

Figura 43. Rol de $\cdot\text{NO}$ en la capacidad anti-agregante de NO_2AA . Los nitroalquenos se descomponen en medio acuoso liberando $\cdot\text{NO}$, uno de los principales reguladores *in vivo* de la actividad plaquetaria. Evaluamos la capacidad anti-agregante de NO_2AA en presencia de oxiHb (atrapador extracelular de $\cdot\text{NO}$), carboxiPTIO (atrapador intracelular de $\cdot\text{NO}$), o ODQ (inhibidor de sGC). El NO_2AA mantuvo su efecto anti-agregante en todos los casos, demostrando que su rol es independiente de la liberación de $\cdot\text{NO}$. Los datos corresponden al promedio \pm S.E., $n=3$, de experimentos triplicados, utilizando plaquetas de tres donantes diferentes. * $p < 0.05$ respecto a la condición sin NO_2AA para cada grupo.

Tabla 7. Inhibición de la agregación de plaquetas estimuladas con diferentes agonistas.

Agonista	% inhibición por NO_2AA *
Trombina	54.6 ± 3.2
AA	11.6 ± 1.2
ADP	46.5 ± 4.8
PMA	52.9 ± 3.2

* para $[\text{NO}_2\text{AA}] = 1.5 \mu\text{M}$, 1 min preincubación

antiagregante de NO₂AA en presencia de oxihemoglobina (oxiHb) o carboxiPTIO (atrapadores de [•]NO extra- e intra-celulares, respectivamente), y de ODQ (para inhibir a la sGC). La acción anti-agregante de NO₂AA permaneció intacta en los tres casos (Fig. 43), indicando que el nitroalqueno actúa por un mecanismo independiente de [•]NO/cGMP.

5.4.2.4 Movilización de calcio y degranulación

Durante la activación plaquetaria inducida por trombina, el clivaje de los receptores PAR en la membrana señala la activación de la enzima PLC, que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) (Figura 38). El DAG permanece en la membrana plasmática y el IP₃ difunde hacia el citoplasma donde estimula la liberación de Ca²⁺ desde el sistema tubular denso [213]. Éste es un evento clave en la activación plaquetaria, y precede a otras respuestas de la cascada como la activación de las isoformas convencionales de PKC (cPKC), el cambio en la morfología, la agregación, o la degranulación [172, 214, 215]. En el año 2002 se reportó que el NO₂LA inhibe la activación plaquetaria (IC₅₀ = 4 μM) al disminuir el influjo de Ca²⁺ desde el exterior, así como su movilización desde los reservorios internos (aunque induce un leve influjo de Ca²⁺ cuando NO₂LA se administra en ausencia de agonista) [75].

Las plaquetas fueron preincubadas con un indicador de Ca²⁺ fluorescente (Fluo-3 AM) y estudiamos por citometría de flujo el efecto de la administración de NO₂AA en la movilización de Ca²⁺ de una suspensión de plaquetas tratada con trombina, en ausencia de Ca²⁺ exógeno. Cuando agregamos NO₂AA en ausencia de trombina, no tuvo efecto sobre el contenido de Ca²⁺ en citosol incluso a altas concentraciones (10 μM) (Figura 44A). Además, el NO₂AA no tuvo efecto sobre la movilización intracelular de Ca²⁺ en respuesta a trombina 0.2 a 0.5 U/mL (Figura 44A). A concentraciones menores de trombina (0.05 U/mL), el NO₂AA inhibió levemente el aumento intracelular de Ca²⁺ (25%), independientemente de la dosis agregada (datos no mostrados). ***Dado que las propiedades anti-agregantes de NO₂AA descritas más arriba fueron observadas en un marco experimental donde siempre agregamos Ca²⁺ exógeno (el Ca²⁺ no era limitante), concluimos que las propiedades anti-agregantes de NO₂AA no se deben a una inhibición en la movilización de Ca²⁺.***

Algunas de las consecuencias downstream a la activación de cPKC son la degranulación, la activación de la integrina α_{IIb}β₃, y la agregación plaquetaria [216]. La exposición de la molécula de adhesión P-selectina en la cara externa de la membrana plaquetaria es consecuencia de la secreción de gránulos alfa (α) y se utiliza como un indicador universal de degranulación [217]. El NO₂AA inhibió la secreción de gránulos α de

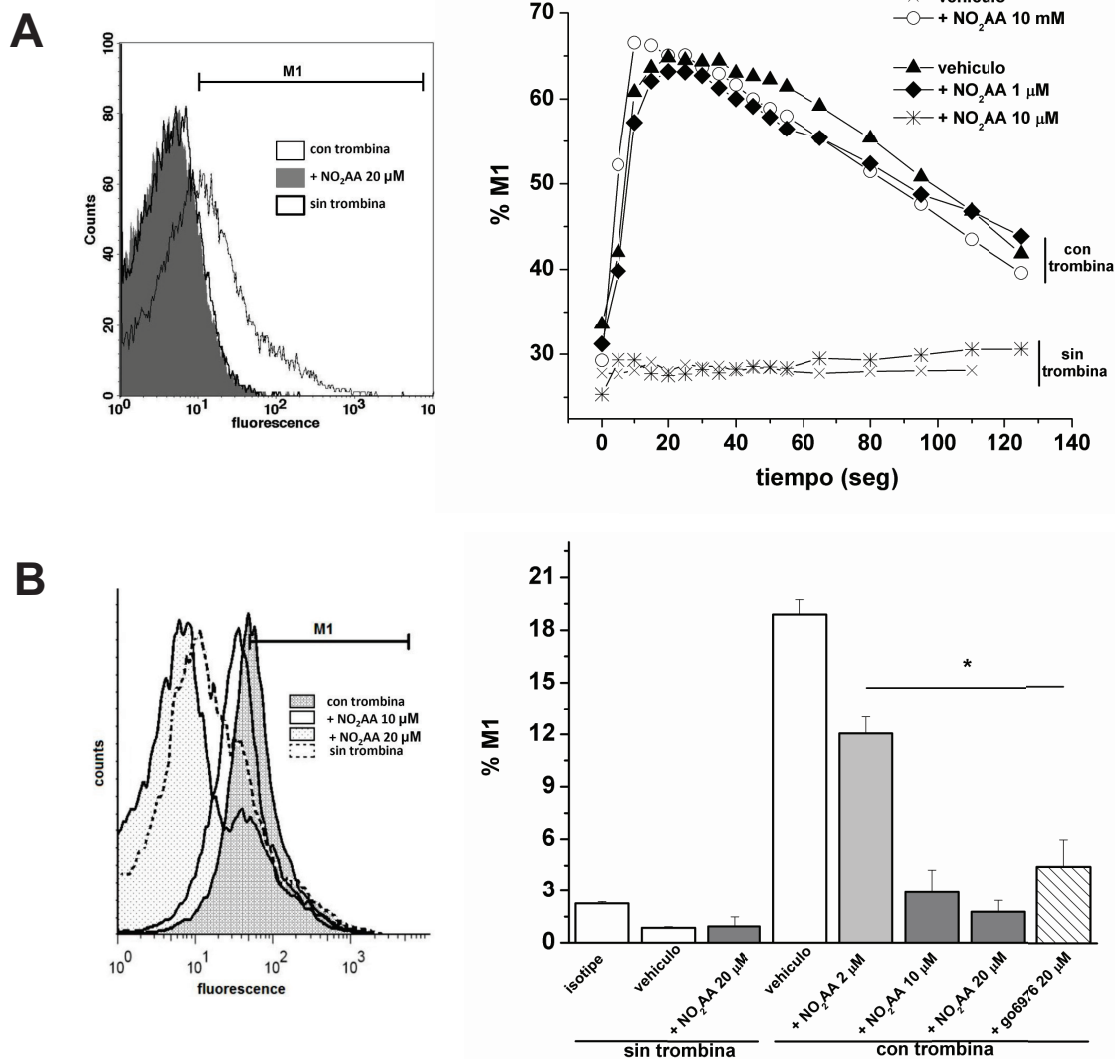


Figura 44. Efecto de NO₂AA sobre la degranulación y la movilización de Ca²⁺ durante la activación plaquetaria. (A) Plaquetas (1x10⁸ /mL) cargadas con el indicador fluorescente de Ca²⁺ Fluo-3/AM (3 μM) fueron preincubadas con vehículo o NO₂AA (1-10 μM) y estimuladas con trombina (0.5 U/mL). La liberación de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares fue monitoreada por citometría de flujo siguiendo los cambios en la fluorescencia de Fluo-3/AM (población definida M1, en el histograma representativo) durante dos minutos. El NO₂AA no tuvo efectos sobre la liberación de Ca²⁺ durante la activación plaquetaria a 0.05 U/mL trombina. Datos representativos de experimentos realizados al menos por triplicado, *n*=3. **(B)** Para evaluar la degranulación estudiamos la exposición de P-selectina (liberada por gránulos-α) por citometría de flujo. Plaquetas (1x10⁶ /mL) en solución Tyrode's a 37 °C fueron tratadas con vehículo o NO₂AA (10-20 μM) por dos minutos y estimuladas con trombina 0.5 U/mL por 10 minutos. Incubamos con anticuerpo anti-P-selectina como se detalla en la sección experimental y determinamos la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria que se expresa como porcentaje de plaquetas en la población designada M1. Los datos corresponden al promedio ± S.E., *n*=3, de experimentos al menos triplicados, utilizando plaquetas de diferentes donantes. * *p* < 0.05 respecto al control con trombina.

manera dosis dependiente (Figura 44B), y no tuvo efecto en ausencia de agonista. En plaquetas lavadas, la secreción de gránulos α es un evento que depende de la activación de PKC y es independiente de la síntesis de TxA₂ [218]. En efecto, el inhibidor de cPKC, gö 6976, inhibió la exposición de P-selectina (Figura 44B).

5.4.2.5 Rol de la proteína quinasa C

Para determinar el rol de cPKC en los efectos anti-agregantes de NO₂AA, estudiamos *i*) la agregación utilizando PMA como agonista [219], *ii*) la translocación transitoria a membrana de cPKC activada por trombina [173, 220], y *iii*) la activación de MAPK (mitogen activated protein kinase) dependiente de cPKC [174].

El PMA activa directamente a cPKC eliminando el requerimiento de DAG en un proceso independiente de Ca²⁺ [216, 219, 221-223]. El NO₂AA inhibió la agregación inducida por PMA de manera dosis-dependiente (Tabla 7 y Figura 45A), al igual que los inhibidores de PKC GF10 (Figura 45A) y gö 6976 (no se muestra). La activación por PMA no induce una síntesis importante de productos derivados del AA [224], consecuentemente la indometacina no inhibió la agregación inducida por PMA (Figura 45A). Dado que la cPKC se transloca a membrana cuando está activa, si el NO₂AA inhibe la activación de cPKC esperamos ver cambios en la movilidad de cPKC. Utilizamos un anticuerpo anti- α PKC para estudiar la translocación de cPKC por microscopía confocal de fluorescencia. En la condición control de plaquetas tratadas con vehículo (metanol), la proteína se observó difusamente distribuida en el citosol de las plaquetas; cuando las plaquetas fueron estimuladas con trombina durante tres minutos, se observó una migración hacia la membrana, en un proceso que fue totalmente inhibible en presencia de NO₂AA (Figura 45B). Además, el NO₂AA previno el drástico cambio morfológico característico de la activación plaquetaria, donde hay una disminución de aproximadamente el 50% del tamaño total y una reorganización del citoesqueleto que altera la distribución de α tubulina [225] desde un patrón homogéneo acentuado en la banda marginal a uno altamente irregular (Figura 45B). Las isoformas cPKC activan las vías de señalización de p38 MAPK y MEK/Erk (mitogen protein kinase kinase/extracellular-signal regulated kinase) [174]. En particular, la fosforilación de Erk2 depende exclusivamente de la actividad cPKC y se observa tardíamente durante la agregación plaquetaria (a partir de los 90 segundos, Figura 45C) [174, 175, 226]. En ausencia de agonista, el NO₂AA no tuvo efectos sobre la activación de Erk, pero redujo marcadamente su fosforilación en plaquetas estimuladas con trombina (Figura 45C). El inhibidor GF10, utilizado como control positivo, también inhibió la fosforilación de Erk2 (Figura 45C). El NO₂AA inhibió la agregación dependiente de cPKC únicamente cuando sus propiedades electrofílicas estuvieron intactas (Figura 45A). La cPKC

