

**Figura 19. Determinación de  $k_{\text{obs}}$  para la inhibición de la actividad POX en PGHS-2.** Se muestran resultados representativos para PGHS inhibida con NO<sub>2</sub>AA (A) 0.2  $\mu\text{M}$  y (B) 1  $\mu\text{M}$ . A partir de los datos primarios de TMPD<sub>ox</sub> para tiempos de preincubación con concentraciones crecientes de NO<sub>2</sub>AA crecientes (inserto) calculamos la actividad específica POX (velocidad inicial, 30 segundos) y representamos gráficamente la actividad POX remanente para tiempos de preincubación crecientes. Ajustamos los datos a una exponencial de orden 1 para obtener los valores de  $k_{\text{obs}}$ . Los resultados corresponden a los promedios  $\pm$  S.D., de experimentos al menos triplicados.

**Tabla 2. Parámetros cinéticos de inhibición para PGHS-1 y 2**

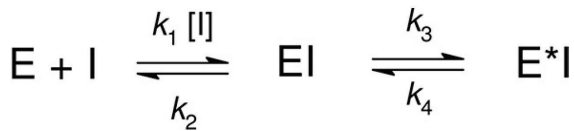
Parámetro Cinético	PGHS-1	PGHS-2
$K_3 (k_{inact})$	$4.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$5.7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
$K_4$	$8.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$7.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
$K_i$	1.02 $\mu\text{M}$	1.76 $\mu\text{M}$
$K_i^{app}$	0.019 $\mu\text{M}$	0.20 $\mu\text{M}$
Eficiencia ( $k_{inact}/K_i$ )	$4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

parámetros cinéticos que se resumen en la tabla 2. El análisis de los parámetros cinéticos dio mucha información respecto a la interacción PGHS-NO<sub>2</sub>AA:

i) La interacción PGHS-NO<sub>2</sub>AA corresponde a un modelo de isomerización enzimática (modelo iii, Esquema 2).  $k_4$  ( $k_{off}$ ) tuvo un valor 1 orden de magnitud menor a  $k_3$  ( $k_{on}$ ), indicando que el NO<sub>2</sub>AA es un inhibidor virtualmente irreversible de PGHS: la unión reversible que se establece inicialmente (representada por  $K_i$ ) está seguida por un evento virtualmente irreversible ( $K_i^{*app}$ ) (Esquema 3).  $K_i^{*app}$  se define como la concentración aparente de inhibidor necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de inactivación. Es importante destacar que las modificaciones covalentes responden al modelo iv en el esquema 2, donde el valor de  $k_4$  es nulo [184].

ii) En ambas isoformas de la enzima  $K_i^{*app} \ll K_i$ , demostrando que el paso limitante en la

**Esquema 3. Modelo de “isomerización enzimática”.**



$$k_{obs} = k_4 + [(k_3[I]) / K_i + [I]]$$

$$k_{obs} = k_4 [(1 + ([I] / K_i^{*app})) / (1 + [I] / K_i)]$$

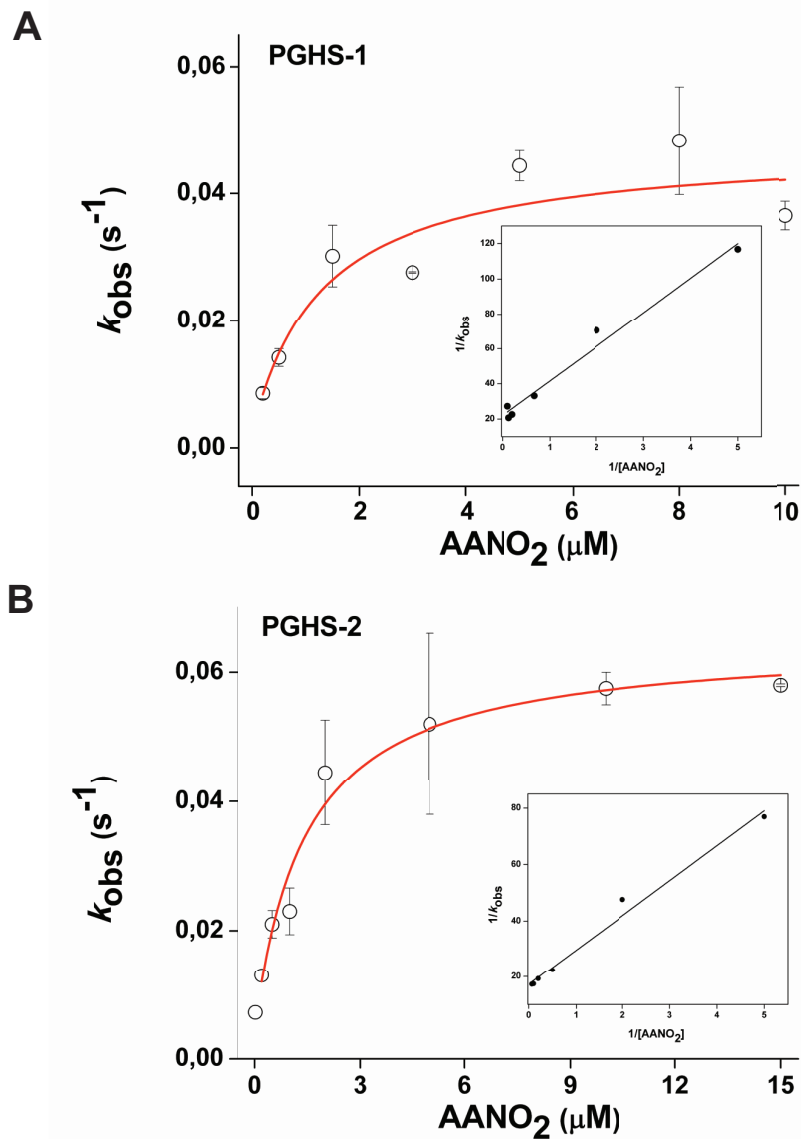
inhibición corresponde al segundo equilibrio, donde la enzima sufre una modificación por parte del inhibidor para formar E\*I [184].

iii) Los gráficos del doble recíproco  $1/k_{obs}$  vs  $1/[\text{NO}_2\text{AA}]$  (Figura 20, insertos) mostraron una relación lineal con una intersección en el eje de las y mayor a cero, confirmando una inhibición

irreversible.

iv) La potencia de la inhibición, estimada por  $k_{inact}/K_i$ , es levemente mayor para la isoforma constitutiva, aunque mostró la misma velocidad máxima de inhibición ( $k_3$ ) y afinidad (como indica  $K_i^{*app}$ ) para PGHS-1 y 2.

v) Algunos de los inhibidores más representativos de PGHS siguen a grandes rasgos este modelo cinético de inhibición (ej. indometacina, flurbiprofeno, otros AINES con su carboxilo libre), y también muestran un valor de  $k_4$  lo suficientemente bajo como para considerarlos virtualmente irreversibles [140].



**Figura 20. Determinación del modelo cinético de inhibición.** NO<sub>2</sub>AA inhibió la actividad POX de **(A)** PGHS-1 y **(B)** PGHS-2 con una relación hiperbólica entre  $k_{obs}$  y la concentración de NO<sub>2</sub>AA, característico de inhibidores tiempo-dependientes lentos que actúan en dos pasos. El mejor ajuste de los datos fue obtenido para las ecuaciones del modelo de inhibición (iii) en el Esquema 3 (“isomerización enzimática”). Los gráficos doble recíproco que se muestran en el inserto confirman una inhibición en dos pasos e interseccionan el eje de las y en valores mayores a cero, de acuerdo con una inhibición irreversible. Los resultados corresponden a los promedios  $\pm$  S.D.

***En definitiva el NO<sub>2</sub>AA inhibió la actividad POX en PGHS-1 y 2 manera dosis- y tiempo- dependiente siguiendo un mecanismo en dos pasos de “isomerización enzimática” irreversible, con una potencia de inhibición comparable o mayor a la de los AINES [98, 140, 141, 185].***

### 5.2.2 Evaluación de NO<sub>2</sub>AA como potencial sustrato de PGHS

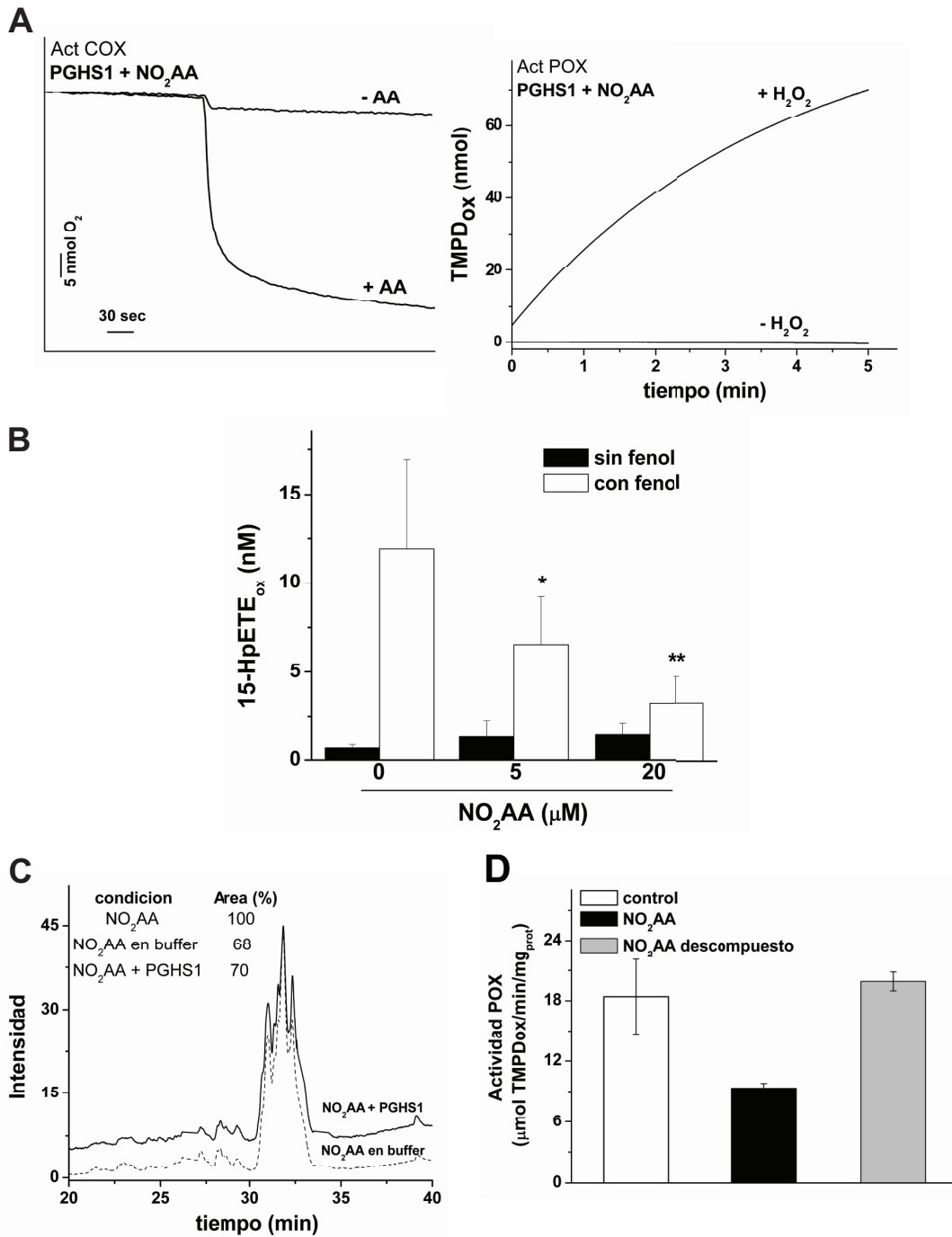
Aunque el estudio cinético no lo sugirió, debimos descartar que el NO<sub>2</sub>AA representara un sustrato no productivo para la actividad COX (su analogía estructural con el sustrato natural lo hacía probable) o POX. ***Cuando incubamos NO<sub>2</sub>AA con PGHS-1 en ausencia de sustrato no hubo consumo de O<sub>2</sub> (actividad COX) ni oxidación de TMPD (actividad POX) (Figura 21A).***

Si el NO<sub>2</sub>AA actuara como co-sustrato reductor durante el ciclo catalítico POX, podría establecer una competencia por el compuesto I y II con el TMPD inhibiendo la actividad POX de manera artefactual. Para estudiar esta posibilidad monitoreamos por el ensayo de FOX (ferrous ion oxidation xylenol orange) la reducción de ácido 15-hidroperoxieicosatetraenoico (15-HpETE) a ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE) catalizada por la actividad POX de PGHS-1 utilizando fenol como co-sustrato reductor. En presencia de fenol, el NO<sub>2</sub>AA inhibió la actividad POX con una potencia similar a la determinada por el ensayo del TMPD, mientras que sin fenol no observamos formación de 15-HETE en ausencia o presencia de NO<sub>2</sub>AA (Figura 21B).

