oxidation and inflammasome assembly by nitroaliphatic derivatives. Potential use as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. *Eur J Med Chem* 2018;159:178–186.
- [129] Boiani M, Boiani L, Merlino A, et al. Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur J Med Chem* 2009;44:4426–4433.
- [130] Merlino A, Boiani M, Cerecetto H, et al. 2-Benzyl-2-methyl-2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: Spectroscopic and theoretical study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007;67:540–549.
- [131] Werber J, Wang YJ, Milligan M, et al. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 2011;100:3307–3315.
- [132] Corwin Hansch, Albert Leo. *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*. New York: John Wiley & Sons Inc; 1979.