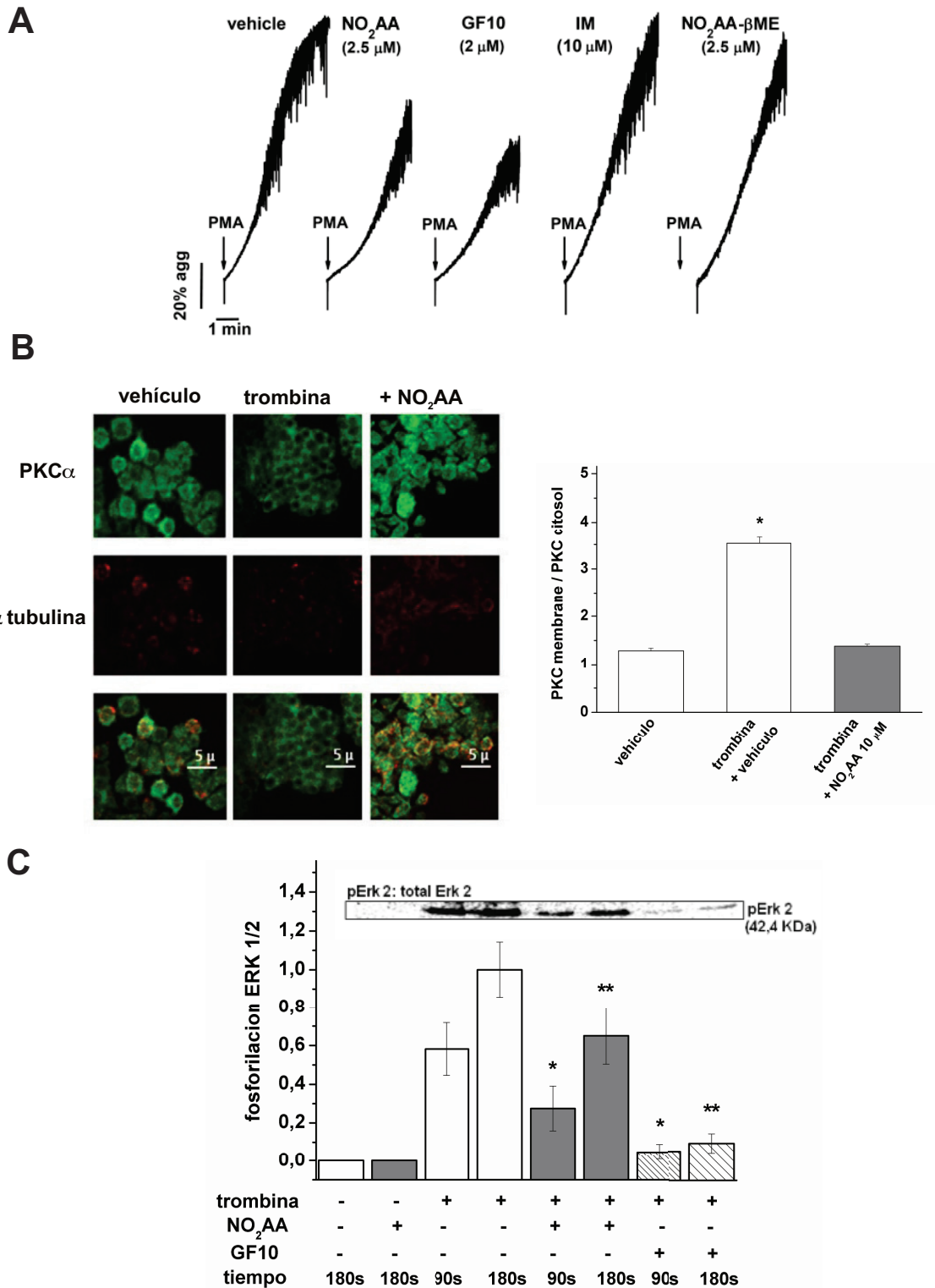


Figura 45. Modulación de la actividad PKC por NO₂AA. (A) Plaquetas (1×10^8 /mL) fueron pretratadas por 1 minuto con vehículo o inhibidor y estimuladas con el activador directo de PKC, PMA (100 nM), en solución Tyrode's a 37 °C. Para evaluar el rol de la electrofilicidad de NO₂AA en la inhibición de la agregación mediada por PKC, bloqueamos el grupo -NO₂ en el nitroalqueno preincubando con βME (500 mM) por 1 hora a T amb.

El NO₂AA y el inhibidor de PKC GF10 inhibieron la agregación dependiente de PKC, la indometacina no tuvo efecto, y tampoco tuvo efecto el NO₂AA cuando sus propiedades electrofílicas estaban alteradas. Datos representativos de experimentos al menos triplicados, utilizando plaquetas de diferentes donantes. **(B)** Evaluamos el efecto de NO₂AA sobre la translocación transitoria de cPKC activada mediante microscopía confocal de fluorescencia. En plaquetas no activadas, la PKC α (verde) se encontró difusamente distribuída en el citosol. La estimulación con trombina (0.05 U/mL) ocasionó la migración de la proteína hacia la membrana plaquetaria, un cambio morfológico importante, y la reorganización del citoesqueleto (α -tubulina, rojo), que adopta un patrón muy irregular. La preincubación de las plaquetas con NO₂AA (10 μ M) previo a la estimulación con trombina previno todos estos cambios. Las fotos son representativas de al menos tres experimentos independientes, utilizando plaquetas de diferentes donantes. La tinción en citosol vs. membrana se cuantificó por densitometría de al menos 60 células. * $p < 0.05$ respecto a las otras condiciones. **(C)** Estudiamos por inmunoensayo el rol de NO₂AA en la fosforilación de Erk1/2, un proceso que depende de la activación de cPKC. Trombina (0.5 U/mL) en presencia de Ca²⁺ (1 mM) indujo la fosforilación de Erk detectable a 90 y 180 segundos, en un evento inhibible por NO₂AA (10 μ M) y GF10 (10 μ M). Los resultados corresponden al promedio \pm S.E., n=2, de experimentos por triplicado, utilizando plaquetas de diferentes donantes. * $p < 0.05$ respecto a las plaquetas activadas sin inhibidor (90 seg); ** $p < 0.05$ respecto a las plaquetas activadas sin inhibidor (180 seg).

contiene regiones ricas en residuos cisteína que se duplican como dominios en tandem y son críticos para la interacción con los fosfolípidos de membrana [227]. Estas regiones podrían ser un blanco de nitroalquilación por NO₂AA; estudios futuros estarán dirigidos a estudiar esta posibilidad.

Las propiedades anti-plaquetarias que describimos para el NO₂AA, se suman a otras propiedades biológicas protectoras de NO₂AA como son la vasorelajación inducida por cGMP, la estimulación de la expresión de hemo-oxigenasa 1, la inhibición de Nrf2 o la regulación negativa del fenotipo inflamatorio en macrófagos, y refuerzan su rol como señalizador redox [26, 44, 71, 152]. Más allá del potencial farmacológico, que es muy difícil de comprobar, de nuestras observaciones surge un posible nuevo mecanismo de regulación plaquetaria *in vivo* donde el AA actúa como un agonista moderado importante para el mantenimiento de la hemostasia, pero adopta una potente actividad anti-plaquetaria en ambientes inflamatorios asociados a una producción de \cdot NO y ERN aumentada, que promueven la síntesis de NO₂AA (Figura 46). En nuestro sencillo modelo de plaquetas lavadas, la inhibición de PGHS-1 se apreció únicamente por la disminución en los niveles de TxA₂, y no estuvo involucrada en el efecto anti-agregante promovido por el NO₂AA. Para estudiar la relevancia biológica de la inhibición de PGHS-1 y cPKC sería de gran interés la utilización de un modelo animal adecuado al estudio de la función plaquetaria [228].

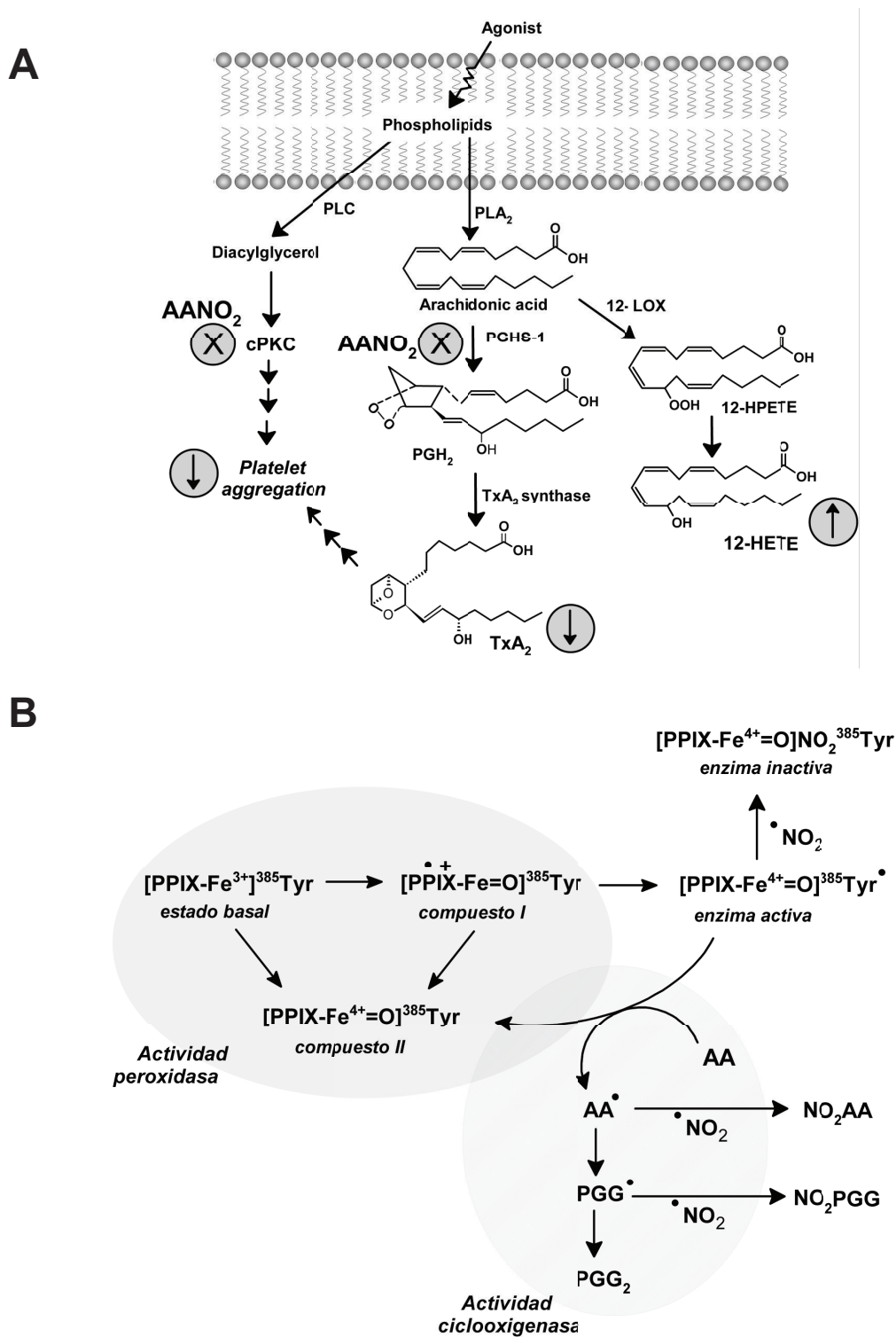
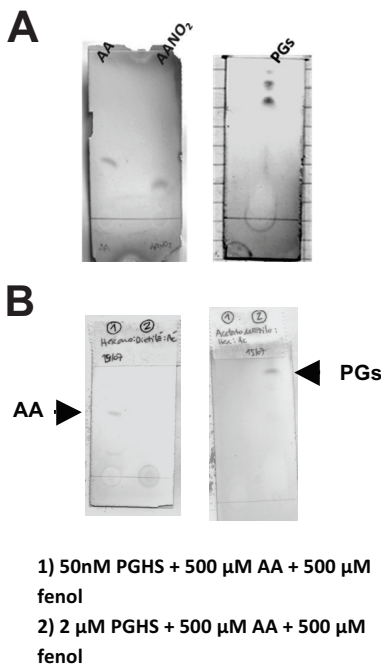


Figura 46. Efectos de NO_2AA en plaquetas e hipótesis de síntesis catalítica. (A) En plaquetas estimuladas se observa la liberación de DAG de la membrana, lo que provoca el aumento intracelular de Ca^{2+} ; PLA_2 cataliza la liberación de AA desde fosfolípidos de membrana hacia el citosol, donde ingresa en las vías PGHS o LOX para formar eicosanoides regulatorios. El DAG liberado activa cPKC desencadenando una cascada que culmina en la agregación plaquetaria. NO_2AA administrado a plaquetas humanas inhibió las actividades de PGHS-1 y cPKC. **(B)** En condiciones nitrooxidativas el radical $\cdot\text{NO}_2$ podría competir efectivamente por los radicales lipídicos intermediarios de la reacción catalizada por PGHS, formando productos como NO_2AA , capaces de disminuir la activación plaquetaria con un rol protector.