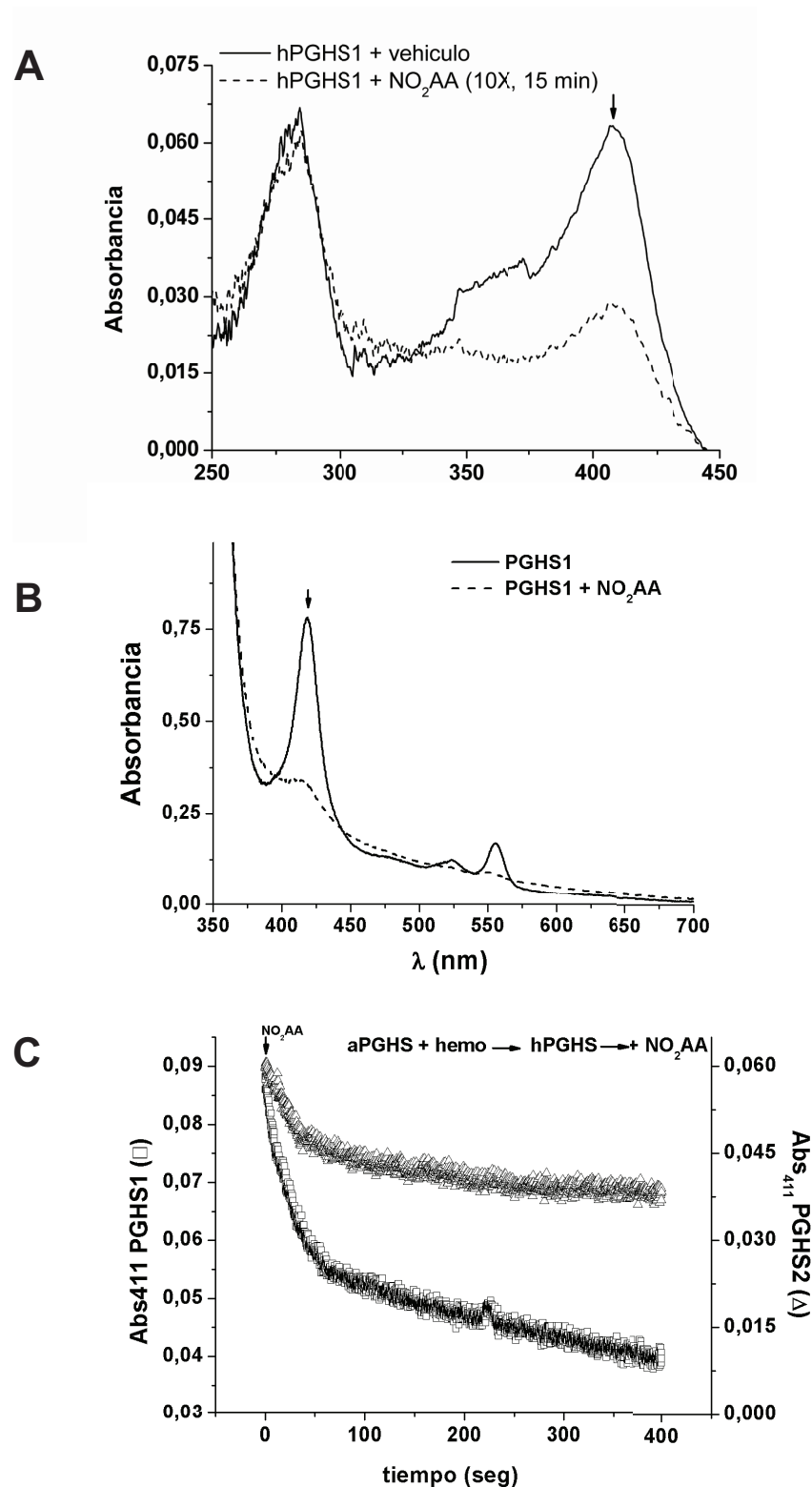
A continuación evaluamos si la inhibición observada se debía a la formación de especies derivadas de la descomposición del nitroalqueno en el medio acuoso de la reacción durante la preincubación con la enzima. Incubamos NO<sub>2</sub>AA en buffer en presencia o ausencia de PGHS-1, y realizamos una extracción lipídica de las muestras para analizar por HPLC la formación de nuevos productos. No observamos formación de productos secundarios cuando el NO<sub>2</sub>AA se incubó con la enzima (Figura 21C). La disminución de un 30 % de NO<sub>2</sub>AA (respecto al control en metanol) en presencia y ausencia de PGHS se debe a la descomposición acuosa del nitroalqueno [70, 71] (Figura 21C). ***Además, cuando el NO<sub>2</sub>AA se descompuso previamente en buffer no tuvo ningún efecto sobre la actividad POX de PGHS-1, confirmando que ni el NO<sub>2</sub>AA ni los productos derivados de la descomposición de NO<sub>2</sub>AA son sustratos de PGHS (Figura 21D).***

### 5.2.3 Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre el grupo hemo de PGHS

En el año 2008, E.E. Kelley et al. reportaron que el NO<sub>2</sub>OA inactiva a la enzima xantina oxido-reductasa (XOR); si bien no lo confirmaron, sugirieron que el grupo molibdeno (crítico para la actividad de la enzima) era el blanco de acción del nitroalqueno [186]. PGHS también cuenta con un centro metálico (hemo, o Fe<sup>3+</sup>-PPIX) que es crítico para ambas actividades enzimáticas por lo cual era posible que una alteración del grupo hemo fuera el origen de los efectos observados. Al realizar espectros en el visible de hPGHS



**Figura 21. Rol de NO<sub>2</sub>AA como sustrato de PGHS. (A)** Incubamos PGHS-1 con NO<sub>2</sub>AA en presencia u ausencia de sustratos y determinamos actividades COX y POX. El pequeño consumo de O<sub>2</sub> cuando se agrega NO<sub>2</sub>AA en ausencia de AA se debe al vehículo (metanol) y el cambio en la temperatura. **(B)** Para determinar si NO<sub>2</sub>AA puede actuar como co-sustrato reductor compitiendo con TMPD, evaluamos la actividad POX por el ensayo de FOX siguiendo la reducción de 12-HpETE en presencia u ausencia de fenol. Los datos corresponden a los promedios ± S.D., *n*=3, de triplicados. **(C)** Para evaluar la formación de productos secundarios derivados de NO<sub>2</sub>AA durante la preincubación con PGHS, incubamos al nitroalqueno en buffer, metanol, o con PGHS, se realizó una extracción orgánica y los productos obtenidos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura, no se obtuvieron nuevos productos por la acción de la enzima sobre el NO<sub>2</sub>AA **(D)** El NO<sub>2</sub>AA descompuesto en solución amortiguadora (fosfato de sodio, 50 mM, pH 7.4) a 4 °C por 15 horas no inhibió a PGHS.



**Figura 22. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre el grupo hemo en hPGHS. (A)** Espectro de hPGHS-1 preincubada con NO<sub>2</sub>AA (10x); el máximo de absorbancia de la banda de Soret para el hemo (411nm) sufrió una drástica disminución, apoyando la idea de que el grupo hemo es modificado o desplazado de la proteína. **(B)** La disminución en concentración de hemo unido a PGHS fue determinada por el método cuantitativo de piridina hemocromo. El hemocromógeno de piridina se estimó en 4.5 y 2.3  $\mu$ M para PGHS tratada con vehículo y NO<sub>2</sub>AA (10x), respectivamente. **(C)** Registro cinético de los cambios en el máximo de absorbancia del hemo por agregado de NO<sub>2</sub>AA (30x) a una solución de PGHS-1 o PGHS-2.

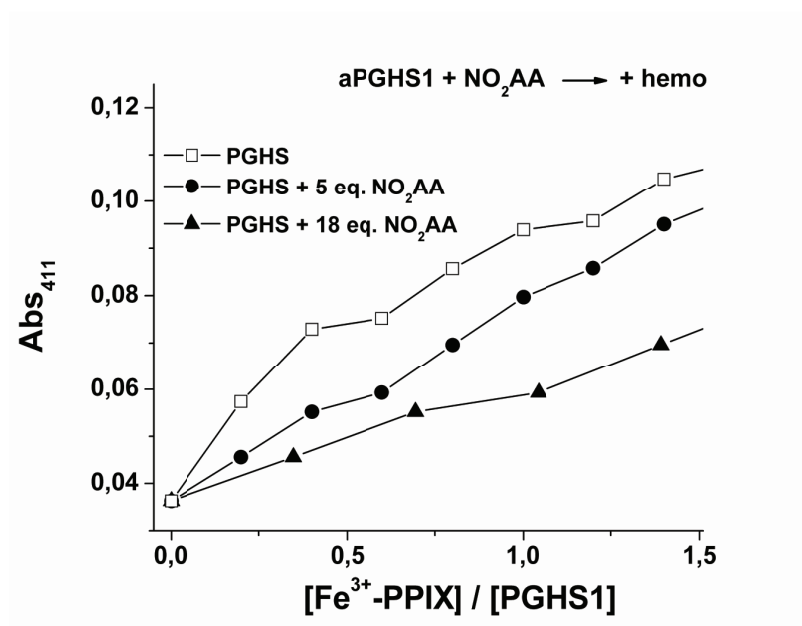
preincubada con NO<sub>2</sub>AA observamos una disminución muy significativa en la banda de Soret, región de máxima absorbancia del grupo hemo (Figura 22A). Lo confirmamos utilizando el método de piridina hemocromo, clásico en las determinaciones de concentración de hemo [163]. El cromóforo de piridina disminuyó de 4.5 μM en la enzima no tratada a 2.3 μM en la enzima tratada con NO<sub>2</sub>AA (Figura 22B), confirmando que el NO<sub>2</sub>AA indujo un desplazamiento del hemo desde su sitio de unión. En el registro cinético de absorbancia a 411 nm, la adición de NO<sub>2</sub>AA a una suspensión de hPGHS-1 o 2 desencadenó una caída importante en la absorbancia (Figura 22C), que fue más pronunciada para PGHS-1.

A continuación estudiamos los efectos de NO<sub>2</sub>AA sobre la incorporación de hemo a aPGHS. Para estudiar por espectrofotometría la incorporación de hemo a la proteína, aPGHS-1 se preincubó con inhibidor por 10 minutos, se ultracentrifugó para retirar el exceso de inhibidor, y se reconstituyó con 0.5 equivalentes de hemo. El tratamiento de aPGHS-1 con NO<sub>2</sub>AA redujo aproximadamente cuatro veces la cantidad de hemo que se incorporó eficientemente a su sitio de unión en la proteína; consecuentemente, la enzima perdió la actividad enzimática (Tabla 3). Utilizamos como control negativo a la droga indometacina, un AINE que inhibe la actividad COX de PGHS de manera no selectiva, tras bloquear el canal de entrada al sitio activo COX [143]. El tratamiento de aPGHS-1 con indometacina no alteró la incorporación de hemo a la proteína y tampoco alteró la actividad POX (Tabla 3). En la figura 23 se muestra la titulación con hemo de aPGHS-1 preincubada con NO<sub>2</sub>AA. El nitroalqueno disminuyó de manera dosis-dependiente la incorporación de hemo a aPGHS, confirmando los resultados de la tabla 3.

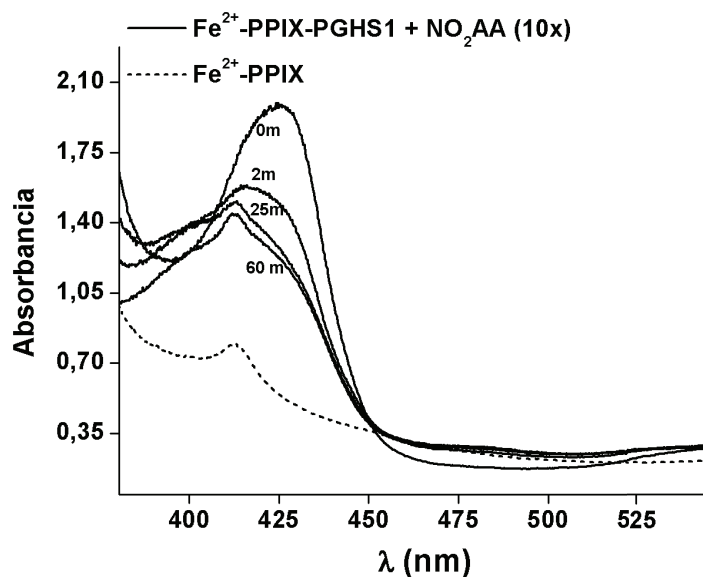
Cuando utilizamos ditionito para reducir el hemo en hPGHS desde Fe<sup>3+</sup>-PPIX a Fe<sup>2+</sup>-PPIX, que establece una interacción penta-coordinada con la enzima [98, 113], sus

Condición	Actividad POX (μmol TMPDox/min/mg <sub>prot</sub> )	Actividad COX (μmol O <sub>2</sub> /min/mg <sub>prot</sub> )	Abs280/Abs411
Control	27.44 ± 1.00	71.98 ± 0.086	0.97
+ NO <sub>2</sub> AA	1.08 ± 0.14	0	4.31
+ indometacina	24.00 ± 0.44	ND	1.20

**Tabla 3. NO<sub>2</sub>AA inhibe la actividad enzimática por desplazamiento del grupo hemo.** aPGHS (3.5 μM) se incubó con vehículo o inhibidor (1 mM) por 10 minutos. El exceso de inhibidor se eliminó por filtrado, se reconstituyó aPGHS a hPGHS con hemo y se determinaron las actividades POX y COX, y la eficiencia de unión del hemo (Abs<sub>280</sub>/Abs<sub>411</sub>). En todos los casos se corrigieron los valores por dilución. La indometacina no alteró la unión del hemo a PGHS, ni inhibió la actividad POX. NO<sub>2</sub>AA redujo aproximadamente 4 veces la unión de hemo a aPGHS e inactivó a la enzima.



**Figura 23. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la unión de hemo a aPGHS.** Para estudiar si NO<sub>2</sub>AA también afecta la unión normal de hemo a aPGHS realizamos titulaciones de pPGHS (2 μM) con alícuotas de hemo (0.2 eq), y registramos los cambios de absorbancia a 411 nm. El NO<sub>2</sub>AA inhibió de manera dosis-dependiente la incorporación de hemo a su sitio de unión en PGHS-1 y 2. Se muestra el resultado representativo de PGHS-1. Los datos corresponden al promedio de experimentos por triplicado.