5.5 Nitración catalítica de AA por PGHS en presencia de especies reactivas del nitrógeno

La bibliografía documenta la formación de nitroalquenos *in vivo* [37, 38, 86, 229]; si bien no hay consenso en cuanto a su concentración efectiva, se ha demostrado su presencia endógena como moléculas libres, esterificadas, y unidas covalentemente a centros nucleofílicos (proteínas, glutatión, etc) [230]. Recientemente se demostró que durante la activación de macrófagos, el AAS favorece la formación de oxo-derivados electrofílicos (EFOX) catalizada por PGHS-2. Los EFOX sintetizados catalíticamente activaron la expresión de genes de respuesta anti-oxidante (dependiente de Nrf2), e inhibieron la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la producción de $\cdot\text{NO}$ como agonistas de PPAR γ [231]. En este trabajo nosotros pretendemos evaluar si el NO_2AA puede ser sintetizado por la acción catalítica de PGHS en presencia de ERN. Tal como se detalla en la introducción, PGHS cataliza una auto-oxidación radicalar controlada, donde se genera un radical AA^\cdot como intermediario de reacción en el sitio activo COX (Figura 7). El ambiente hidrofóbico del sitio activo COX podría facilitar la presencia simultánea de $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{AA}$, y/o radical peroxilo de AA (AAOO^\cdot) [98, 158, 232], y la vida media de AAOO^\cdot (0.1 - 0.2 seg), por ejemplo, es suficientemente larga como para permitir su reacción con $\cdot\text{NO}_2$ [100]. La síntesis catalítica de NO_2AA por PGHS podría representar un mecanismo de auto-regulación enzimática, donde al estar sometida a condiciones nitro-oxidativas la enzima cataliza la síntesis de su propio inhibidor, colaborando con la resolución de la inflamación.

5.5.1 Detección y análisis de los productos de PGHS formados en presencia de peroxinitrito



En todas las condiciones ensayadas, evaluamos la presencia de los metabolitos de interés (AA, NO_2AA , PGs) por HPLC, TLC y MS. La detección por HPLC se realizó en fase reversa utilizando una columna C18 y un sistema de gradientes que se puso a punto para la detección simultánea de PGs, AA, e isómeros posicionales de NO_2AA , como se detalla en la sección metodológica. Para la detección por TLC utilizamos placas analíticas de sílica y seleccionamos la fase móvil más adecuada para resolver una mezcla de estándares conteniendo AA, NO_2AA , y una mezcla comercial de PGs ($\text{PGF}_2\alpha$, PGD_2 , PGE_2 , 6Keto $\text{PGF}1\alpha$ y TxB_2) (Figura 47A). Evaluamos la tinción de los

metabolitos de reacción con yodo, permanganato de potasio, o anisaldehído, y el último resultado ser el método de detección más sensible (aproximadamente 100 ng para las PGs; 40 ng para el resto). La detección por LC MS/MS se puso a punto para la detección simultánea por MRM de AA (m/z 303/259), NO₂AA (m/z 348/46), PGE₂ (m/z 351/271), AAd8 (estándar interno) (m/z 311/267), y otros posibles productos de nitración (ej.: AAOONO₂, PG-NO₂).

La interacción de peroxinitrito con PGHS es compleja. En ausencia de sustrato y/o a alta concentración el peroxinitrito inhibe la actividad enzimática por nitración de residuos críticos para la actividad enzimática (ej.: Tyr385). En cambio, si PGHS es expuesta a flujos bajos de peroxinitrito durante el recambio enzimático se observa un aumento en la actividad. Esto se debe a que el peroxinitrito es un peróxido inorgánico capaz de oxidar al hemo durante la actividad POX para formar compuesto I derivado del hemo (Figura 9) y NO₂⁻. Para estudiar si es posible la nitración catalítica de AA por PGHS en presencia de ERN, estudiamos el efecto de la administración de flujos bajos de peroxinitrito a una mezcla de reacción de PGHS, esperando que el [•]NO₂ formado por la descomposición homolítica del peroxinitrito en la solución acuosa del amortiguador sea capaz de competir con el O₂ por el radical AA intermediario de la reacción.

El sistema de reacción consistió en una mezcla de AA, fenol (como co-sustrato reductor), PGHS reconstituída con Fe³⁺-PPIX o Mn³⁺-PPIX, y peroxinitrito. El flujo de peroxinitrito (0.1 a 1 μM/min) comienza a administrarse inmediatamente iniciada la reacción, para desfavorecer la inactivación de PGHS por nitración de residuos críticos. Evaluamos Mn³⁺-PPIX-PGHS debido a su mayor número de recambio y eficiencia catalítica respecto a su par con hierro [98]. Evaluamos también los productos formados en un ambiente con argón, con el objetivo de favorecer la competencia del [•]NO₂ con el radical AA[•] frente al O₂. Las condiciones óptimas de reacción (concentraciones, tiempos, etc) fueron puestas a punto por TLC analítica, que permitió trabajar con volúmenes muy pequeños de fase móvil, en tiempos rápidos de análisis (5 min por corrida aproximadamente), y con una excelente sensibilidad. Para ajustar las concentraciones de sustratos y enzima consideramos que con una actividad COX promedio de 50 μmol O₂/min/mg [98], se forman 25 μmol [•]AA/mg por minuto de reacción considerando una eficiencia del 100%. En 100 μL de reacción, 0.5 μg de PGHS-1 (2 μM) consumirían 12.5 nmol AA/min. De esta manera elegimos partir de 15 nmol de sustrato (500 μM AA) para maximizar la formación de radicales derivados del AA. En efecto observamos que utilizando estas concentraciones (en ausencia de peroxinitrito) la enzima consume el 100% del AA y detectamos la formación de PGs, mientras que si partimos de una cantidad total de enzima 40 veces menor (50 nM) transcurrido el minuto de reacción permanece AA sin reaccionar y no detectamos síntesis de PGs (Figura 47B). En presencia de 1 μM/min peroxinitrito se observó formación de un

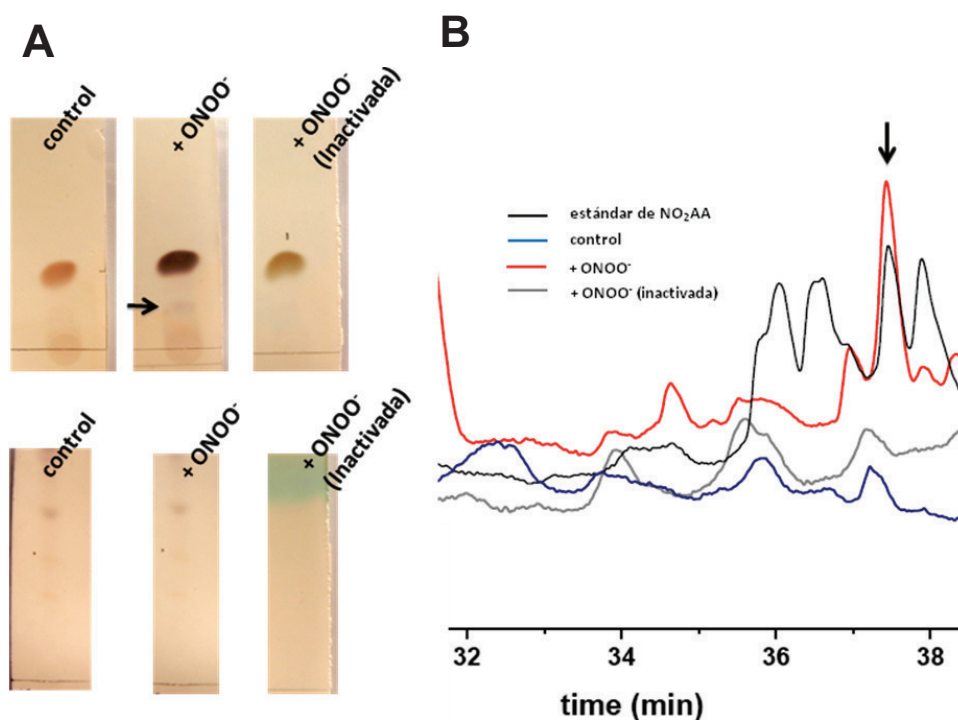


Figura 48. Detección de productos sintetizados por PGHS en presencia de peroxinitrito. Aquí evaluamos la formación de productos en presencia de PGHS-2 (2 μ M), fenol (500 μ M), y AA (500 μ M) en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4 a Tamb, por **(A)** TLC analítica y **(B)** HPLC. El flujo de peroxinitrito (0.1 μ M/min) se inició con la enzima en recambio para desfavorecer la inactivación enzimática por nitración de residuos críticos, y la reacción se detuvo a los 4 minutos por extracción orgánica con acetato de etilo. **(A)** El peroxinitrito administrado no inactivó a PGHS-2, y en presencia del flujo de peroxinitrito se formó un producto con menor polaridad que AA e igual R_f a NO₂AA. Este producto se formó catalíticamente, ya que cuando administramos peroxinitrito a PGHS-2 previamente inactivada con indometacina (no hubo síntesis de PGs) no observamos su formación. **(B)** El análisis por HPLC (detección a 274 nm) dio la misma información que la TLC analítica. En presencia de peroxinitrito, se aprecia la presencia de una banda idéntica a un isómero posicional de NO₂AA. Todos los datos son representativos de experimentos por triplicado.

producto con una polaridad mayor a la del AA y misma migración que NO₂AA (Figura 48A). La enzima no fue inactivada por peroxinitrito ya que se evidenció la síntesis de PGs (Figura 48A). El nuevo metabolito identificado es un producto catalítico que no se formó por reacción directa entre el AA con peroxinitrito o los radicales derivados de su homólisis, ya que cuando repetimos el experimento utilizando PGHS inactivada (por preincubación previa con indometacina) no observamos síntesis de PGs ni del metabolito (Figura 48A). Además, cuando la PGHS fue expuesta a peroxinitrito, se obtuvo un producto con idéntico perfil de elución en el HPLC al reportado para uno de los isómeros de síntesis ácida del AANO₂ (Figura 48B, en rojo), el cual no fue observado cuando la enzima inactiva fue expuesta a peroxinitrito (Figura 48B, en gris).

Si bien logramos avances significativos en la puesta a punto de la detección de metabolitos de interés durante la reacción de PGHS en presencia de ERN, el resultado en la figura 48 es aún muy preliminar, hasta que pueda confirmarse que el metabolito identificado por TLC y HPLC corresponde efectivamente a un isómero posicional de NO_2AA (por LC MS/MS y NMR). Si lo confirmamos, este sería el primer mecanismo descrito de síntesis catalítica de un nitroalqueno.