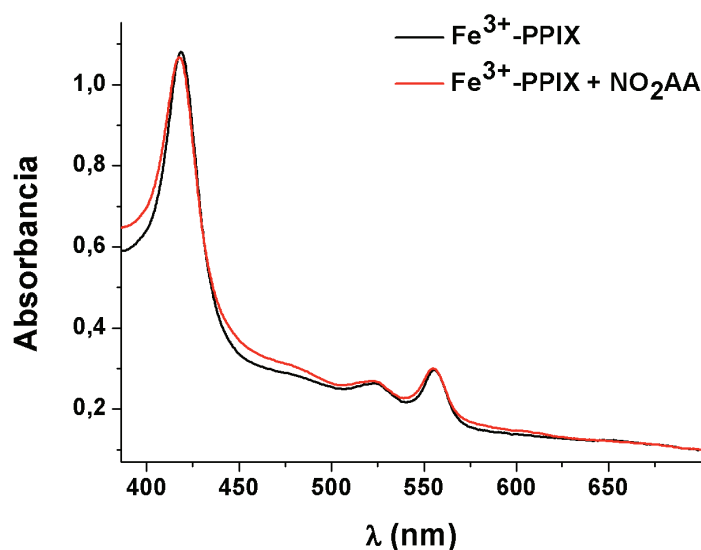


**Figura 24. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre Fe<sup>2+</sup>-PPIX-PGHS.** La reducción de hemo férrico a hemo ferroso (con ditionite) se utilizó como herramienta para confirmar la liberación del hemo desde PGHS por NO<sub>2</sub>AA. Para ello se realizaron espectros en el tiempo (0-60 min) observándose que el espectro de Fe<sup>2+</sup>-PPIX unido a la proteína (—) es marcadamente diferente al espectro de Fe<sup>2+</sup>-PPIX libre en solución (---).



propiedades espectroscópicas cambiaron facilitando diferenciar el hemo que se encuentra unido a la proteína del hemo en solución acuosa. Agregamos  $\text{NO}_2\text{AA}$  a una muestra de  $\text{Fe}^{2+}$ -PPIX-PGHS-1 y seguimos los cambios espectrales de la muestra en condiciones cuasi anaeróbicas (controlamos que no hubiera oxidación hacia  $\text{Fe}^{3+}$ -PPIX durante el tiempo del experimento), observándose una disminución en el máximo de absorbancia del cromóforo y un cambio gradual del espectro desde el característico para  $\text{Fe}^{2+}$ -PPIX-PGHS-1 hacia el característico para  $\text{Fe}^{2+}$ -PPIX libre en solución (Figura 24).

El  $\text{NO}_2\text{AA}$  alteró la unión de hemo tanto en holo- como en apo- PGHS sugiriendo que la interacción  $\text{NO}_2\text{AA}$ -PGHS se establece con la proteína y no con el grupo hemo. Para confirmarlo analizamos por el método de piridina hemocromo al hemo en solución tratado con vehículo o con  $\text{NO}_2\text{AA}$ , sin observarse cambios entre ambas condiciones (Figura 25, comparar con Figura 22B). También evaluamos por ESI MS los cambios en hemo libre por incubación con  $\text{NO}_2\text{AA}$ , y no encontramos ninguna diferencia que apoyara una modificación covalente del hemo (no se muestra).

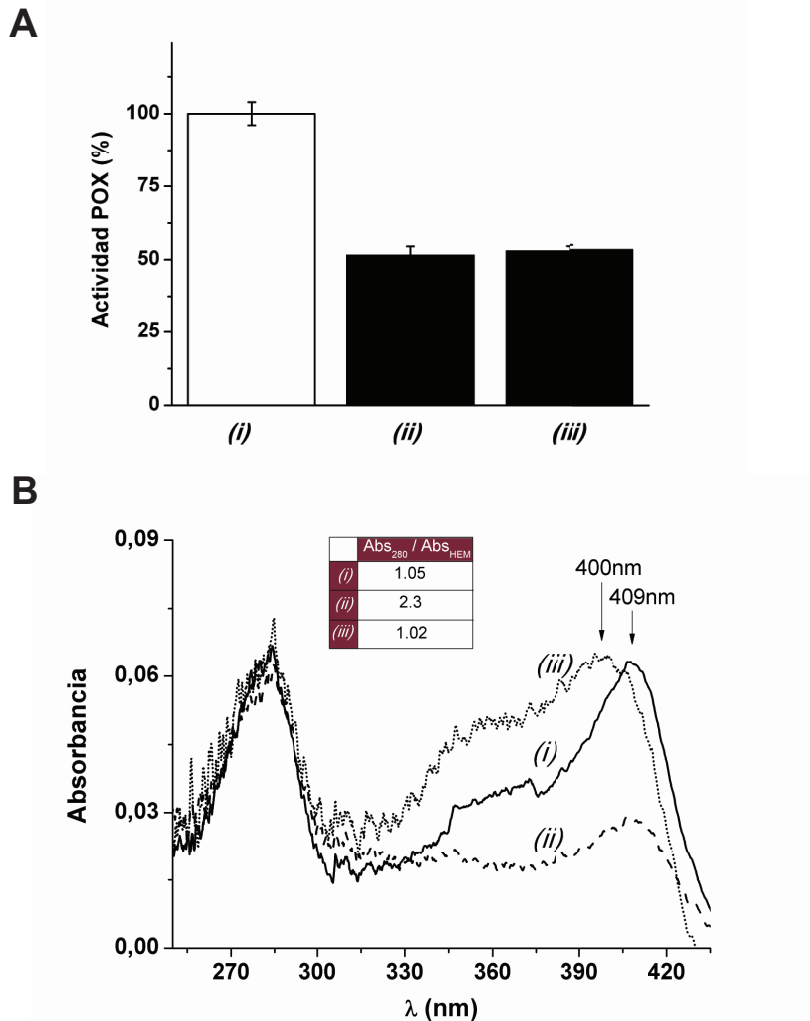


**Figura 25. Modificación directa del hemo por  $\text{NO}_2\text{AA}$ .** El ensayo de piridina hemocromo no mostró ninguna diferencia entre el hemo ( $10 \mu\text{M}$ ) libre (en negro) en amortiguador fosfato de sodio,  $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.4$ , y el hemo tratado por 10 minutos con  $\text{NO}_2\text{AA}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) (en rojo).

***Todos estos resultados muestran que la inhibición de PGHS-1 y 2 responde a una incapacidad de la enzima tratada con  $\text{NO}_2\text{AA}$  de unir de manera productiva a su grupo hemo, crítico para ambas actividades.*** Para confirmar la irreversibilidad de la inhibición que predecía la caracterización cinética, evaluamos por espectrofotometría y por determinaciones cinéticas la capacidad de PGHS-2 tratada con  $\text{NO}_2\text{AA}$  de reincorporar el

grupo hemo. PGHS-2 no recuperó la actividad POX perdida luego de una preincubación

holoPGHS2 + vehículo / NO<sub>2</sub>AA (10x) , 15 min → + hemo, 4 h  
 (i) (ii) (iii)

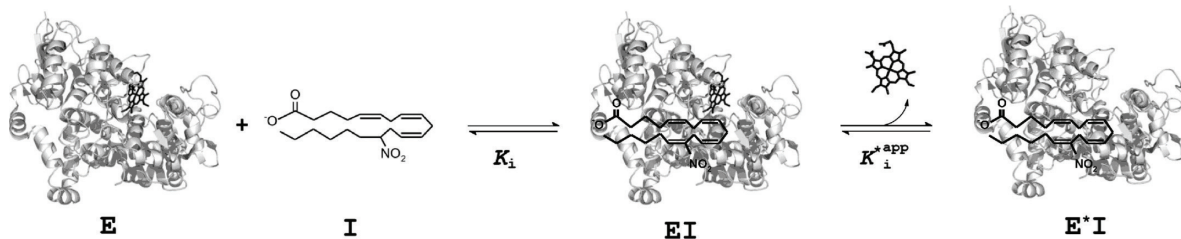


**Figura 26. Reversibilidad de la inhibición de PGHS por NO<sub>2</sub>AA.** hPGHS se preincubó con NO<sub>2</sub>AA (10X) por 15 minutos y se filtró para eliminar el exceso de inhibidor y el hemo liberado. A continuación, la enzima tratada con vehículo (i) o NO<sub>2</sub>AA (ii) se incubó con 1 eq de hemo a 4 °C durante un tiempo prolongado (4h). **(A)** El tratamiento de PGHS con NO<sub>2</sub>AA (ii) redujo la actividad POX respecto a la muestra control (i). La inhibición fue irreversible incluso cuando la enzima inhibida se incubó con hemo por tiempos prolongados (iii). Los datos corresponden al promedio ± S.D., n=3, de experimentos duplicados. **(B)** Espectros UV-vis de cada condición mostraron que el NO<sub>2</sub>AA induce una disminución importante del contenido de hemo en hPGHS (ii), pero la re-reconstitución por incubación con hemo en períodos largos es efectiva (iii), aunque no se recupere la actividad enzimática.

prolongada (4 horas) con hemo (Figura 26A). Sin embargo, sí fue capaz de reincorporar el hemo tras las 4 horas de preincubación (Figura 26B). Una exposición prolongada a hemo fue capaz de revertir la interacción NO<sub>2</sub>AA-PGHS a pesar de que la enzima permaneció en una forma no productiva, sugerente de una modificación de tipo no covalente.

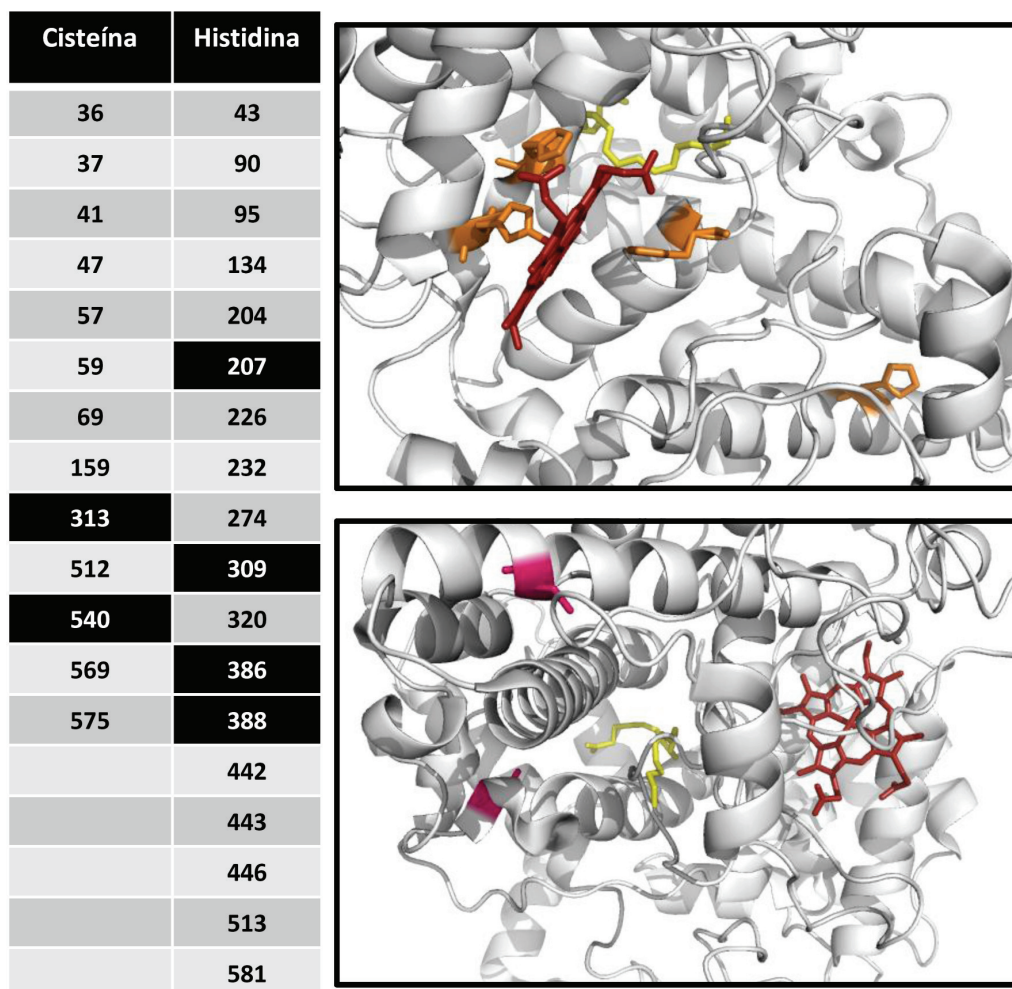
### 5.3 Estudio de los determinantes estructurales en la interacción PGHS-NO<sub>2</sub>AA

El mecanismo de inhibición dependiente de la salida del grupo hemo ajusta perfectamente al modelo cinético de “isomerización enzimática” (Figura 27): La reacción de NO<sub>2</sub>AA con PGHS lleva a la formación inicial de un complejo E-I. En el segundo paso (limitante) de la inhibición el complejo E-I pierde el grupo hemo, generando una forma inactiva de la enzima (E\*I). El NO<sub>2</sub>AA no reaccionó con el hemo, sino que modificó su entorno de unión con la proteína, o bien interactuó con una región diferente pero induciendo un cambio conformacional que impidió la reincorporación productiva del hemo.



**Figura 27. Mecanismo de inhibición de PGHS.** El NO<sub>2</sub>AA inhibe a PGHS-1 y 2 en un mecanismo tiempo-dependiente de “isomerización enzimática”, donde establece una primer interacción con PGHS seguido por una segunda reacción limitante: el desplazamiento del grupo hemo dando lugar al complejo inactivo E\*I.

La caracterización cinética mostró que el NO<sub>2</sub>AA establece una interacción de tipo muy fuerte con ambas isoformas de la enzima, pero fue sugerente (junto con los resultados en la figura 26) de una modificación no covalente. Sin embargo, la cinética no es una herramienta que proporcione resultados concluyentes respecto a la naturaleza (iónica, hidrofóbica, covalente, etc) o sobre el sitio donde ocurren las interacciones. Además, la mayoría de los efectos biológicos de nitroalquenos se asocian a su electrofilicidad y a la regulación de proteínas por modificación covalente de residuos nucleofílicos como cisteína o histidina (nitroalquilación) [67, 68]. El grupo hemo en PGHS se une no covalentemente en una región de la proteína relativamente expuesta al solvente, comprendida dentro del sitio activo POX [98]. El ligando proximal al hemo es la H388, que establece la 5ta posición de coordinación por enlace de su N $\delta$  del anillo imidazol con el átomo de hierro. A su vez, la H388 establece un enlace de hidrógeno con la H386. Ambos residuos de histidina son claves para la unión productiva del hemo a PGHS, y para su actividad enzimática [98, 187, 188]. La H207, ubicada aproximadamente a 5 Å del hierro, también es crítica para la actividad POX y la estabilidad del grupo hemo [98, 99, 188, 189]. La 6ta posición de coordinación está ocupada por una molécula de agua [113, 190]. Por lo expuesto anteriormente, este ambiente se presenta muy propicio para una modificación covalente por NO<sub>2</sub>AA. En la figura 28 se muestra la estructura cristalográfica de PGHS y se señalan los posibles blancos de nitroalquilación por NO<sub>2</sub>AA.

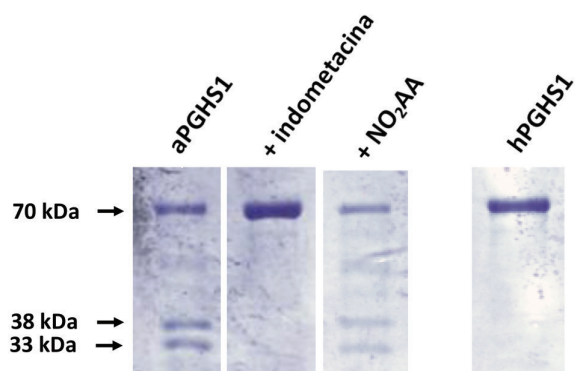


**Figura 28. Residuos nucleofílicos críticos para la actividad PGHS.** La enzima contiene numerosos residuos nucleofílicos de cisteína e histidina. Señalamos los residuos críticos para la actividad en la tabla (negro) y en la estructura cristalográfica (*PDB 1DIY*). Cisteína (rosado), histidina (naranja), hemo (rojo), AA (amarillo).

Para dilucidar el sitio de interacción entre PGHS y  $\text{NO}_2\text{AA}$ , y los aspectos estructurales de la misma, recurrimos a una serie de herramientas bioquímicas, cinéticas, proteómicas y computacionales que discutimos a continuación.

### 5.3.1 Interacción con el sitio activo COX

Los residuos H274 a Q284 en PGHS constituyen un loop peptídico que es sensible a la proteólisis limitada por tripsina (en la posición R277) en la apo-enzima, pero no en la holo-enzima o en la apo-enzima unida a AINES [164]. Realizamos el ensayo de protección por tripsina utilizando indometacina como control positivo de protección para estudiar si el  $\text{NO}_2\text{AA}$  comparte esta característica con los AINES. Como esperábamos, aPGHS tratada con tripsina se clivó generando dos fragmentos de menor peso molecular, y la unión de indometacina al sitio activo COX protegió a la proteína (Figura 29). **La preincubación con**



**Figura 29. Protección de la proteólisis por tripsina.** La proteólisis limitada por tripsina cliva a aPGHS en el residuo Arg277 generando dos fragmentos de 38 y 33 kDa. El hemo en hPGHS así como el tratamiento con AINES inducen un cambio conformacional que protegió a la enzima de la proteólisis [Kalgutkar et al., 1996, *Biochemistry*, Vol. 35]. Sin embargo, y a diferencia de la indometacina, el tratamiento con NO<sub>2</sub>AA no protegió a PGHS-1 de la proteólisis por tripsina.

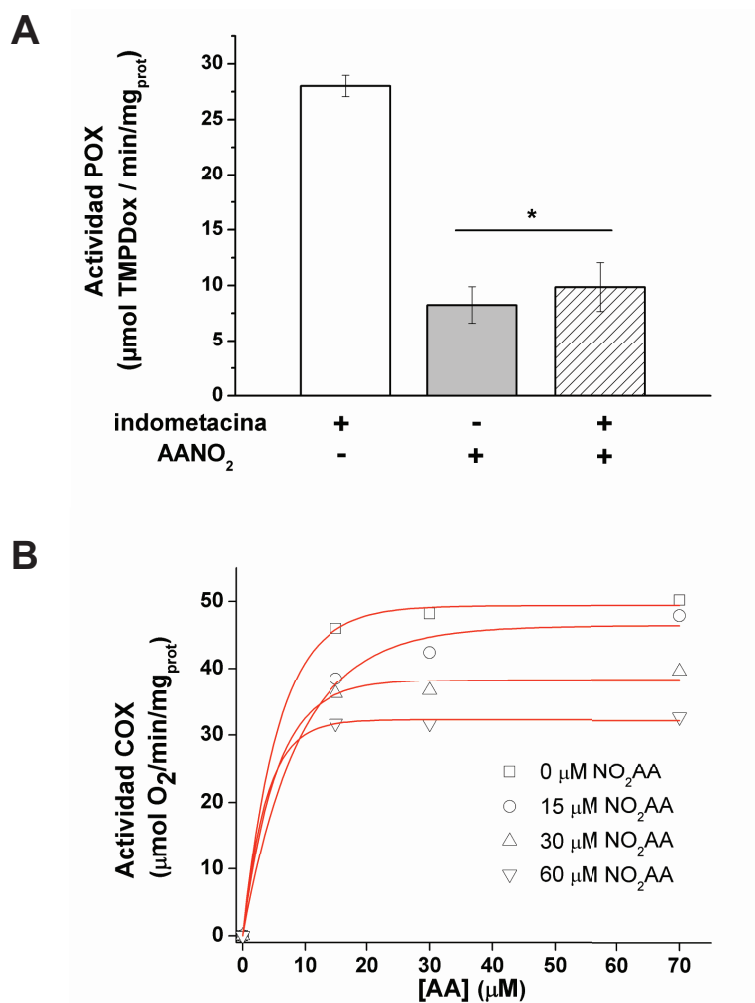
**NO<sub>2</sub>AA no protegió de la proteólisis por tripsina, mostrando que la interacción PHGS-NO<sub>2</sub>AA es diferente a la interacción PGHS-AINES (Figura 29).**

A continuación realizamos un ensayo de competencia con indometacina por la ocupación del sitio activo COX. Preincubamos PGHS-1 o 2 preincubadas con concentraciones saturantes de indometacina para bloquear el acceso al canal hidrofóbico, y a continuación tratamos a la enzima con NO<sub>2</sub>AA. **El efecto del nitroalqueno fue idéntico en presencia o ausencia de indometacina saturante, mostrando que el NO<sub>2</sub>AA no se une al sitio activo COX (Figura 30A). También realizamos un ensayo de competencia cinética evaluando la inhibición dosis-dependiente por NO<sub>2</sub>AA del consumo de O<sub>2</sub> para una serie de concentraciones de AA, demostrando que no**

**hay competencia entre el sustrato COX y el NO<sub>2</sub>AA (Figura 30B).**

### 5.3.2 Inhibición de mutantes de PGHS-2 en residuos críticos para la unión al hemo y la unión a AINES

A pesar de la gran similitud estructural entre el inhibidor y el sustrato natural de la enzima, los resultados en las Figuras 29 y 30 indican que la interacción se establece en una región de la proteína diferente al sitio COX. Además, la caracterización cinética se adapta mejor a un inhibidor de unión fuerte pero no covalente, y la alteración en el grupo hemo de aPGHS y hPGHS hace pensar en el sitio activo POX como posible blanco de NO<sub>2</sub>AA. Con el fin de aclarar estos aspectos, y en el marco de una pasantía en el laboratorio del Dr. L.J. Marnett en la Universidad de Vanderbilt, EEUU, expresamos y purificamos PGHS-2 nativa y mutada en residuos puntualmente involucrados en la unión a AINES, la estabilidad del grupo hemo, y la actividad enzimática. Los mutantes fueron generados en un sistema eucariota de insecto/baculovirus que permitió la obtención de enzima con un índice de rendimiento y pureza variable (muy alto para la enzima nativa y las mutantes en el sitio COX, y menor a bajo para las mutantes en el sitio POX). La actividad enzimática se determinó por el ensayo descrito antes de LC MS/MS siguiendo la formación de PGE<sub>2</sub>, y la



**Figura 30. Unión de NO<sub>2</sub>AA al sitio activo COX. (A)** Realizamos un ensayo farmacológico de saturación del sitio COX, preincubando PGHS con indometacina (200 µM) para bloquear la entrada al sitio. Cuando el ensayo se realizó en presencia de NO<sub>2</sub>AA se observó una inhibición de PGHS independientemente de que el sitio COX se encuentre bloqueado. Los datos corresponden al promedio ± S.D., *n*=3, de experimentos triplicados. \* *p* < 0.05 respecto a la condición con indometacina sin NO<sub>2</sub>AA. **(B)** Ensayo de competencia cinética donde evaluamos la actividad COX (por oximetría) en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor, a una concentración fija de AA. El resultado, representativo de 3 experimentos, muestra que el AA y el NO<sub>2</sub>AA no compiten por el sitio COX.

actividad POX se determinó por el ensayo del TMPD. Para las mutantes que mostraron una actividad residual se ajustaron las condiciones de reacción (mayor concentración de enzima y/o sustrato, mayor tiempo de reacción, etc) para obtener una actividad de al menos 10% con respecto a la enzima nativa (para la mutante en H388 no pudo detectarse actividad POX por el ensayo del TMPD) (Tabla 4). Luego evaluamos el efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre las actividad total y POX de las mutantes generadas; en cada caso la inhibición se expresa como porcentaje, considerando el 100% como la actividad de cada una de las enzimas en ausencia del inhibidor (no respecto a la proteína nativa).



### 5.3.2.1 Mutantes en el sitio de unión a AINES (COX)

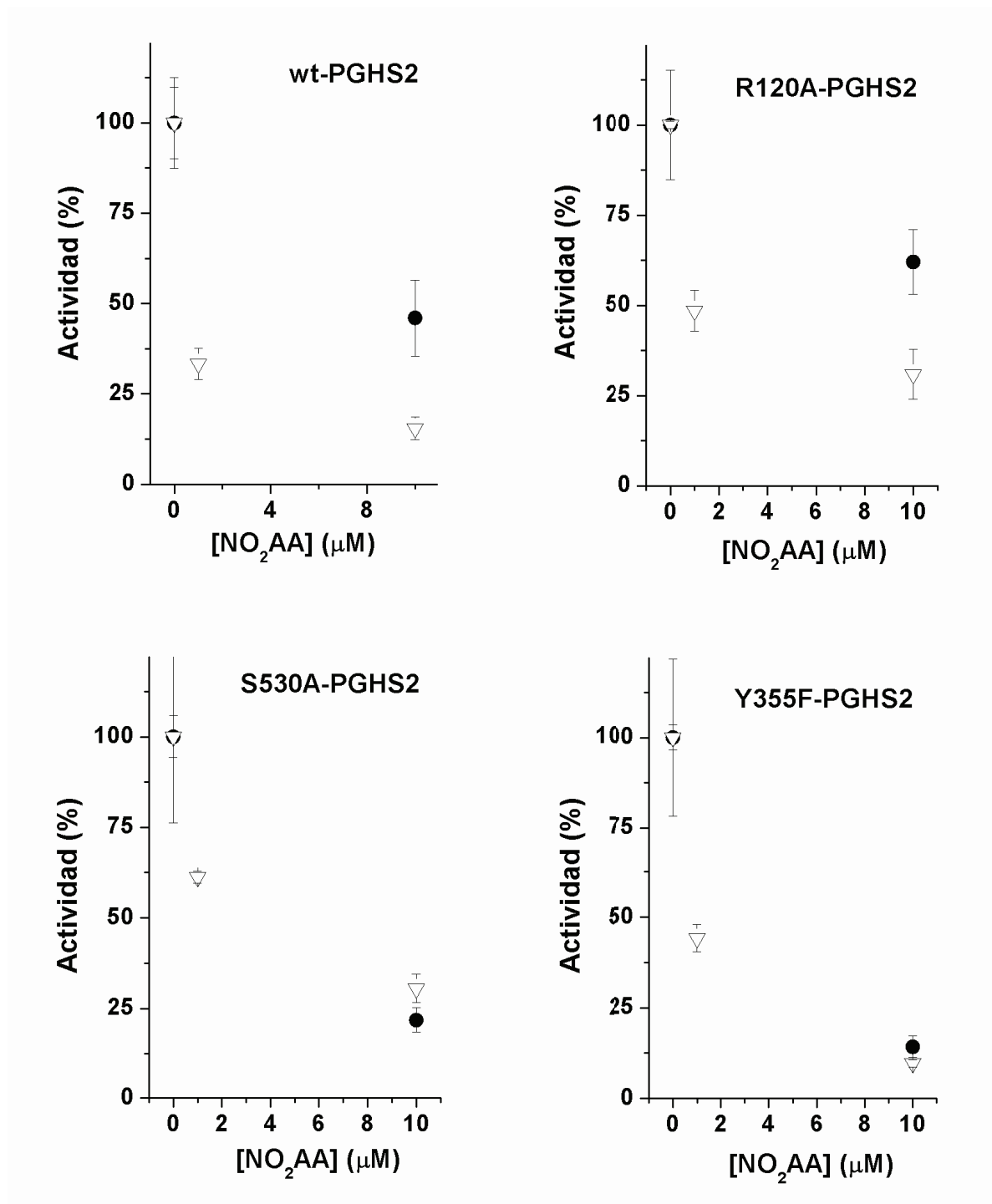
El sitio activo COX yace opuesto al hemo desde el sitio POX, en el extremo de un canal hidrofóbico con forma de “L” que atraviesa la proteína desde el dominio de unión a membrana hacia el dominio catalítico. La boca de este canal consiste en el “lobby”, que cuenta con un gran volumen y se estrecha gradualmente hacia un anillo responsable del paso de sustratos [98]. R120 y Y355 constituyen el anillo y la mayoría de las drogas descritas son efectivas únicamente cuando estos residuos están intactos [98]. El residuo de S530 está involucrado en la orientación invertida que algunas drogas como el diclofenac adoptan en su sitio de unión, y es el blanco para la acetilación por AAS, único inhibidor covalente descrito para PGHS [140]. Los residuos S530, R120 y Y355 no son críticos para la unión de AA ni para la actividad enzimática [159], y en congruencia las actividades específicas de estas mutantes fueron comparables a la de la enzima nativa, mientras que algunas mutantes mostraron una modesta reducción en la actividad POX, indicando que las mutaciones introducidas no provocaron perturbaciones estructurales o funcionales importantes (Tabla 4). ***El NO<sub>2</sub>AA inhibió la actividad de las mutantes en el sitio COX con una potencia y un grado de inhibición comparables a la wt-PGHS-2 (nativa) (75 a 85% inhibición) (Figura 31), demostrando que, a diferencia de las drogas previamente reportadas por la literatura, el mecanismo de inhibición de NO<sub>2</sub>AA no involucra al sitio COX de PGHS.***

Tabla 4. Actividad específica en mutantes de PGHS-2

	ACTIVIDAD ESPECÍFICA	
	POX ( $\mu\text{mol TMPDox}/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}$ )	COX ( $\text{nmol PGE}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}$ )
wt-PGHS2	31.3	400
H207A-PGHS2	1.4	26
H386A-PGHS2	7.0	343
H388F-PGHS2	no detectable	72
S530A-PGHS2	10.3	360
Y355F-PGHS2	9.9	340
R120A-PGHS2	20.9	257