5.5.2 Análisis de los productos formados en presencia de nitrito

Se ha descrito la nitración autocatalítica de la Tyr385 de PGHS en presencia de NO_2^- y H_2O_2 [177], y se sabe con seguridad que la mieloperoxidasa (MPO) es capaz de oxidar por 1 electrón al NO_2^- para formar $^*\text{NO}_2$ y compuesto II [233]. Incubamos a PGHS-2 con AA y concentraciones crecientes de NO_2^- , y evaluamos la formación de metabolitos de reacción por LC MS/MS (Figura 49). No observamos formación de nuevos metabolitos por LC MS/MS o TLC. Obtuvimos una inhibición importante de la enzima cuando administramos NO_2^- inmediatamente después del sustrato (AA), pero incluso a concentraciones elevadas y

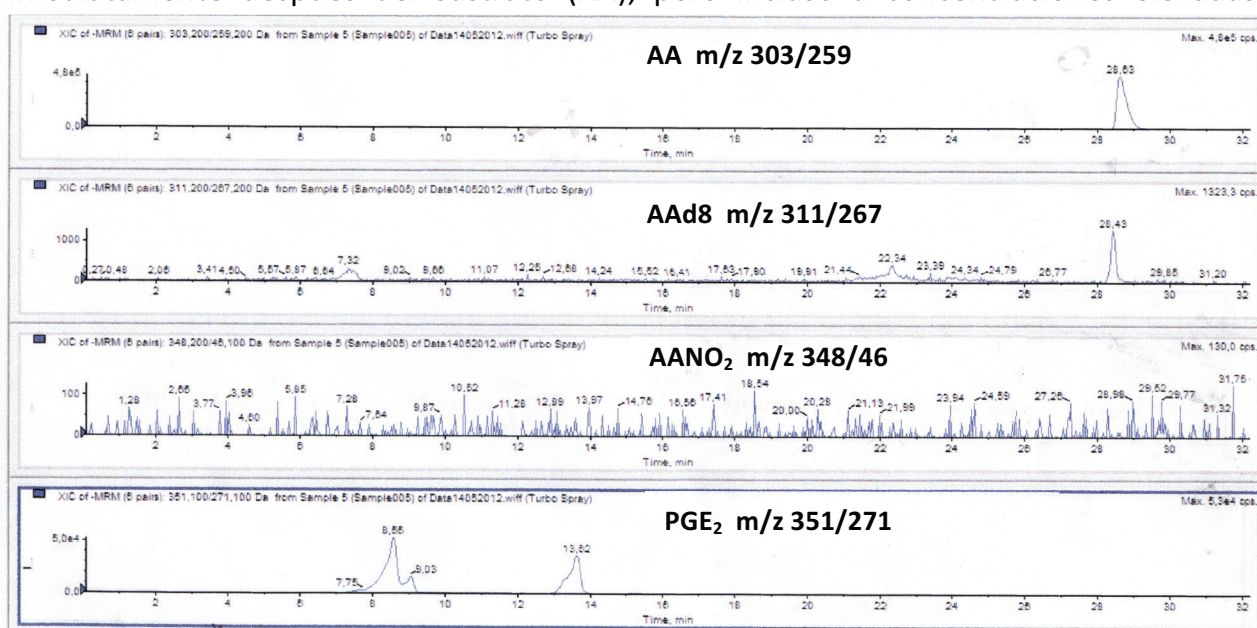


Figura 49. Análisis por MS de metabolitos de la reacción PGHS en presencia de NO_2^- . Para estudiar la formación de $^*\text{NO}_2$ a partir de NO_2^- catalizada por PGHS y la formación de productos catalíticos nitrados, incubamos PGHS-2 (2 μM) en fosfato de sodio 50 mM pH 7.4 con AA (50 μM) en presencia o ausencia de NO_2^- en concentraciones variables (1 - 100 μM). Detuvimos la reacción por extracción con acetato de etilo y analizamos la formación de productos esperados y nitrados por LC MS/MS, utilizando como estándar interno AAd8 (m/z 311/267). También realizamos inmunoensayo para detectar nitrotirosina (no se muestra). No detectamos formación de $\text{NO}_2\text{-Tir}$ ni de metabolitos nitrados en ninguna de las condiciones ensayadas. Arriba se muestra un resultado representativo del análisis LC MS/MS, para PGHS-2 incubada con AA y NO_2^- 10 μM por 1 minuto.

tiempos de reacción variables no pudimos detectar la formación de nitro-tirosina por inmunoensayo (no se muestra). Todos estos resultados confirman resultados previos de nuestro laboratorio [153], excluyendo al NO_2^- como fuente de $\cdot\text{NO}_2$ durante la actividad PGHS-2.

5.5.3 Análisis de los productos formados en presencia de $\cdot\text{NO}$

Para determinar si el $\cdot\text{NO}$ puede atrapar a los intermediarios radicalares de AA durante la catálisis de PGHS, se puso a punto una técnica combinada de resonancia de espín electrónico (ESR) utilizando un spin trap, con LC/MS, en colaboración con el Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota, USA. El sistema de reacción no inhibida consistió en PGHS, hemina, el spin trap POBN, y AA. Se realizó una predicción de los productos esperados cuando la reacción transcurre en condiciones reductoras, y de la m/z esperada para el aducto entre cada producto y POBN (figura 50). En efecto, en el sistema de reacción completo no inhibido se observó la señal ESR esperada para PGHS activa (aducto radical-POBN) (figura 51A) así como los fragmentos m/z esperados (figura 51C). NO_2AA o el dador de $\cdot\text{NO}$ NOC 12 inhibieron la actividad de PGHS (figura 52). En este sistema de reacción, postulamos que el $\cdot\text{NO}$ puede actuar como terminador de la cadena de oxidación de AA, formando aductos con los radicales intermediarios de la reacción: radical alquilo ($\text{L}\cdot$) en C13, y radical alcoxilo ($\text{LOO}\cdot$) en C11, para dar productos nitrogenados del AA (ej. LNO, LOONO). En el análisis LC/MS del sistema de reacción en presencia de NOC 12 se identificaron fragmentos con m/z que coincide con posibles productos nitrogenados de AA (figura 53), lo cual explicaría la disminución en radicales derivados del producto de la reacción en condiciones no inhibidas.

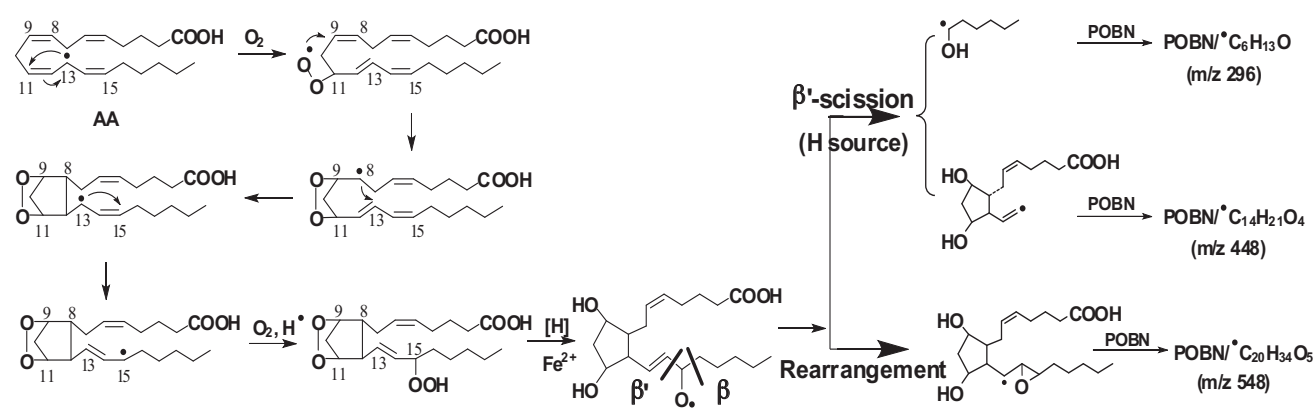


Figura 50. Peroxidación de AA durante la actividad PGHS y productos radicalares de reacción propuestos en condiciones reductoras. Como índice de actividad PGHS se buscan por ESR - LC/MS los aductos de productos radicalares con el spin trap POBN (m/z 296, 448 y 548)

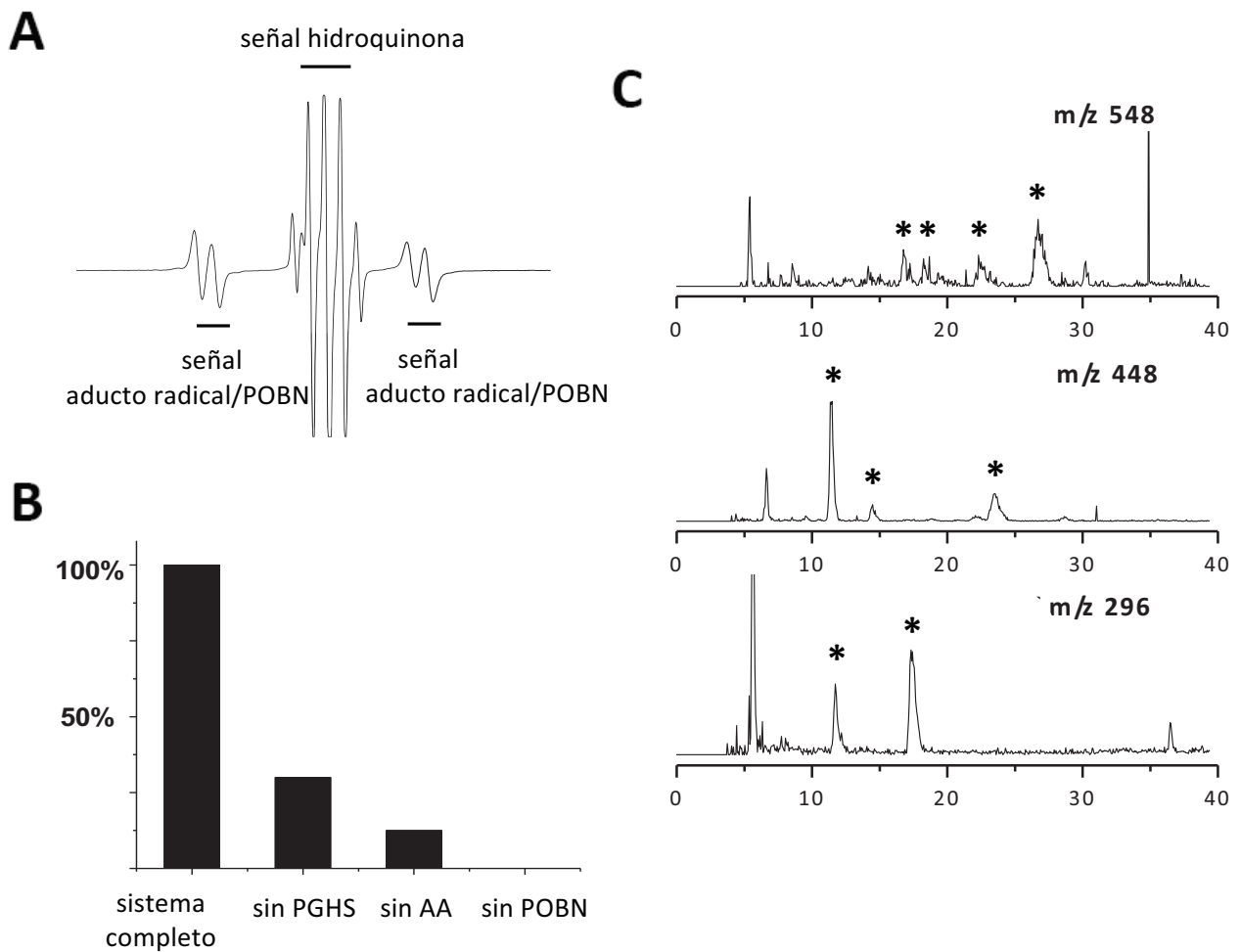


Figura 51. Determinación de la actividad PGHS por ESR - LC/MS. (A) ESR spectrum of PGHS-AA reaction system. **(B)** Relative signal intensity of radical adducts in different control experiments. **(B)** Detección ESR de radicales formados durante la actividad PGHS. Intensidad relativa de la señal de aductos radical/POBN en diferentes condiciones experimentales. **(C)** Detección LC/MS de la actividad PGHS en el modo EIC (extracted ion chromatogram). * representa diferentes isómeros del producto radicalar.