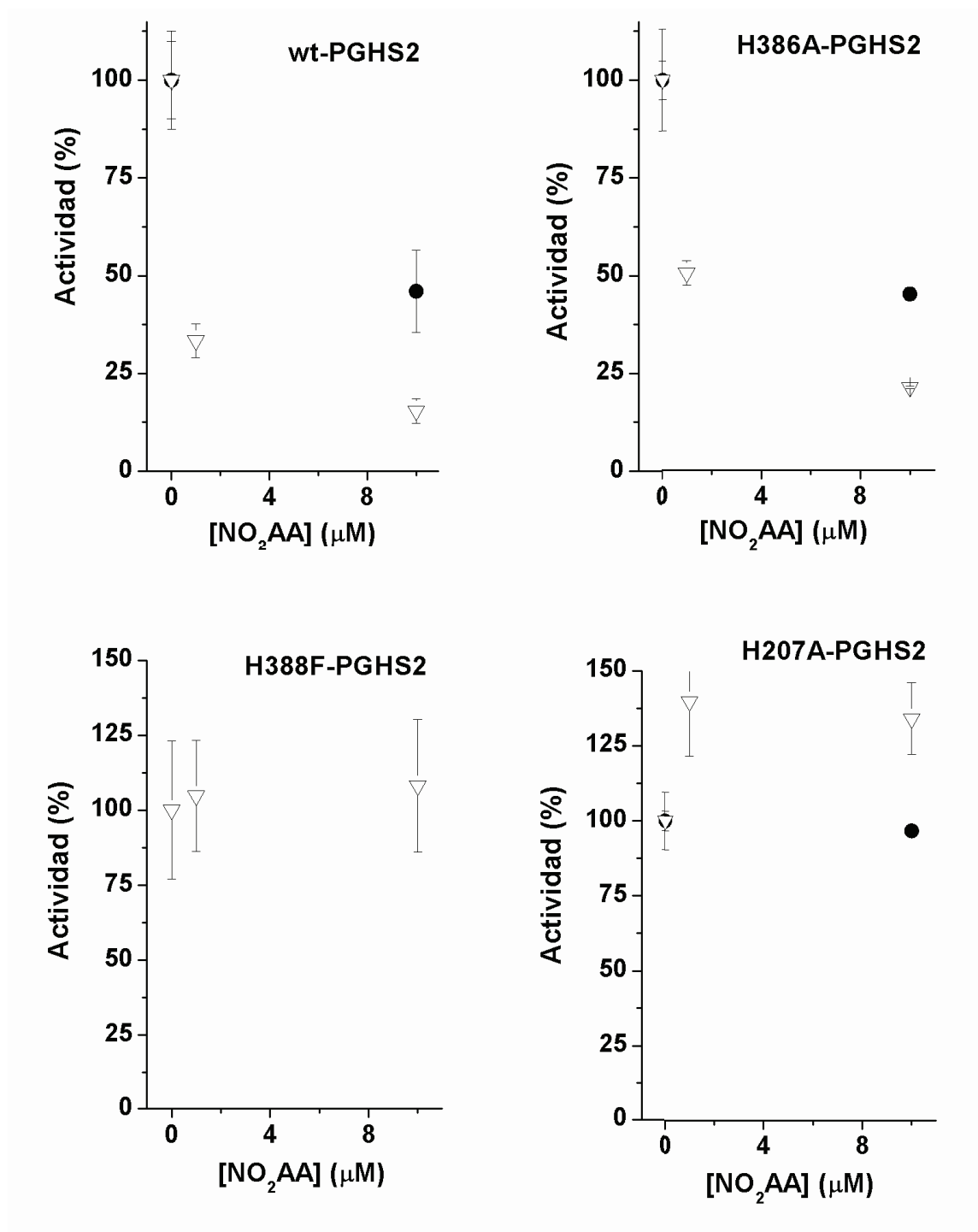
### 5.3.2.2 Mutantes en el sitio de unión del hemo (POX)

El sitio activo POX yace en la base de una pequeña hendidura en el dominio catalítico, con una porción considerable del hemo expuesta al solvente [98]. Tal como se describió antes, los residuos H386, H388 e H207 son críticos para la para la estabilidad de la unión del hemo [187-189], por lo cual su modificación afectó la actividad enzimática drásticamente (Tabla 4). El análisis espectrofotométrico de las mutantes mostró diferencias



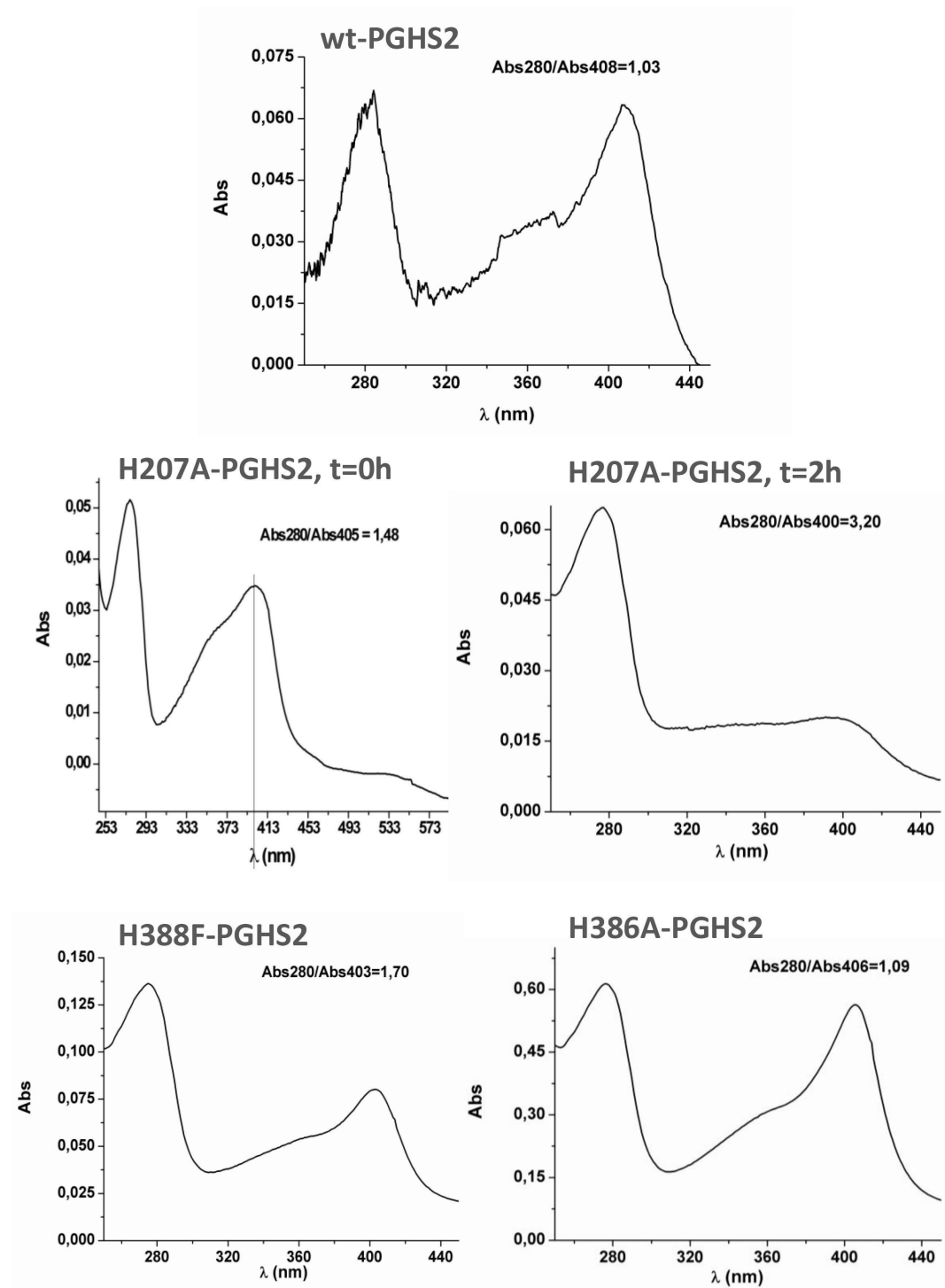
**Figura 31. Rol del sitio activo COX en la inhibición de PGHS-2 por NO<sub>2</sub>AA.** PGHS-2 nativa o las mutantes en Arg120, Ser530, y Tyr355 se preincubaron por 1 minuto con NO<sub>2</sub>AA y determinamos la actividad POX (●) y COX (Δ). NO<sub>2</sub>AA conservó su capacidad inhibitoria. Los datos corresponden al promedio ± S.E., n=3, de experimentos por triplicado.





**Figura 33. Rol del sitio activo POX en la inhibición de PGHS-2 por NO<sub>2</sub>AA.** PGHS-2 nativa o las mutantes en His386, His388, y His207 se preincubaron por 1 minuto con NO<sub>2</sub>AA y determinamos la actividad POX (●) y COX (Δ). NO<sub>2</sub>AA conservó la capacidad inhibitoria de ambas actividades para la mutante en H386, pero perdió su efecto cuando los residuos de His388 o His207 fueron mutados. NO<sub>2</sub>AA conservó su capacidad inhibitoria. Los datos corresponden al promedio ± S.E., n=3, de experimentos por triplicado.

en la región de la banda de Soret (Figura 32). En particular, la mutación de la H207 condujo a una unión muy pobre del hemo con un desplazamiento de la banda de Soret hacia el azul



**Figura 32. Espectros UV-vis de las mutantes en el sitio POX de PGHS-2.** El análisis espectrofotométrico de las mutantes en el sitio POX mostró alteraciones de la banda de Soret. La interacción de hemo con la mutante en H207 fue particularmente inestable, por lo cual esta mutante se utilizó inmediatamente después de ser reconstituída.

desde 411 a 405 nm. Además, la eficiencia de unión se redujo un 50% respecto a wt-PGHS-2. A las 2 horas desapareció la banda de Soret acompañado de una pérdida total de la actividad, por lo cual todos los ensayos cinéticos realizados con esta mutante se llevaron a cabo en la hora siguiente a su reconstitución con hemo. El NO<sub>2</sub>AA no afectó la actividad POX ni la actividad total de H207A-PGHS-2 y H388F-PGHS-2, e inhibió a H386A-PGHS-2 de manera comparable a la enzima nativa (Figura 33). Este resultado mostró que los residuos H388 e H207 son necesarios para que el NO<sub>2</sub>AA interactúe con PGHS. Cuando estudiamos la capacidad de NO<sub>2</sub>AA de desplazar el grupo hemo en las mutantes en H386 e H388 observamos una disminución en el contenido de hemo en H386A-PGHS-2 de manera comparable a la proteína nativa; sin embargo no se observaron efectos significativos sobre la mutante H388F-PGHS-2 (Tabla 5). No pudimos evaluar el desplazamiento de hemo en H207A-PGHS-2 debido a la inestabilidad en la unión del hemo explicada anteriormente.

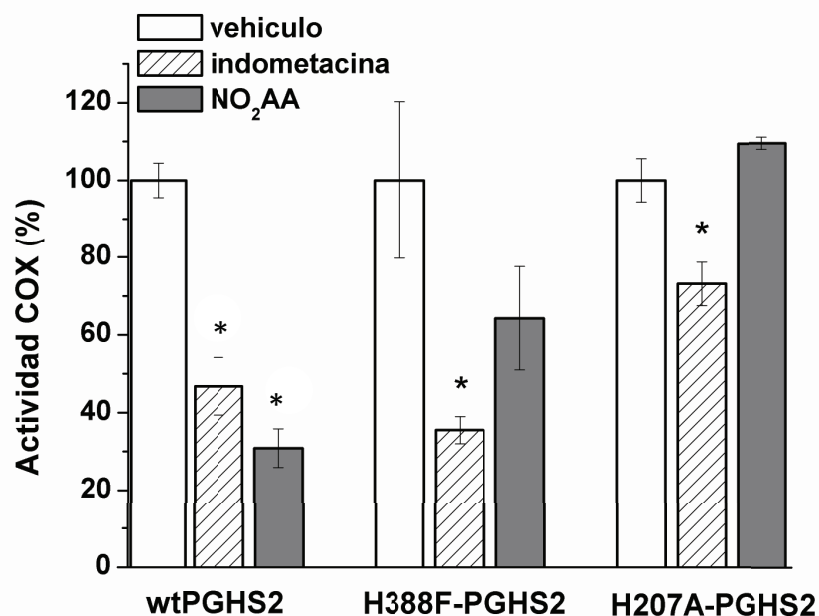
holoPGHS2 + vehículo/NO<sub>2</sub>AA (10X), 1h  
↓  
espectro UV-vis

	Abs <sub>280</sub> /Abs <sub>HEM</sub>	
	+ vehículo	+ NO <sub>2</sub> AA
<b>wtPGHS2</b>	1.05	2.3 (x2)
<b>H386A-PGHS2</b>	1.60	3.00 (x2)
<b>H388F-PGHS2</b>	1.70	1.67 (x1)

**Tabla 5. Desplazamiento del hemo por NO<sub>2</sub>AA en las mutantes de PGHS-2.** PGHS-2 se incubó por 1h a T amb con NO<sub>2</sub>AA (10X), se filtró para eliminar el exceso de hemo e inhibidor, y se registraron espectros UV-vis para determinar el desplazamiento inducido del hemo (Abs<sub>280</sub>/Abs<sub>411</sub>). Las mutantes en His386 e His388 unen el hemo con menor eficiencia comparado a la enzima wild type (wt). El tratamiento con NO<sub>2</sub>AA disminuye el contenido de hemo en wtPGHS-2 y H386A-PGHS-2, pero no tiene efectos sobre el contenido de hemo en H388F-PGHS-2.

(Figura 34).

En los mutantes de PGHS-2 donde el NO<sub>2</sub>AA perdió su capacidad inhibitoria normal, era importante realizar un control de inhibición positiva, para descartar un resultado artefactual debido a que la actividad disminuida de las mutantes brinda un margen menor para observar cambios. Utilizamos indometacina, cuya unión a PGHS es independiente de los residuos H386 e H207. La indometacina y el NO<sub>2</sub>AA inhibieron la actividad de wt-PGHS-2 como se esperaba. **El NO<sub>2</sub>AA no inhibió a las mutantes en H386 o H207, pero ambas mutantes fueron inhibibles por indometacina, confirmando que H386 e H207 están involucradas en la unión de NO<sub>2</sub>AA a PGHS**

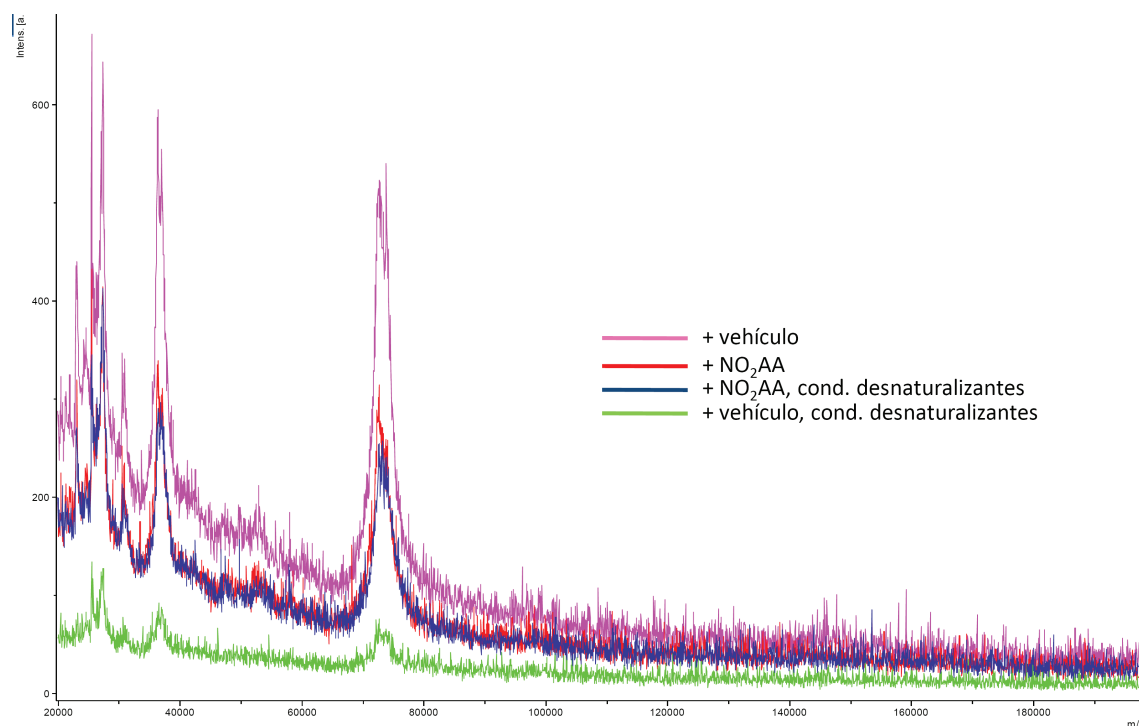


**Figura 34. Control positivo de inhibición.** Las mutantes en los residuos críticos His388 y His207 fueron no inhibibles por NO<sub>2</sub>AA, y era necesario realizar un control positivo de inhibición. Indometacina inhibió a la enzima wt y a las mutantes, mientras que NO<sub>2</sub>AA inhibió únicamente a la enzima wt (o nativa). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  S.D.,  $n=3$ , de experimentos por duplicado. \*  $p < 0.05$  respecto al control con vehículo para cada grupo.

### 5.3.3 Análisis proteómico

En el marco de la pasantía en el laboratorio del Dr. L.J. Marnett, realizamos estudios proteómicos de PGHS-2 entera y proteolizada para detectar posibles aductos de Michael con el NO<sub>2</sub>AA. Debido a que la proteína es muy grande, inestable, tiene un dominio hidrofóbico de anclaje a membrana, y además posee varios puntos de glicosilación (al menos cuatro) [98, 191], el análisis por MS de PGHS es un área casi inabordable en la literatura. Por esta razón evaluamos diferentes técnicas espectroscópicas (MALDI-TOF, ESI MS), sometiendo a las muestras a varias condiciones experimentales (condiciones desnaturizantes, variedad de proteasas, elección de columnas HPLC, etc).

El análisis MALDI-TOF de PGHS-2 dio la señal esperada a 73 kDa, que permaneció igual cuando apo o holo-PGHS-2 fueron pretratadas con el nitroalqueno, en condiciones nativas o desnaturizantes (Figura 35). El NO<sub>2</sub>AA es una molécula pequeña y no conocemos la estequiometría de la reacción, pero una modificación covalente de PGHS-2 induciría al menos un “tailing” o asimetría en la señal observada, lo cual no se aprecia. Si bien existe la posibilidad de que la nitroalquilación se rompa durante la ionización de la muestra, aductos



**Figura 35. Análisis MALDI-TOF de PGHS-2 tratada con NO<sub>2</sub>AA.** aPGHS o hPGHS se preincubó con NO<sub>2</sub>AA (10x) por varias horas en condiciones nativas o desnaturalizantes. El amortiguador se intercambió por 0.1% TFA / 10% acetonitrilo previo al análisis MALDI-TOF. Obtuvimos una señal a 73 kDa para PGHS-2 que permaneció igual en presencia de NO<sub>2</sub>AA.

de proteínas con nitroalquenos han sido identificados por MS en numerosas ocasiones sin necesidad de estabilizar el complejo.

A continuación, realizamos proteólisis en solución (con tripsina o quimotripsina) de apo y holo-PGHS-2 preincubada con NO<sub>2</sub>AA. Los péptidos obtenidos se separaron por HPLC y se analizaron por ESI MS/MS. Consideramos a todas las histidinas críticas para la actividad enzimática como potenciales blancos de nitroalquilación por el NO<sub>2</sub>AA. Utilizando una columna C18 no observamos péptidos con una masa agregada correspondiente a la del nitroalqueno. La modificación covalente de péptidos por nitroalquenos resulta en un aumento muy grande de la hidrofobicidad [67], por lo cual también corrimos las muestras utilizando una columna de menor retención (C4), con el mismo resultado. Finalmente, considerando que una modificación covalente por NO<sub>2</sub>AA podría dificultar la ionización por ESI de las especies, realizamos el estudio de los péptidos por MALDI-TOF, y tampoco detectamos aductos covalentes entre los péptidos y el nitroalqueno.

### 5.3.4 Docking molecular

Los resultados de MS acompañaron la evidencia de una interacción no covalente, pero la demostración de una interacción no covalente es mucho más difícil de confirmar que una interacción covalente, y no podemos descartar que la ausencia de un aducto por MS se deba a un problema experimental. Para confirmar la naturaleza no covalente de la interacción de NO<sub>2</sub>AA con PGHS, realizamos estudios de docking molecular en colaboración con el Laboratorio de Química Teórica y

	COX	POX
	Kd (M)	
AA	4.68x10 <sup>-10</sup>	---
9-NO <sub>2</sub> AA	1.58x10 <sup>-8</sup>	5.37x10 <sup>-9</sup>
12-NO <sub>2</sub> AA	3.31x10 <sup>-9</sup>	3.72x10 <sup>-8</sup>
14-NO <sub>2</sub> AA	3.31x10 <sup>-9</sup>	6.31x10 <sup>-8</sup>
15-NO <sub>2</sub> AA	1.91x10 <sup>-9</sup>	1.45x10 <sup>-9</sup>
Hemo	---	2.19x10 <sup>-3</sup>

Tabla 6. Valores teóricos de Kd para la interacción de PGHS-2 con AA, hemo, y algunos de los principales isómeros posicionales de NO<sub>2</sub>AA.

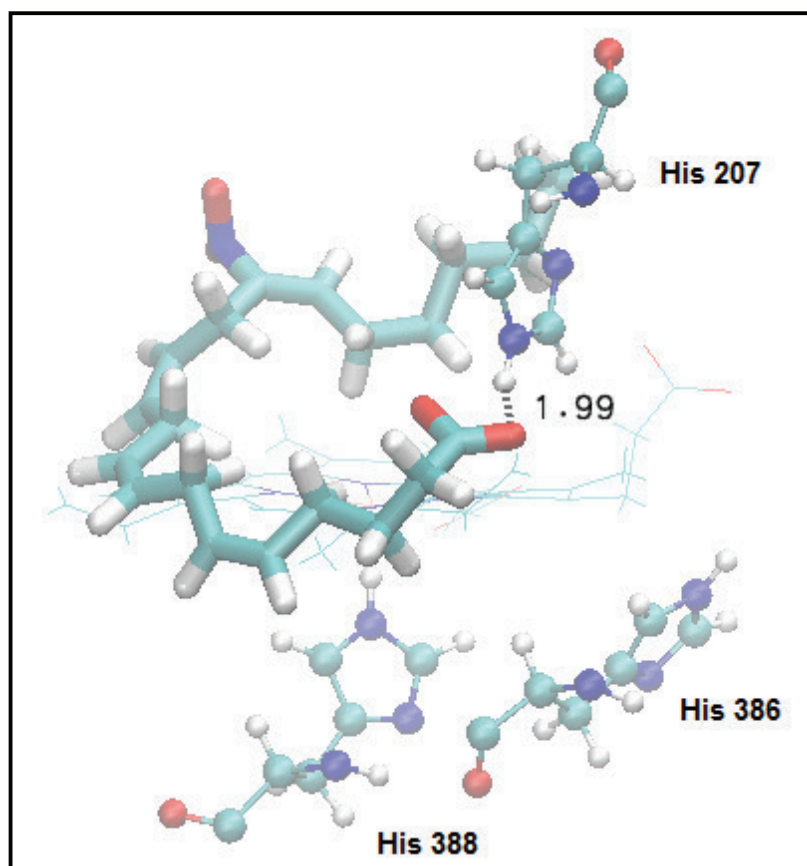


Figura 36. Docking molecular de NO<sub>2</sub>AA al sitio POX de PGHS-2. Se muestra el docking de 14-NO<sub>2</sub>AA al sitio activo POX de modo productivo aunque no covalente, donde el átomo Nε<sub>2</sub> de His207 establece un enlace de hidrógeno con el grupo carboxilo de NO<sub>2</sub>AA. El docking muestra que la orientación que adopta NO<sub>2</sub>AA puede alterar la coordinación del hemo con su ligando proximal, His388.

Computacional de la Facultad de Ciencias. Las constantes de equilibrio ( $K_d$ ) determinadas por la Dra. Alicia Merlino para la unión de los isómeros posicionales de NO<sub>2</sub>AA a los sitios COX y POX en PGHS confirmaron los resultados experimentales, validando el método: el NO<sub>2</sub>AA se une al sitio activo COX con una baja eficiencia (comparar con AA) (Tabla 6) y de una manera no productiva, mientras que la unión al sitio activo POX es altamente favorable (comparar con el hemo) (Tabla 6). En el docking molecular el NO<sub>2</sub>AA interactuó favorablemente con la H207 mediante enlace de hidrógeno entre el grupo carboxílico del nitroalqueno y el hidrógeno Nε2 de la cadena lateral de H207 (Figura 36).

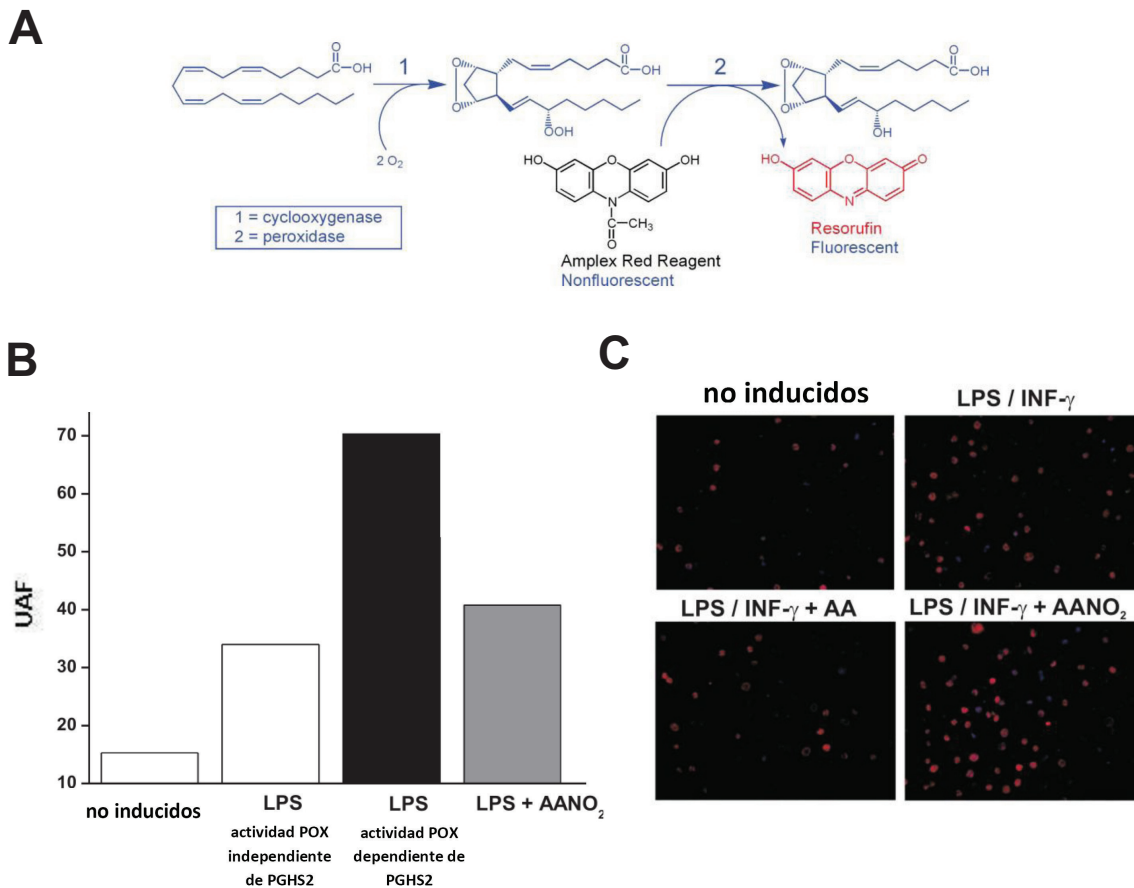
## 5.4 Modelos celulares para estudiar la inhibición de PGHS por NO<sub>2</sub>AA

Nuestro trabajo *in vitro* en conjunto con los resultados computacionales mostró que el NO<sub>2</sub>AA es un inhibidor muy potente y virtualmente irreversible de PGHS-1 y 2, que actúa por un mecanismo que no ha sido antes descrito para ningún inhibidor PGHS, y que el NO<sub>2</sub>AA no sigue el mecanismo de acción clásico de los nitroalquenos (la nitroalquilación). Trasladamos estos resultados a modelos celulares de relevancia biológica como un primer paso en la determinación de la relevancia biológica de esta inhibición atípica de PGHS por NO<sub>2</sub>AA. Si bien PGHS se expresa en todas las células, existen tipos celulares con un metabolismo del AA particularmente activo. Es el caso de las plaquetas o los macrófagos [149, 173, 192].