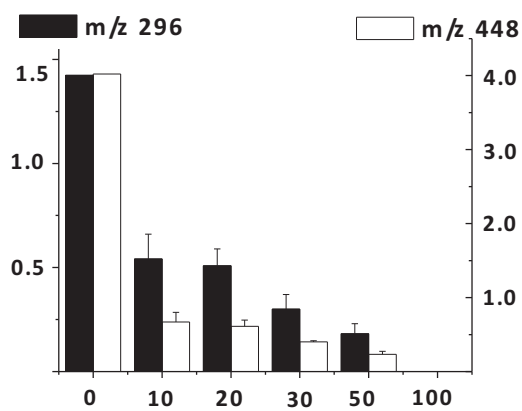
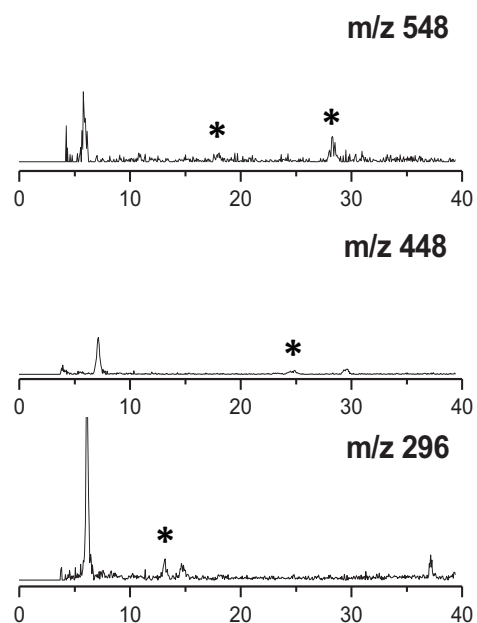
A**B**

Figura 52. Efecto de NO₂AA y [•]NO en la actividad PGHS. (A) Efecto dosis-dependiente de NO₂AA. (B) Análisis LC/MS del efecto de [•]NO en el modo EIC (extracted ion chromatogram). * peaks represent various isomers of radical products.

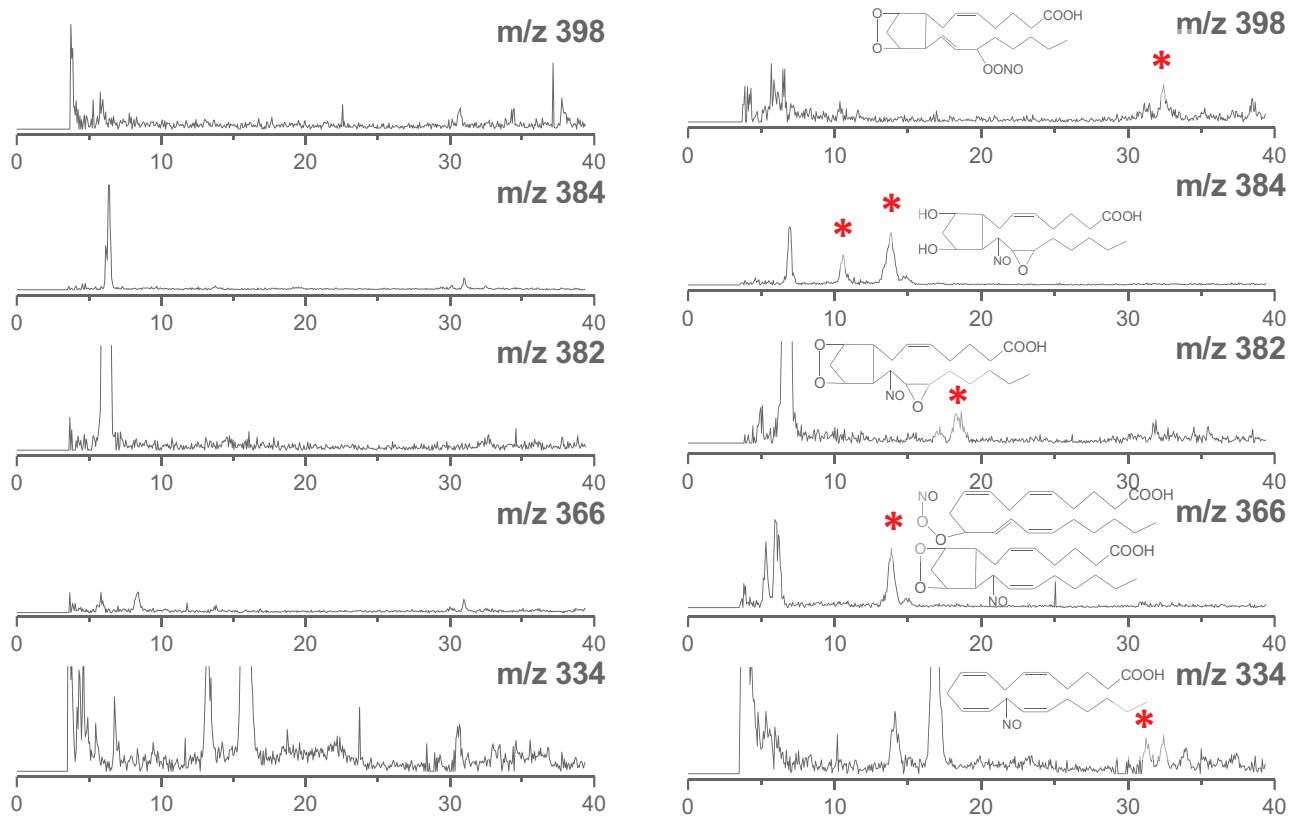


Figura 53. Identificación por LC/MS de posibles derivados nitrogenados de AA formados por reacción de PGHS en presencia de $\cdot\text{NO}$. (A) EIC (extracted ion chromatogram) del sistema de reacción PGHS-AA en ausencia de $\cdot\text{NO}$. (B) EIC del sistema de reacción PGHS-AA en presencia de NOC 12. No se detectó señal para NO_2AA (m/z 348), pero se detectaron varios fragmentos que podrían corresponder a productos nitrogenados derivados de AA (*) derivados de los intermediarios radicalares de reacción.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo integramos estudios bioquímicos, proteómicos, computacionales, y celulares para demostrar que el producto de nitración derivado de AA, el NO₂AA, *i)* inhibe a la enzima PGHS-1 y 2 mediante un nuevo mecanismo igual o más efectivo comparado a los AINES, *ii)* modula el perfil celular de lípidos bioactivos que se sintetizan a partir del AA, y *iii)* es un potente agente anti-agregante por modulación de al menos dos vías de activación plaquetaria. Los efectos biológicos caracterizados en este trabajo son exclusivos de NO₂AA y no genéricos a todos los nitroalquenos, aumentando su potencial farmacológico. Estos resultados se suman a otras acciones biológicas caracterizadas para NO₂AA, como la inducción de la vasorrelajación dependiente de cGMP, la estimulación de la expresión de HO-1, la activación de Nrf2, o la inhibición del fenotipo inflamatorio en macrófagos activados, y en conjunto apoya el rol de NO₂AA como nuevo mediador redox en la señalización celular.

A pesar de la similitud estructural de NO₂AA con el sustrato natural de PGHS, el mecanismo más probable de inhibición involucra la unión del nitroalqueno al sitio activo POX, y el desplazamiento del hemo desde su sitio de unión por interacción con los residuos de histidina 388 y 207, críticos para la estabilidad del hemo. La actividad biológica de nitrolípidos está fundamentalmente mediada por modificaciones covalentes de residuos proteicos de cisteína o histidina; sin embargo, nuestro trabajo sugiere una modificación no covalente de PGHS, representando un mecanismo inusual de acción para nitroalquenos. Actualmente, intentamos confirmar la naturaleza no covalente de la interacción, en colaboración con el Dr. L.J. Marnett, por cristalografía de PGHS-2 junto a isómeros posicionales puros de NO₂AA.

Los resultados *in vitro* fueron trasladados a un modelo de relevancia fisiológica. NO₂AA administrado a plaquetas humanas alteró el metabolismo normal de AA, inhibiendo la síntesis de tromboxanos derivados de la vía PGHS, y estimulando la síntesis de 12-HETE derivado de la vía LOX. La literatura es contradictoria en el rol que los productos de LOX ejercen en plaquetas. Para entender el impacto de la modulación del metabolismo de AA por NO₂AA será importante estudiar el efecto de 12-HETE sobre los principales indicadores de actividad plaquetaria (degranulación, Ca²⁺, adherencia, cambio de forma, etc). NO₂AA también inhibió la actividad αPKC, con potentes consecuencias anti-agregantes. PKC contiene residuos críticos de cisteína repetidos en tandem y estudios proteómicos con la proteína aislada permitirán determinar si la inhibición de PKC es consecuencia de una nitroalquilación por NO₂AA. La inhibición de PGHS y de la síntesis del agonista débil TxA₂ no tiene consecuencias importantes *in vitro*, ya que la actividad anti-agregante de NO₂AA

dependió de la inhibición de PKC, pero es presumible que en el complejo medio biológico esto cambie. Para determinar el potencial farmacológico de NO₂AA y las consecuencias de su rol como inhibidor de la activación plaquetaria será necesario evaluar el efecto del nitroalqueno en un modelo animal adecuado al estudio de plaquetas; para esto es fundamental la optimización en el rendimiento de síntesis y la purificación a gran escala de NO₂AA que logramos en el marco de este trabajo.

En vista de las propiedades biológicas descritas para nitroalquenos en los últimos 10 años, la administración exógena de nitroalquenos con fines farmacológicos es un área de mucho interés, pero presenta grandes dificultades (toxicidad, biodistribución, estabilidad, etc.). En este trabajo nosotros estudiamos la nitración catalítica de AA por la actividad enzimática PGHS, como posible mecanismo de auto-regulación, donde la nitración del sustrato (AA) en un ambiente nitrooxidativo forma un potente inhibidor de la actividad enzimática (NO₂AA), que disminuye la síntesis de eicosanoides pro-inflamatorios favoreciendo la resolución de la inflamación. Los nitroalquenos han sido detectados *in vivo* en un rango de concentraciones que va desde nM a μM; la caracterización cinética mostró que NO₂AA tiene una alta potencia inhibitoria de PGHS-1 y 2 ($k_{\text{inact}}/K_i=10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_i^{\text{app}*} \sim 0.2 \mu\text{M}$) lo cual hace posible la inhibición de PGHS por NO₂AA formado endógenamente. Inclusive inhibidores menos potentes, cuando son irreversibles, tienen efectos importantes en el perfil de lípidos bioactivos sintetizados a partir del AA. En este trabajo, pusimos a punto un sistema para evaluar la síntesis catalítica de NO₂AA a partir de AA mediada por la actividad PGHS. No detectamos la formación de [•]NO₂ a partir de NO₂⁻ por la actividad POX, pero en presencia de flujos bajos de peroxinitrito describimos la síntesis catalítica de un producto con perfiles de HPLC y TLC idéntico a NO₂AA. Además, utilizando un nuevo método de ESR spin trap acoplado a LC/MS observamos posible formación de productos nitrogenados formados por PGHS en presencia de [•]NO. Estos resultados son aún preliminares, hasta que confirmemos la naturaleza de los analitos por MS y por NMR.

7. AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de trabajo en el Departamento de Bioquímica, que han dedicado largas horas de su tiempo a responder con dedicación y cariño a cada una de mis consultas, enseñándome nuevas técnicas, diseñando conmigo experimentos, y buscando explicaciones a mis resultados, con el entusiasmo desinteresado de los que sienten pasión por lo que hacen. Muchas gracias Noel, Nati R., Madia, Lu P., Botti, Pepe, Gonza, Flor I.