### 5.4.1 Efecto de NO<sub>2</sub>AA en la actividad de macrófagos murinos

La activación de macrófagos tiene un papel clave en la respuesta inmunológica y también en la regulación de los procesos inflamatorios. El NO<sub>2</sub>AA tiene efectos anti-inflamatorios en macrófagos murinos, donde inhibe la expresión de NOS2 y el ensamblaje de NOX2 (por tanto la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), además de activar la vía Nrf2/ARE que induce la expresión de enzimas antioxidantes de fase II [27, 87]. La activación de macrófagos con LPS promueve la inducción en la expresión de PGHS-2 y la síntesis de PGE<sub>2</sub> a partir de AA, que actúa como un agonista de la activación [193-196].

Evaluamos el efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad PGHS-2 de macrófagos murinos estimulados por 16 o 20 hs con LPS. Para determinar la actividad realizamos el ensayo de Amplex Red [176], que acopla la oxidación de AA catalizada por PGHS-2 a la reducción de Amplex Red a resorufina cuantificable por fluorescencia ( $\lambda_{ex}$ =560nm,  $\lambda_{em}$ =585nm) (Figura 37A). Realizamos las determinaciones fluorimétricas en el lisado total de los macrófagos, pero en presencia de AA exógeno, para determinar la reducción a resorufina exclusivamente dependiente de peroxidasas que utilizan AA como sustrato (principalmente PGHS-2 en macrófagos) [176, 197]. El NO<sub>2</sub>AA inhibió la actividad PGHS-2 en macrófagos



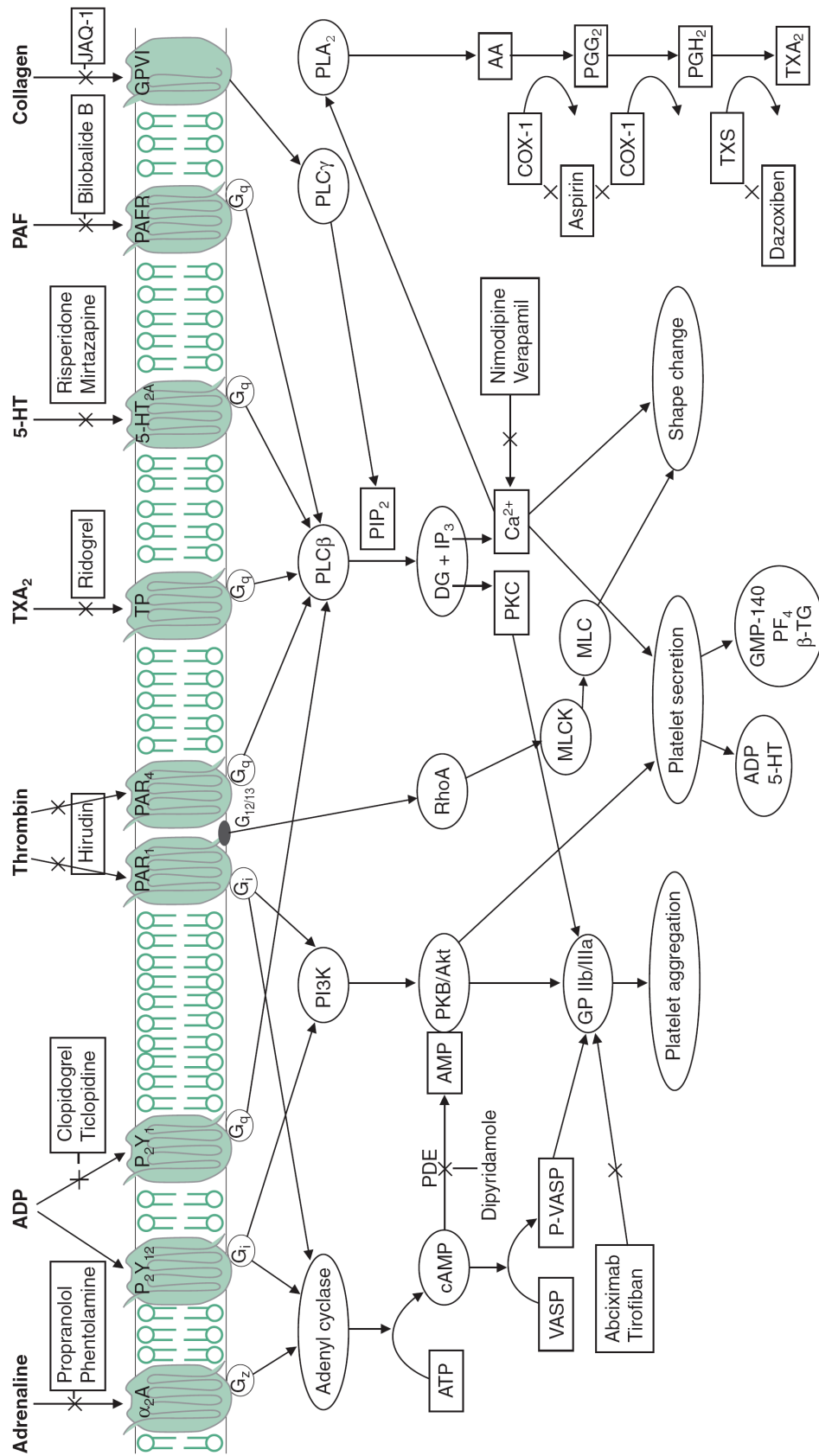
**Figura 37. Inhibición de PGHS-2 en macrófagos.** (A) Estudiamos la actividad de PGHS2 en lisados de macrófagos por el método de amplex red [Batchelor *et al.*, 2003, Presented at *The Society for Biomolecular Screening*: Portland, Oregon– September 21-25], que acopla la reducción de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> a la oxidación de amplex red al fluoróforo resorufina ( $\lambda_{ex}=560\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=585\text{nm}$ ). El ensayo se realiza en presencia de AA exógeno para determinar la actividad peroxidasa dependiente de AA (fundamentalmente PGHS-2 en macrófagos). Los datos corresponden al promedio de experimentos por duplicado,  $n=3$ . (B) Macrófagos murinos ( $1 \times 10^6$ ) fueron activados con LPS (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para inducir la expresión de PGHS-2, en presencia de vehículo o NO<sub>2</sub>AA (5  $\mu\text{M}$ ). A las 16 hs lisamos las células y determinamos la actividad POX dependiente de AA por el ensayo de amplex red. La actividad PGHS-2 fue inhibida en presencia de NO<sub>2</sub>AA. (C) NO<sub>2</sub>AA no disminuyó la expresión de PGHS-2 en los macrófagos estimulados con LPS. (rojo: PGHS-2; azul: DAPI).

estimulados con LPS (Figura 37B). Demostramos por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo anti-PGHS-2 (en rojo, figura 37C) que no hay efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre el nivel de expresión de la enzima.

#### 5.4.2 Efecto de NO<sub>2</sub>AA en la actividad de plaquetas humanas

Las plaquetas humanas son anucleadas y cuentan con un tamaño considerablemente menor comparadas al resto de las células; la regulación de su metabolismo es altamente compleja (figura 38). La membrana plaquetaria tiene una composición lipídica relativamente sencilla, donde el AA representa el principal ácido graso esterificado a la posición sn2 de fosfolípidos [94]. Las plaquetas son un blanco farmacológico fundamental





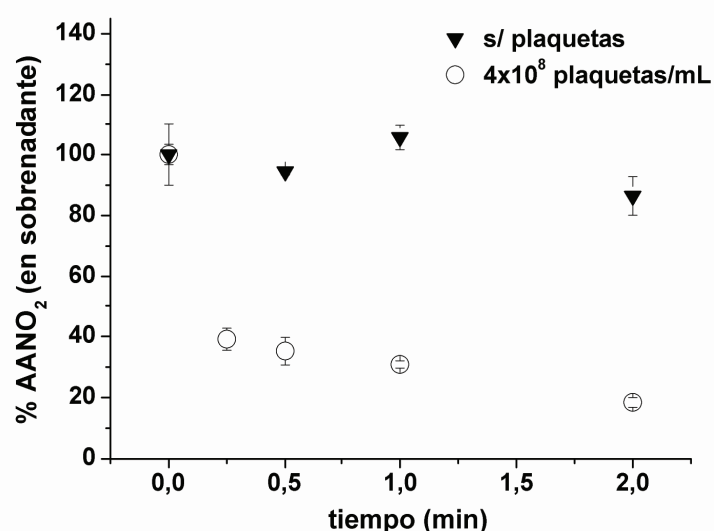
**Figura 38. Vías de señalización involucradas en la activación plaquetaria.** Las plaquetas se activan por señales transmembrana que se originan de la interacción de diferentes agonistas con receptores de membrana específicos. La compleja cascada de señalización converge en el aumento de la concentración intracelular de calcio, la degradación, y el cambio morfológico asociados a la activación plaquetaria. Existen cuatro posibles blancos farmacológicos para las drogas anti-plaquetarias: la inhibición de la síntesis de agonista, de los receptores de membrana, de las proteínas G, o de las cascadas enzimáticas.

(Figura extraída de Xiang *et al.*, Drugs, 2008, Vol. 68)

para los AINES, como ya se discutió en la introducción (ver 2.3.4). Podemos especular que una regulación *in vivo* de la actividad plaquetaria por NO<sub>2</sub>AA podría brindar efectos protectores en el desarrollo de patologías asociadas a la formación de trombos, y que la protección sería biológicamente relevante si no altera la hemostasia primaria que evita la pérdida de sangre excesiva tras una injuria [149, 198]. Estas son básicamente las características deseadas en los nuevos agentes anti-plaquetarios.

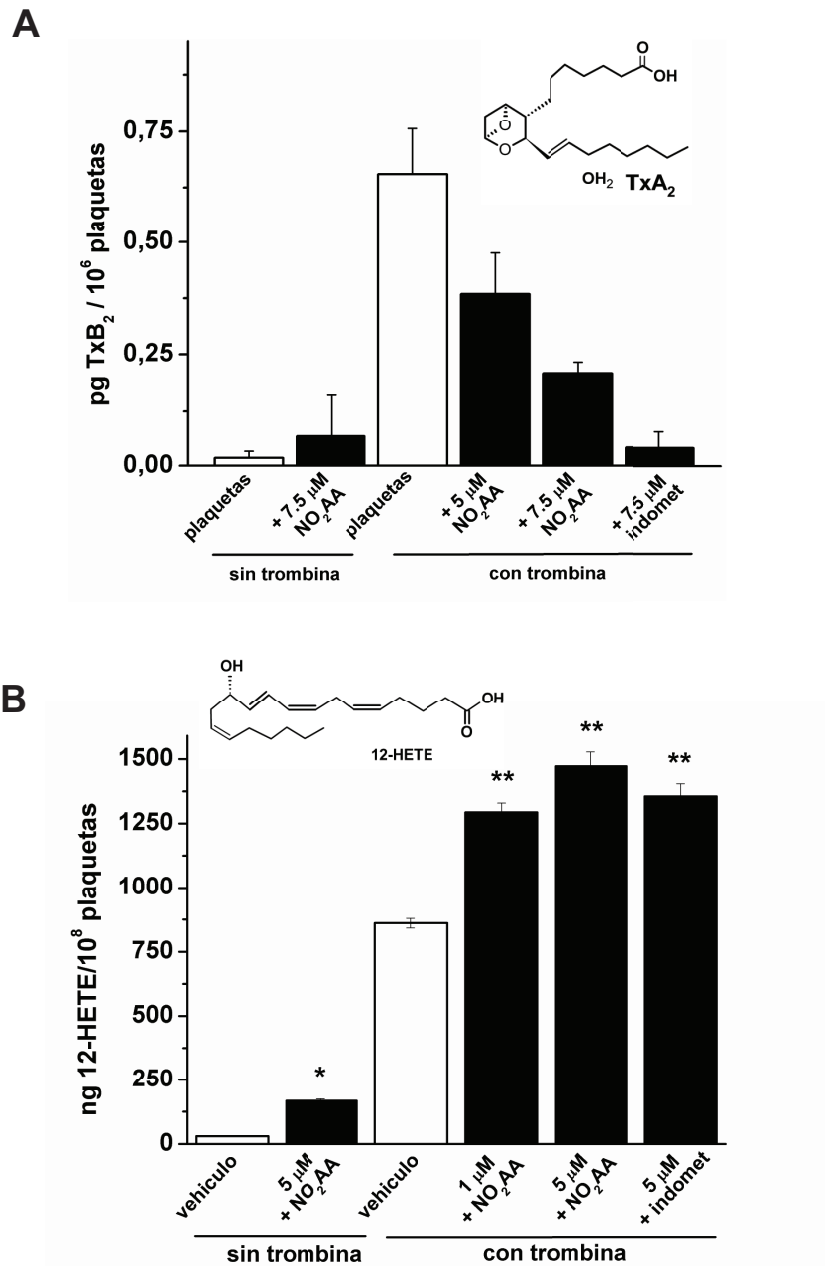
#### 5.4.2.1 Formación de productos derivados de AA durante la activación plaquetaria

En primer lugar se evaluó por MS la capacidad del nitroalqueno de incorporarse a las plaquetas. ***El NO<sub>2</sub>AA agregado a una suspensión de plaquetas en solución Tyrodes a 37°C ingresó rápidamente y con una alta eficiencia, como se observa en la figura 39.***



**Figura 39. Incorporación de NO<sub>2</sub>AA a plaquetas humanas.** Preincubamos plaquetas lavadas (4x10<sup>8</sup>/mL) con NO<sub>2</sub>AA (300 pmol) en solución Tyrode's a 37 °C bajo agitación suave. A los 2 min separamos el sobrenadante por centrifugación y realizamos una extracción orgánica con acetato de etilo para cuantificar por LC-MS/MS la cantidad de NO<sub>2</sub>AA presente, como se explica en la sección metodológica. El 80% del NO<sub>2</sub>AA presente inicialmente ingresó a las plaquetas luego de 2 min de preincubación. Los datos corresponden al promedio ± S.E., n=3, de experimentos triplicados, utilizando plaquetas de diferentes donantes.