A Rafael, que siempre me dio un espacio para discutir mis resultados y me ayudó a pensar y resolver varios aspectos importantes de esta tesis.

A mis orientadores, que me brindaron la libertad necesaria para disfrutar al máximo este trabajo, valorándome y respaldándome siempre. Trocha, gracias por todo lo que me enseñaste, por tus consejos, por tu paciencia y por tu perseverancia. Homer, gracias por tu eterna generosidad conmigo, por la humildad con la que transmitís todo lo que sabés, por enseñarme a ver el bosque y no el árbol cada vez que me dispuse a escribir un trabajo o a diagramar un experimento.

A PEDECIBA Química y a la ANII, sin cuyo apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A Eduardo, que estaría orgulloso de mí.

A Andrés, entre los buzos y el astronauta.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **357**, 593-615
- 2 Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P. L. and Wiseman, J. (1991) N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* **266**, 6259-6263
- 3 Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 9265-9269
- 4 Durner, J., Gow, A. J., Stamler, J. S. and Glazebrook, J. (1999) Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 14206-14207
- 5 Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* **327**, 524-526
- 6 Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**, 373-376
- 7 Schipper, K. P. H. M., ed. (2012) *Principles of Free Radical Biomedicine*; Chapter 3
- 8 Goldstein, S. and Czapski, G. (1995) The reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med.* **19**, 505-510
- 9 Radi R., A. B., Ferrer-Sueta G., Rubbo H. . (2000) The Biological Chemistry of Peroxynitrite. In *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., ed.)
- 10 Szabo, C., Ischiropoulos, H. and Radi, R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* **6**, 662-680
- 11 Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M. and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys.* **333**, 49-58
- 12 Uppu, R. M., Squadrito, G. L. and Pryor, W. A. (1996) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys.* **327**, 335-343
- 13 Lymar, S. V. and Hurst, J. K. (1996) Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem Res Toxicol.* **9**, 845-850
- 14 Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J. and Merenyi, G. (2001) Carbonate radical ion is the only observable intermediate in the reaction of peroxynitrite with CO₂. *Chem Res Toxicol.* **14**, 1273-1276
- 15 Goldstein, S. (1999) Viscosity effects on the reaction of peroxynitrite with CO₂: evidence for radical formation in a solvent cage. *J Am Chem Soc.* **121**, 2444-2447
- 16 Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L. and Davies, K. J. (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **291**, R491-511
- 17 Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 4003-4008
- 18 Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M. and Freeman, B. A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* **269**, 26066-26075
- 19 Rubbo, H., Parthasarathy, S., Barnes, S., Kirk, M., Kalyanaraman, B. and Freeman, B. A. (1995) Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.* **324**, 15-25
- 20 Bonilla, L., Rubbo, H. (2011) *Principles of Free Radical Biomedicine*. Volume 1, 1st Edition. Chapter 8: "Lipid nitration" pp. 161-184 Nova Science
- 21 Baker, P. R., Schopfer, F. J., O'Donnell, V. B. and Freeman, B. A. (2009) Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med.* **46**, 989-1003

- 22 Spencer, J. P., Whiteman, M., Jenner, A. and Halliwell, B. (2000) Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* **28**, 1039-1050
- 23 Whiteman, M., Spencer, J. P., Jenner, A. and Halliwell, B. (1999) Hypochlorous acid-induced DNA base modification: potentiation by nitrite: biomarkers of DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* **257**, 572-576
- 24 Ischiropoulos, H., Gow, A., Thom, S. R., Kooy, N. W., Royall, J. A. and Crow, J. P. (1999) Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol.* **301**, 367-373
- 25 Schopfer, F. J., Baker, P. R. and Freeman, B. A. (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci.* **28**, 646-654
- 26 Rubbo, H. and Radi, R. (2008) Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim Biophys Acta.* **1780**, 1318-1324
- 27 Trostchansky, A., Bonilla, L., Gonzalez-Perilli, L. and Rubbo, H. Nitro-Fatty Acids: Formation, Redox Signaling, and Therapeutic Potential. *Antioxid Redox Signal*
- 28 Gago, B., Lundberg, J. O., Barbosa, R. M. and Laranjinha, J. (2007) Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radic Biol Med.* **43**, 1233-1242
- 29 Lundberg, J. O. and Weitzberg, E. (2005) NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**, 915-922
- 30 Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* **288**, 481-487
- 31 O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P., Chumley, P. H., Jablonsky, M. J., Krishna, N. R., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V. M. and Freeman, B. A. (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol.* **12**, 83-92
- 32 Freeman, B. A., Baker, P. R., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Napolitano, A. and d'Ischia, M. (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem.* **283**, 15515-15519
- 33 Baker, P. R., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M., Branchaud, B. P., Chen, Y. E. and Freeman, B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem.* **280**, 42464-42475
- 34 Lima, E. S., Di Mascio, P., Rubbo, H. and Abdalla, D. S. (2002) Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry.* **41**, 10717-10722
- 35 Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R., Ramani, R. and Freeman, B. A. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* **85**, 155-166
- 36 Schopfer, F. J., Batthyany, C., Baker, P. R., Bonacci, G., Cole, M. P., Rudolph, V., Groeger, A. L., Rudolph, T. K., Nadtochiy, S., Brookes, P. S. and Freeman, B. A. (2009) Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic Biol Med.* **46**, 1250-1259
- 37 Nadtochiy, S. M., Baker, P. R., Freeman, B. A. and Brookes, P. S. (2009) Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischaemic preconditioning: implications for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* **82**, 333-340
- 38 Ferreira, A. M., Ferrari, M. I., Trostchansky, A., Batthyany, C., Souza, J. M., Alvarez, M. N., Lopez, G. V., Baker, P. R., Schopfer, F. J., O'Donnell, V., Freeman, B. A. and Rubbo, H. (2009) Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J.* **417**, 223-234
- 39 Schopfer, F. J., Cipollina, C. and Freeman, B. A. Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem Rev.* **111**, 5997-6021
- 40 Groeger, A. L. and Freeman, B. A. Signaling actions of electrophiles: anti-inflammatory therapeutic candidates. *Mol Interv.* **10**, 39-50

- 41 Pryor, W. A. (1982) Reaction of nitrogen dioxide with alkenes and polyunsaturated fatty acids: addition and hydrogen abstraction mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6685-6692
- 42 Pryor, W. A. and Lightsey, J. W. (1981) Mechanisms of Nitrogen Dioxide Reactions: Initiation of Lipid Peroxidation and the Production of Nitrous Acid. *Science*. **214**, 435-437
- 43 Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S. and Chaudhuri, G. (1988) Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther.* **244**, 181-189
- 44 Trostchansky, A. and Rubbo, H. (2008) Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic Biol Med.* **44**, 1887-1896
- 45 Porter, N. A. (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* **19**, 262-268
- 46 Katusin-Razem, B. (2000) Absolute rate constants of elementary reaction steps in radiation-induced peroxidation of unsaturated fatty acids. *J. Phys. Chem. A*
- 47 Halliwell, B. (1999) Free radicals in biology and medicine
- 48 Yin, H. and Porter, N. A. (2005) New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal.* **7**, 170-184
- 49 Banni, S., Contini, M. S., Angioni, E., Deiana, M., Dessi, M. A., Melis, M. P., Carta, G. and Corongiu, F. P. (1996) A novel approach to study linoleic acid autoxidation: importance of simultaneous detection of the substrate and its derivative oxidation products. *Free Radic Res.* **25**, 43-53
- 50 Porter, N. A. (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Accta Chemical Research.* **19**, 262-268
- 51 Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. and Gotoh, N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr.* **62**, 1322S-1326S
- 52 Thomas, S. R. and Stocker, R. (2000) Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* **28**, 1795-1805
- 53 O'Donnell, V. B., Chumley, P. H., Hogg, N., Bloodsworth, A., Darley-Usmar, V. M. and Freeman, B. A. (1997) Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry.* **36**, 15216-15223
- 54 Fukuto, J. M. (Ignarro, L.J. 2000) Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Chapter 2: The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogens Oxides
- 55 Padmaja, S. and Huie, R. E. (1993) The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* **195**, 539-544
- 56 Rubbo, H., Radi, R., Anselmi, D., Kirk, M., Barnes, S., Butler, J., Eiserich, J. P. and Freeman, B. A. (2000) Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J Biol Chem.* **275**, 10812-10818
- 57 Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D. and Lancaster, J. R., Jr. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 2175-2179
- 58 Denicola, A., Souza, J. M., Radi, R. and Lissi, E. (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch Biochem Biophys.* **328**, 208-212
- 59 Moller, M. N., Li, Q., Vitturi, D. A., Robinson, J. M., Lancaster, J. R., Jr. and Denicola, A. (2007) Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the *NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol.* **20**, 709-714
- 60 Balazy, M., Iesaki, T., Park, J. L., Jiang, H., Kaminski, P. M. and Wolin, M. S. (2001) Vicinal nitrohydroxyeicosatrienoic acids: vasodilator lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* **299**, 611-619
- 61 Gallon, A. A. and Pryor, W. A. (1994) The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids.* **29**, 171-176

- 62 Napolitano, A., Panzella, L., Savarese, M., Sacchi, R., Giudicianni, I., Paolillo, L. and d'Ischia, M. (2004) Acid-induced structural modifications of unsaturated Fatty acids and phenolic olive oil constituents by nitrite ions: a chemical assessment. *Chem Res Toxicol.* **17**, 1329-1337
- 63 Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* **266**, 4244-4250
- 64 Rubbo, H., Trostchansky, A. and O'Donnell, V. B. (2009) Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys.* **484**, 167-172
- 65 Denicola, A., Souza, J. M. and Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 3566-3571
- 66 Radi, R. (Ignarro, L.J. 2000) Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Chapter 4: The Biological Chemistry of Peroxynitrite.
- 67 Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Duran, R., Baker, L. M., Huang, Y., Cervenansky, C., Branchaud, B. P. and Freeman, B. A. (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem.* **281**, 20450-20463
- 68 Baker, L. M., Baker, P. R., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R. and Freeman, B. A. (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem.* **282**, 31085-31093
- 69 Schopfer, F. J., Baker, P. R., Giles, G., Chumley, P., Batthyany, C., Crawford, J., Patel, R. P., Hogg, N., Branchaud, B. P., Lancaster, J. R., Jr. and Freeman, B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J Biol Chem.* **280**, 19289-19297
- 70 Lima, E. S., Bonini, M. G., Augusto, O., Barbeiro, H. V., Souza, H. P. and Abdalla, D. S. (2005) Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic Biol Med.* **39**, 532-539
- 71 Trostchansky, A., Souza, J. M., Ferreira, A., Ferrari, M., Blanco, F., Trujillo, M., Castro, D., Cerecetto, H., Baker, P. R., O'Donnell, V. B. and Rubbo, H. (2007) Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry.* **46**, 4645-4653
- 72 Rudolph, V., Schopfer, F. J., Khoo, N. K., Rudolph, T. K., Cole, M. P., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Groeger, A. L., Golin-Bisello, F., Chen, C. S., Baker, P. R. and Freeman, B. A. (2009) Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem.* **284**, 1461-1473
- 73 Rudolph, T. K. and Freeman, B. A. (2009) Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal.* **2**, re7
- 74 Lim, D. G., Sweeney, S., Bloodsworth, A., White, C. R., Chumley, P. H., Krishna, N. R., Schopfer, F., O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P. and Freeman, B. A. (2002) Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 15941-15946
- 75 Coles, B., Bloodsworth, A., Eiserich, J. P., Coffey, M. J., McLoughlin, R. M., Giddings, J. C., Lewis, M. J., Haslam, R. J., Freeman, B. A. and O'Donnell, V. B. (2002) Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J Biol Chem.* **277**, 5832-5840
- 76 Coles, B., Bloodsworth, A., Clark, S. R., Lewis, M. J., Cross, A. R., Freeman, B. A. and O'Donnell, V. B. (2002) Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ Res.* **91**, 375-381
- 77 Liu, H., Jia, Z., Soodvilai, S., Guan, G., Wang, M. H., Dong, Z., Symons, J. D. and Yang, T. (2008) Nitrooleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* **295**, F942-949
- 78 Taylor-Clark, T. E., Ghatta, S., Bettner, W. and Udem, B. J. (2009) Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. *Mol Pharmacol.* **75**, 820-829
- 79 Lima, E. S., Di Mascio, P. and Abdalla, D. S. (2003) Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J Lipid Res.* **44**, 1660-1666

- 80 Baker, P. R., Schopfer, F. J., Sweeney, S. and Freeman, B. A. (2004) Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 11577-11582
- 81 Schopfer, F. J., Batthyany, C., Baker, P. R., Bonacci, G., Cole, M. P., Rudolph, V., Groeger, A., Rudolph, T. K., Nadtochiy, S., Brookes, P. S. and Freeman, B. A. (2009) Detection and Quantification of Protein Adduction by Electrophilic Fatty Acids: Mitochondrial Generation of Fatty Acid Nitroalkene Derivatives. *Free Radic Biol Med*
- 82 Kulinsky, V. I. (2007) Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry (Mosc)*. **72**, 595-607
- 83 Croce, K. and Libby, P. (2007) Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*. **14**, 55-61
- 84 Lowenberg, E. C., Meijers, J. C. and Levi, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med*. **68**, 242-251
- 85 Gawaz, M., Langer, H. and May, A. E. (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. **115**, 3378-3384
- 86 Cui, T., Schopfer, F. J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker, P. R., Batthyany, C., Chacko, B. K., Feng, X., Patel, R. P., Agarwal, A., Freeman, B. A. and Chen, Y. E. (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem*. **281**, 35686-35698
- 87 Gonzalez-Perilli, L., Noel Alvarez, M., Prolo, C., Radi, R., Rubbo, H. and Trostchansky, A. (2013) Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radic Biol Med*
- 88 Khoo, N. K., Rudolph, V., Cole, M. P., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Batthyany, C. and Freeman, B. A. (2009) Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med*
- 89 Wright, M. M., Kim, J., Hock, T. D., Leitinger, N., Freeman, B. A. and Agarwal, A. (2009) Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by cAMP, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochem J*. **422**, 353-361
- 90 Maines, M. D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **37**, 517-554
- 91 Ichikawa, T., Zhang, J., Chen, K., Liu, Y., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Freeman, B. A., Chen, Y. E. and Cui, T. (2008) Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: a critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinology*. **149**, 4086-4094
- 92 Zhang, J., Villacorta, L., Chang, L., Fan, Z., Hamblin, M., Zhu, T., Chen, C. S., Cole, M. P., Schopfer, F. J., Deng, C. X., Garcia-Barrio, M. T., Feng, Y. H., Freeman, B. A. and Chen, Y. E. (2010) Nitro-Oleic Acid Inhibits Angiotensin II-Induced Hypertension. *Circ Res*
- 93 Zhang, X., Goncalves, R. and Mosser, D. M. (2008) The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. **Chapter 14**, Unit 14 11
- 94 Seeds, M. C. and Bass, D. A. (1999) Regulation and metabolism of arachidonic acid. *Clin Rev Allergy Immunol*. **17**, 5-26
- 95 Lewis, R. A., Austen, K. F. and Soberman, R. J. (1990) Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med*. **323**, 645-655
- 96 Roman, R. J. (2002) P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. **82**, 131-185
- 97 Wenzel, S. E. (1997) Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma. *Pharmacotherapy*. **17**, 3S-12S
- 98 Rouzer, C. A. and Marnett, L. J. (2003) Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem Rev*. **103**, 2239-2304
- 99 Smith, W. L. and Song, I. (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **68-69**, 115-128

- 100 Balazy, M. and Poff, C. D. (2004) Biological nitration of arachidonic acid. *Curr Vasc Pharmacol.* **2**, 81-93
- 101 Landino, L. M., Crews, B. C., Timmons, M. D., Morrow, J. D. and Marnett, L. J. (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 15069-15074
- 102 Moore, K. P., Darley-Usmar, V., Morrow, J. and Roberts, L. J., 2nd. (1995) Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res.* **77**, 335-341
- 103 Bachschmid, M. M. and van der Loo, B. (2005) A new "sunshine" in the vasculature? *Circulation.* **111**, 1571-1573
- 104 Iniguez, M. A., Cacheiro-Llaguno, C., Cuesta, N., Diaz-Munoz, M. D. and Fresno, M. (2008) Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem.* **114**, 201-209
- 105 Awtry, E. H. and Loscalzo, J. (2000) Aspirin. *Circulation.* **101**, 1206-1218
- 106 FitzGerald, G. A. (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov.* **2**, 879-890
- 107 Serhan, C. N. and Sheppard, K. A. (1990) Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest.* **85**, 772-780
- 108 Serhan, C. N., Sheppard, K. A. and Fiore, S. (1990) Lipoxin formation: evaluation of the role and actions of leukotriene A4. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* **20**, 54-62
- 109 Harris, R. E. (2007) Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. *Subcell Biochem.* **42**, 93-126
- 110 Marnett, L. J. and DuBois, R. N. (2002) COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **42**, 55-80
- 111 Uddin, M. J., Crews, B. C., Ghebreselasie, K., Huda, I., Kingsley, P. J., Ansari, M. S., Tantawy, M. N., Reese, J. and Marnett, L. J. Fluorinated COX-2 inhibitors as agents in PET imaging of inflammation and cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* **4**, 1536-1545
- 112 Adderley, S. R. and Fitzgerald, D. J. (1999) Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* **274**, 5038-5046
- 113 Tsai, A. L., Kulmacz, R. J., Wang, J. S., Wang, Y., Van Wart, H. E. and Palmer, G. (1993) Heme coordination of prostaglandin H synthase. *J Biol Chem.* **268**, 8554-8563
- 114 Dietz, R., Nastainczyk, W. and Ruf, H. H. (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G2. *Eur J Biochem.* **171**, 321-328
- 115 Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W. and Ruf, H. H. (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction. *Eur J Biochem.* **171**, 313-320
- 116 Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L. and Garavito, R. M. (2000) The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science.* **289**, 1933-1937
- 117 Lands, W., Lee, R. and Smith, W. (1971) Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins. *Ann N Y Acad Sci.* **180**, 107-122
- 118 Kulmacz, R. J. and Lands, W. E. (1983) Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *Prostaglandins.* **25**, 531-540
- 119 Thuresson, E. D., Lakkides, K. M. and Smith, W. L. (2000) Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products. *J Biol Chem.* **275**, 8501-8507
- 120 Kulmacz, R. J., Pendleton, R. B. and Lands, W. E. (1994) Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. Interpretation of reaction kinetics. *J Biol Chem.* **269**, 5527-5536
- 121 Gierse, J. K., Koboldt, C. M., Walker, M. C., Seibert, K. and Isakson, P. C. (1999) Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J.* **339 (Pt 3)**, 607-614

- 122 Lands, W. E., Sauter, J. and Stone, G. W. (1978) Oxygen requirement for prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins Med.* **1**, 117-120
- 123 Kozak, K. R., Rowlinson, S. W. and Marnett, L. J. (2000) Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* **275**, 33744-33749
- 124 Kozak, K. R., Prusakiewicz, J. J., Rowlinson, S. W., Schneider, C. and Marnett, L. J. (2001) Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *J Biol Chem.* **276**, 30072-30077
- 125 Chen, C. COX-2's new role in inflammation. *Nat Chem Biol.* **6**, 401-402
- 126 Salvemini, D., Seibert, K., Masferrer, J. L., Settle, S. L., Misko, T. P., Currie, M. G. and Needleman, P. (1995) Nitric oxide and the cyclooxygenase pathway. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* **23**, 491-493
- 127 Marnett, L. J., Wright, T. L., Crews, B. C., Tannenbaum, S. R. and Morrow, J. D. (2000) Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* **275**, 13427-13430
- 128 Goodwin, D. C., Landino, L. M. and Marnett, L. J. (1999) Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* **13**, 1121-1136
- 129 Goodwin, D. C., Gunther, M. R., Hsi, L. C., Crews, B. C., Eling, T. E., Mason, R. P. and Marnett, L. J. (1998) Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. *J Biol Chem.* **273**, 8903-8909
- 130 Sakuma, S., Fujimoto, Y., Katoh, Y. and Fujita, T. (2003) The effects of nitric oxide and peroxynitrite on the formation of prostaglandin and arachidonoyl-CoA formed from arachidonic acid in rabbit kidney medulla microsomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **68**, 343-349
- 131 O'Donnell, V. B., Coles, B., Lewis, M. J., Crews, B. C., Marnett, L. J. and Freeman, B. A. (2000) Catalytic consumption of nitric oxide by prostaglandin H synthase-1 regulates platelet function. *J Biol Chem.* **275**, 38239-38244
- 132 Upmacis, R. K., Deeb, R. S. and Hajjar, D. P. (1999) Regulation of prostaglandin H2 synthase activity by nitrogen oxides. *Biochemistry.* **38**, 12505-12513
- 133 Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 7240-7244
- 134 Kim, S. F., Huri, D. A. and Snyder, S. H. (2005) Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science.* **310**, 1966-1970
- 135 Goodwin, D. C., Landino, L. M. and Marnett, L. J. (1999) Reactions of prostaglandin endoperoxide synthase with nitric oxide and peroxynitrite. *Drug Metab Rev.* **31**, 273-294
- 136 van der Donk, W. A., Tsai, A. L. and Kulmacz, R. J. (2002) The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry.* **41**, 15451-15458
- 137 Nedelec, E., Abid, A., Cipolletta, C., Presle, N., Terlain, B., Netter, P. and Jouzeau, J. (2001) Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism. *Biochem Pharmacol.* **61**, 965-978
- 138 Deeb, R. S., Resnick, M. J., Mittar, D., McCaffrey, T., Hajjar, D. P. and Upmacis, R. K. (2002) Tyrosine nitration in prostaglandin H(2) synthase. *J Lipid Res.* **43**, 1718-1726
- 139 Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* **231**, 232-235
- 140 Blobaum, A. L. and Marnett, L. J. (2007) Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem.* **50**, 1425-1441
- 141 Marnett, L. J. (2002) Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 153-164
- 142 Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. and Simmons, D. L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 2692-2696

- 143 Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C. and Stallings, W. C. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. **384**, 644-648
- 144 Marnett, L. J. (2008) The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **49**, 265-290
- 145 Evans, G., Packham, M. A., Nishizawa, E. E., Mustard, J. F. and Murphy, E. A. (1968) The effect of acetylsalicylic acid on platelet function. *J Exp Med*. **128**, 877-894
- 146 Broos, K., De Meyer, S. F., Feys, H. B., Vanhoorelbeke, K. and Deckmyn, H. (2012) Blood platelet biochemistry. *Thromb Res*. **129**, 245-249
- 147 Jackson, S. P. (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. **109**, 5087-5095
- 148 De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., Broos, K., Salles, II and Deckmyn, H. (2008) Antiplatelet drugs. *Br J Haematol*. **142**, 515-528
- 149 Xiang, Y. Z., Xia, Y., Gao, X. M., Shang, H. C., Kang, L. Y. and Zhang, B. L. (2008) Platelet activation, and antiplatelet targets and agents: current and novel strategies. *Drugs*. **68**, 1647-1664
- 150 Reilly, I. A. and FitzGerald, G. A. (1987) Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood*. **69**, 180-186
- 151 Altman, R., Luciaridi, H. L., Muntaner, J. and Herrera, R. N. (2004) The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thromb J*. **2**, 1
- 152 Ferreira, A. M., Trostchansky, A., Ferrari, M., Souza, J. M. and Rubbo, H. (2008) Nitroalkenes: synthesis, characterization, and effects on macrophage activation. *Methods Enzymol*. **441**, 33-51
- 153 Trostchansky, A., O'Donnell, V. B., Goodwin, D. C., Landino, L. M., Marnett, L. J., Radi, R. and Rubbo, H. (2007) Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: a free radical mechanism of inactivation. *Free Radic Biol Med*. **42**, 1029-1038
- 154 Napolitano, A., Camera, E., Picardo, M., d'Ischia, M. (2000) Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: Formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1,3-pentadiene products. *J. Org. Chem.* **65**, 4853-4860.
- 155 Napolitano, A., Panzella, L., Savarese, M., Sacchi, R., Giudicianni, I., Paolillo, L., s'Ischia, M. (2004) Acid-induced structural modifications of unsaturated fatty acids and phenolic olive oil constituents by nitrite ions: a chemical assessment. *Chem Res Toxicol*. **17**, 1329-1337
- 156 in QTrap tutorials. MSCIEX-Applied Biosystems
- 157 van der Ouderaa, F. J., Buytenhek, M., Slikkerveer, F. J. and van Dorp, D. A. (1979) On the haemoprotein character of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Biochim Biophys Acta*. **572**, 29-42
- 158 Rowlinson, S. W., Crews, B. C., Lanzo, C. A. and Marnett, L. J. (1999) The binding of arachidonic acid in the cyclooxygenase active site of mouse prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). A putative L-shaped binding conformation utilizing the top channel region. *J Biol Chem*. **274**, 23305-23310
- 159 Rowlinson, S. W., Kiefer, J. R., Prusakiewicz, J. J., Pawlitz, J. L., Kozak, K. R., Kalgutkar, A. S., Stallings, W. C., Kurumbail, R. G. and Marnett, L. J. (2003) A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J Biol Chem*. **278**, 45763-45769
- 160 Prusakiewicz, J. J., Felts, A. S., Mackenzie, B. S. and Marnett, L. J. (2004) Molecular basis of the time-dependent inhibition of cyclooxygenases by indomethacin. *Biochemistry*. **43**, 15439-15445
- 161 Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. and Wolff, S. P. (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. **26**, 853-856
- 162 Jiang, Z. Y., Hunt, J. V. and Wolff, S. P. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*. **202**, 384-389
- 163 Berry, E. A. and Trumpower, B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem*. **161**, 1-15
- 164 Kalgutkar, A. S., Crews, B. C. and Marnett, L. J. (1996) Kinetics of the interaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs with prostaglandin endoperoxide synthase-1 studied by limited proteolysis. *Biochemistry*. **35**, 9076-9082