Tras la activación plaquetaria inducida por agonista, la PLA<sub>2</sub> cataliza la liberación de AA desde los fosfolípidos de membrana en un proceso dependiente de Ca<sup>2+</sup> [199]. El AA liberado al citosol puede seguir dos vías: *i)* la vía PGHS-1 para sintetizar el agonista proagregante TxA<sub>2</sub>, o *ii)* la vía 12-LOX para sintetizar 12-HpETE y 12-HETE, con funciones aún desconocidas en las plaquetas [200-203]. La activación de plaquetas por trombina (0.05 U/mL) genera un aumento de la síntesis de TxB<sub>2</sub> (producto de decaimiento estable del TxA<sub>2</sub>) (Figura 40A). ***En presencia de NO<sub>2</sub>AA observamos en las plaquetas estimuladas con trombina una disminución dosis-dependiente en la síntesis de TxB<sub>2</sub> (Figura 40A), de***



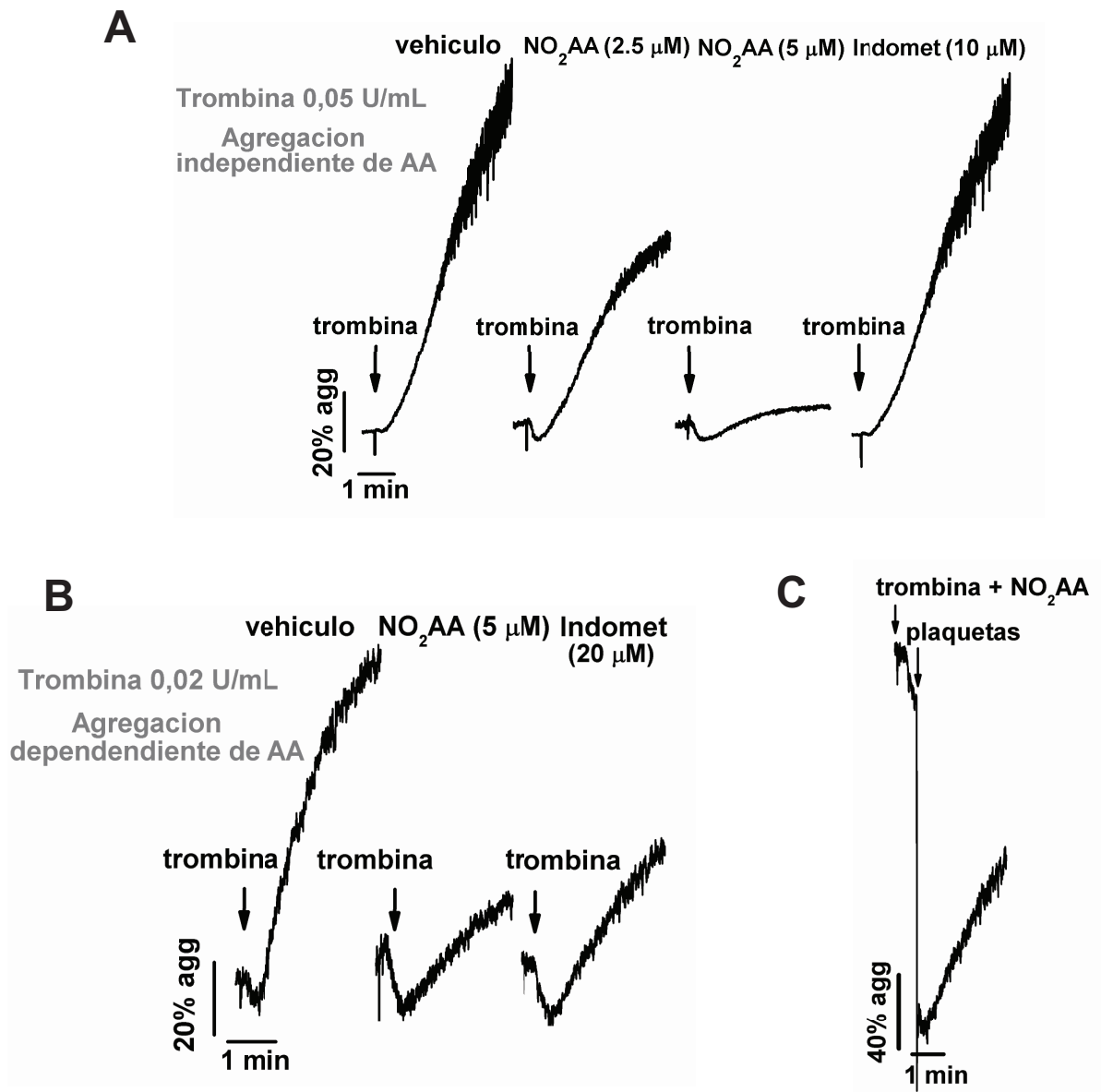
**Figura 40. Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre el metabolismo de AA en plaquetas humanas activadas.** El AA liberado al citosol durante la activación plaquetaria puede seguir la vía PGHS-1 o la vía LOX. Estudiamos por LC MS/MS el efecto de la administración de NO<sub>2</sub>AA a plaquetas humanas ( $2 \times 10^8$ /mL) en la síntesis de **(A)** TXB<sub>2</sub> (vía PGHS-1) y **(B)** 12-HETE (vía LOX) utilizando trombina (0.05 U/mL) como agonista. El NO<sub>2</sub>AA inhibió la síntesis de TxB<sub>2</sub>, en concordancia con la inhibición de PGHS-1, estimulando en paralelo la síntesis de 12-HETE. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  S.E.,  $n=3$ , de experimentos al menos triplicados, utilizando plaquetas de tres diferentes donantes. \*  $p < 0.05$  respecto a la condición sin trombina con vehículo; \*\*  $p < 0.05$  respecto a la condición con trombina y vehículo.

**acuerdo con una inhibición en la actividad PGHS-1. En paralelo, observamos un aumento en la formación de 12-HETE** (Figura 40B). La indometacina tuvo efectos similares sobre ambos metabolitos; en efecto trabajos anteriores muestran que la indometacina aumenta en plaquetas activadas los productos derivados de la vía LOX [204, 205]. Este resultado podría deberse a que la inhibición de PGHS-1 por NO<sub>2</sub>AA induce el ingreso de un flujo mayor de sustrato hacia la otra vía posible de metabolización del AA. Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que el NO<sub>2</sub>AA no tiene efectos *per se* sobre la actividad LOX (Trostchansky *et al.*, resultados no publicados), descartándolo como el mecanismo que explique los resultados obtenidos. La relevancia biológica es difícil de predecir ya que existe controversia en cuanto al rol de 12-HETE en las plaquetas: algunos autores consideran que inhibe la señal proagregante de PGH<sub>2</sub>/TxA<sub>2</sub> [206], mientras que otros consideran que disminuye la agregación en respuesta a ADP [203] y que tiene efectos protectores sobre las plaquetas [207].

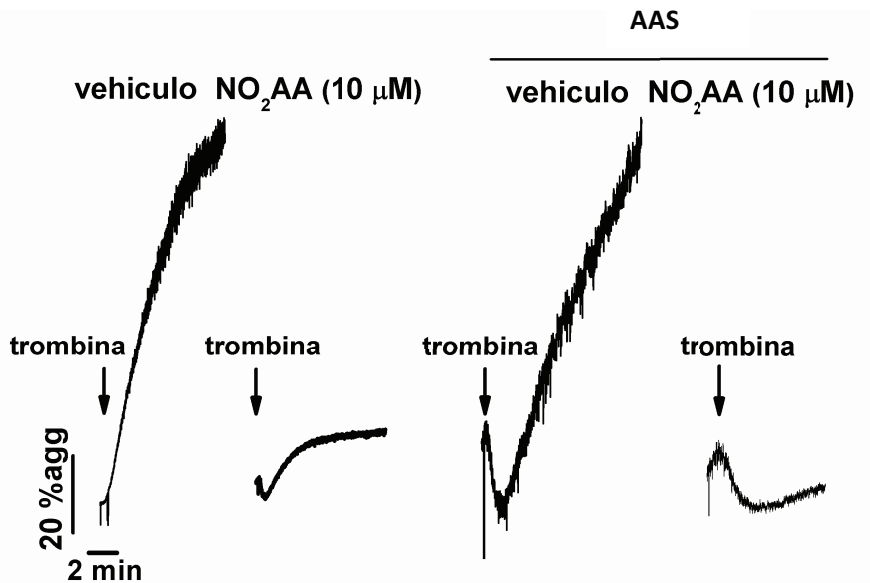
#### 5.4.2.2 Agregación plaquetaria

A continuación evaluamos los efectos de NO<sub>2</sub>AA sobre la agregación plaquetaria. Este es un proceso dinámico y complejo clave para la formación del tapón plaquetario durante la hemostasia primaria, pero también para el desarrollo de las trombosis [147]. El NO<sub>2</sub>AA causó una inhibición dosis-dependiente de la agregación plaquetaria en respuesta a trombina (Figura 41A) con una concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de 1.3 μM NO<sub>2</sub>AA. Fue llamativo que la indometacina, que agregamos al ensayo como un control positivo de inhibición, no tuvo efectos sobre la agregación (Figura 41A). Una búsqueda bibliográfica reveló que la trombina a una concentración de 0.05 U/mL activa a las plaquetas independientemente de la actividad PGHS-1 y del efecto amplificador que el TxA<sub>2</sub> ejerce sobre su receptor en membrana [208-210]. Es decir que la capacidad anti-agregante de NO<sub>2</sub>AA no puede explicarse por su inhibición de PGHS-1, sugiriendo la existencia de al menos un segundo blanco de acción. A dosis más bajas de trombina (0.02 U/mL) la actividad PGHS-1 pasa a ser relevante para la agregación, y en efecto observamos que tanto NO<sub>2</sub>AA como indometacina fueron capaces de inhibir la agregación plaquetaria (Figura 41B). Plaquetas pre-tratadas con AAS, donde PGHS-1 se encuentra inactivada, fueron igualmente sensibles a la inhibición por NO<sub>2</sub>AA (Figura 42), confirmando que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de inhibir la actividad plaquetaria por modulación de al menos un blanco adicional a PGHS-1. Por último, descartamos algún efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la trombina: no se observaron cambios significativos en el grado de inhibición de la agregación plaquetaria cuando las plaquetas fueron activadas con trombina pre-incubada con NO<sub>2</sub>AA (Figura 41C).

Existen cuatro blancos principales para las drogas anti-plaquetarias: *i*) la síntesis de agonistas (ej.: inhibidores de PGHS-1), *ii*) los receptores de membrana, *iii*) las proteínas G acopladas a los receptores, y *iv*) los intermediarios en las cascadas de señalización que



**Figura 41. Efecto de NO<sub>2</sub>AA en la agregación plaquetaria inducida por trombina.** Plaquetas lavadas ( $1 \times 10^8$ /mL) en solución Tyrode's a 37 °C bajo se incubaron bajo agitación suave con Ca<sup>2+</sup> (1 mM) y vehículo o inhibidor. La activación plaquetaria se indujo por adición de trombina a la mezcla de reacción y se registró la agregación plaquetaria por dispersión de luz a 700 nm. **(A)** El NO<sub>2</sub>AA inhibió de forma dosis-dependiente la agregación plaquetaria para trombina a 0.05 U/mL (IC<sub>50</sub> = 1.4 μM). A esta concentración de trombina la agregación es independiente de TxA<sub>2</sub> y la indometacina no tuvo efectos sobre la agregación. **(B)** A concentraciones menores de trombina (0.02 U/mL), la agregación está modulada por TxA<sub>2</sub> y ambos inhibidores de PGHS inhibieron la agregación plaquetaria. **(C)** Trombina se preincubó por 2 min con NO<sub>2</sub>AA (10 μM), y esta mezcla fue agregada a una suspensión de plaquetas ( $1 \times 10^8$ /mL) en solución Tyrode's a 37 °C. Obtuvimos el efecto anti-agregante esperado para esta concentración de NO<sub>2</sub>AA, por lo que NO<sub>2</sub>AA no inhibe la actividad de la trombina. Todos los datos son representativos de experimentos al menos triplicados utilizando plaquetas de tres diferentes donantes.



**Figura 42. Efecto anti-agregante de NO<sub>2</sub>AA independiente de la modulación de PGHS-1.** Evaluamos el efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la agregación plaquetaria en plaquetas con PGHS-1 inactivada con AAS. El NO<sub>2</sub>AA conservó su capacidad anti-agregante en las plaquetas preincubadas con AAS, confirmando la existencia de al menos un segundo blanco de acción para el NO<sub>2</sub>AA en plaquetas. Datos representativos de experimentos al menos triplicados utilizando plaquetas de tres donantes diferentes.

convergen en la activación de las plaquetas [149]. Cuando realizamos los ensayos de agregación utilizando diferentes agonistas, el NO<sub>2</sub>AA fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria en respuesta a la activación de diferentes receptores de membrana (receptores activados por proteasas -PARs- para trombina, P2Y para ADP, receptores de TxA<sub>2</sub> para AA) o por estimulación directa de PKC (utilizando forbol-12-miristato-13-acetato, PMA) (Tabla 7). ***Esto sugiere que el NO<sub>2</sub>AA actúa en pasos posteriores (downstream) a la activación de los receptores de membrana por parte de los agonistas.***

#### 5.4.2.3 Rol del <sup>•</sup>NO

El <sup>•</sup>NO es uno de los principales reguladores de la actividad plaquetaria; suprime la agregación plaquetaria activando a la guanilato ciclasa soluble (sGC), aumentando la formación de cGMP a partir de GTP [211]. En medio acuoso, el NO<sub>2</sub>AA se hidrata a ácido nitrohidroxi araquidónico (NO<sub>2</sub>(OH)AA), que se descompone liberando <sup>•</sup>NO capaz de inducir vasorelajación dependiente de GMPc [60, 70, 71]. Nuestro grupo ha demostrado previamente que el NO<sub>2</sub>AA aumenta los niveles de GMPc en células endoteliales, en un proceso inhibible por el inhibidor de la sGC, ODQ [212]. Por tanto, evaluamos la capacidad