- 165 Jain, A. N. (2003) Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem.* **46**, 499-511
- 166 Welch, W., Ruppert, J. and Jain, A. N. (1996) Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chem Biol.* **3**, 449-462
- 167 Ruppert, J., Welch, W. and Jain, A. N. (1997) Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking. *Protein Sci.* **6**, 524-533
- 168 SYBYL8.1. (2008) Tripos Inc, 1699 Sourh Hanley Rd., St. Louis, MO 63144, USA
- 169 Gaussian09. (2009) Revision A.02, Gaussian Inc., Wallingford CT
- 170 Murphy, R. C., Barkley, R. M., Zemski Berry, K., Hankin, J., Harrison, K., Johnson, C., Krank, J., McAnoy, A., Uhlson, C. and Zarini, S. (2005) Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal Biochem.* **346**, 1-42
- 171 Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C. D., Mason, R. P. and Denicola, A. (2003) Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J Biol Chem.* **278**, 44049-44057
- 172 Monteiro, M. D., Goncalves, M. J., Sansonetty, F. and O'Connor, J. E. (2003) Flow cytometric analysis of calcium mobilization in whole-blood platelets. *Curr Protoc Cytom.* **Chapter 9**, Unit 9 20
- 173 Signorello, M. G., Segantin, A. and Leoncini, G. (2009) The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. *Biochim Biophys Acta.* **1791**, 1084-1092
- 174 Nadal-Wollbold, F., Pawlowski, M., Levy-Toledano, S., Berrou, E., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. (2002) Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Lett.* **531**, 475-482
- 175 Nadal, F., Levy-Toledano, S., Grelac, F., Caen, J. P., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. (1997) Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin α IIb β 3 in platelets. *J Biol Chem.* **272**, 22381-22384
- 176 Batchelor, R., Johnson, I., Beechem, J. (2003) A Fluorometric Assay for Cyclooxygenase Enzymes. In Presented at The Society for Biomolecular Screening: Portland, Oregon– September 21-25 ed.)[^]eds.)
- 177 Schildknecht, S., Heinz, K., Daiber, A., Hamacher, J., Kavakli, C., Ullrich, V. and Bachschmid, M. (2006) Autocatalytic tyrosine nitration of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **340**, 318-325
- 178 Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A. C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R. and Cayota, A. M. (1999) Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol.* **162**, 3356-3366
- 179 Pryor, W. (1982) Reaction of nitrogen dioxide with alkenes and polyunsaturated fatty acids: addition and hydrogen abstraction mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6685-6692
- 180 Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R., Ramani, R. and Freeman, B. A. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* **85**, 155-166
- 181 Petrovic, N. and Murray, M. (2009) Using N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) to assay cyclooxygenase activity in vitro. *Methods Mol Biol.* **594**, 129-140
- 182 Szewczuk, L. M., Forti, L., Stivala, L. A. and Penning, T. M. (2004) Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem.* **279**, 22727-22737
- 183 Smith, W. L., Garavito, R. M. and DeWitt, D. L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* **271**, 33157-33160
- 184 Copeland, R. A. (2000) Enzymes- Chapter 8
- 185 Blobaum, A. L. and Marnett, L. J. (2007) Molecular determinants for the selective inhibition of cyclooxygenase-2 by lumiracoxib. *J Biol Chem.* **282**, 16379-16390
- 186 Kelley, E. E., Batthyany, C. I., Hundley, N. J., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Del Rio, J. M., Schopfer, F. J., Lancaster, J. R., Jr., Freeman, B. A. and Tarpey, M. M. (2008) Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.* **283**, 36176-36184

- 187 Seibold, S. A., Ball, T., Hsi, L. C., Mills, D. A., Abeysinghe, R. D., Micielli, R., Rieke, C. J., Cukier, R. I. and Smith, W. L. (2003) Histidine 386 and its role in cyclooxygenase and peroxidase catalysis by prostaglandin-endoperoxide H synthases. *J Biol Chem.* **278**, 46163-46170
- 188 Landino, L. M., Crews, B. C., Gierse, J. K., Hauser, S. D. and Marnett, L. J. (1997) Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. *J Biol Chem.* **272**, 21565-21574
- 189 Seibold, S. A., Cerda, J. F., Mulichak, A. M., Song, I., Garavito, R. M., Arakawa, T., Smith, W. L. and Babcock, G. T. (2000) Peroxidase activity in prostaglandin endoperoxide H synthase-1 occurs with a neutral histidine proximal heme ligand. *Biochemistry.* **39**, 6616-6624
- 190 Shimokawa T., S. W. L. (1991) **Essential Histidines of Prostaglandin Endoperoxide Synthase.** *J. Biol. Chem.* **266**, 6168-6173
- 191 Nemeth, J. F., Hochgesang, G. P., Jr., Marnett, L. J. and Caprioli, R. M. (2001) Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry.* **40**, 3109-3116
- 192 Scott, W. A., Pawlowski, N. A., Murray, H. W., Andreach, M., Zrike, J. and Cohn, Z. A. (1982) Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J Exp Med.* **155**, 1148-1160
- 193 Yoon, W. J., Ham, Y. M., Yoo, B. S., Moon, J. Y., Koh, J. and Hyun, C. G. (2009) *Oenothera laciniata* inhibits lipopolysaccharide induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and proinflammatory cytokines in RAW264.7 macrophages. *J Biosci Bioeng.* **107**, 429-438
- 194 Murakami, A. and Ohigashi, H. (2007) Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer.* **121**, 2357-2363
- 195 Vane, J. R., Mitchell, J. A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J. and Willoughby, D. A. (1994) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 2046-2050
- 196 Maloney, C. G., Kutchera, W. A., Albertine, K. H., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. and Zimmerman, G. A. (1998) Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol.* **160**, 1402-1410
- 197 Rouzer, C. A., Ivanova, P. T., Byrne, M. O., Brown, H. A. and Marnett, L. J. (2007) Lipid profiling reveals glycerophospholipid remodeling in zymosan-stimulated macrophages. *Biochemistry.* **46**, 6026-6042
- 198 Spectre, G. and Varon, D. (2009) New antiplatelet agents. *Curr Opin Hematol.* **16**, 365-370
- 199 Sweatt, J. D., Blair, I. A., Cragoe, E. J. and Limbird, L. E. (1986) Inhibitors of Na⁺/H⁺ exchange block epinephrine- and ADP-induced stimulation of human platelet phospholipase C by blockade of arachidonic acid release at a prior step. *J Biol Chem.* **261**, 8660-8666
- 200 Yeung, J., Apopa, P. L., Vesci, J., Kenyon, V., Rai, G., Jadhav, A., Simeonov, A., Holman, T. R., Maloney, D. J., Boutaud, O. and Holinstat, M. (2012) Protein kinase C regulation of 12-lipoxygenase-mediated human platelet activation. *Mol Pharmacol.* **81**, 420-430
- 201 Yeung, J. and Holinstat, M. (2011) 12-lipoxygenase: a potential target for novel anti-platelet therapeutics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* **9**, 154-164
- 202 Kenyon, V., Rai, G., Jadhav, A., Schultz, L., Armstrong, M., Jameson, J. B., 2nd, Perry, S., Joshi, N., Bougie, J. M., Leister, W., Taylor-Fishwick, D. A., Nadler, J. L., Holinstat, M., Simeonov, A., Maloney, D. J. and Holman, T. R. Discovery of potent and selective inhibitors of human platelet-type 12- lipoxygenase. *J Med Chem.* **54**, 5485-5497
- 203 Johnson, E. N., Brass, L. F. and Funk, C. D. (1998) Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 3100-3105
- 204 Van Wauwe, J. and Goossens, J. (1983) Effects of antioxidants on cyclooxygenase and lipoxygenase activities in intact human platelets: comparison with indomethacin and ETYA. *Prostaglandins.* **26**, 725-730
- 205 Rho, M. C., Nakahata, N. and Ohizumi, Y. (1998) Two distinct effects of 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid on platelet aggregation by zoxanthellatoxin-A and ionomycin. *Jpn J Pharmacol.* **76**, 117-120
- 206 Mais, D. E., Saussy, D. L., Jr., Magee, D. E. and Bowling, N. L. (1990) Interaction of 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE and 5,12-diHETE at the human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor. *Eicosanoids.* **3**, 121-124

- 207 Kenyon, V., Rai, G., Jadhav, A., Schultz, L., Armstrong, M., Jameson J.B., Perry, S., Joshi, N., Bougie J.M., Leister W., Taylor-Fishwick D.A., Nadler J.L., Holinstat M., Simeonov A., Maloney D.J., Holman T.R. (2011) Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Human Platelet-Type 12- Lipoxygenase. *Journal of Medicinal Chemistry*. **54**, 5485-5497
- 208 Lapetina, E. G., Chandrabose, K. A. and Cuatrecasas, P. (1978) Ionophore A-23187- and thrombin-induced platelet aggregation: independence from cyclooxygenase products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **75**, 818-822
- 209 Fujita, M., Nakagawa, Y., Osawa, R., Kijima-Suda, I., Setaka, M., Nojima, S. and Tomita, K. (1994) Differences related to the production of arachidonic acid between collagen- and thrombin-stimulated human platelets. *J Biochem*. **116**, 269-273
- 210 Agwu, D. E., Holub, B. J., Johnstone, I. B. and Crane, S. (1983) Platelet aggregation in platelet suspensions from Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Can J Comp Med*. **47**, 203-206
- 211 Ignarro, L. J., ed. (2010) Nitric Oxide- Biology and Pathobiology. Chapter 1: "NO Concentration and Signal Transduction". pg 6. Academic Press
- 212 Blanco, F., Ferreira, A. M., Lopez, G. V., Bonilla, L., Gonzalez, M., Cerecetto, H., Trostchansky, A. and Rubbo, H. (2012) 6-Methylnitroarachidonate: a novel esterified nitroalkene that potently inhibits platelet aggregation and exerts cGMP-mediated vascular relaxation. *Free Radic Biol Med*. **50**, 411-418
- 213 Nishizuka, Y. (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*. **225**, 1365-1370
- 214 Newton, A. C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*. **9**, 161-167
- 215 Salzman, E. W. and Ware, J. A. (1989) Ionized calcium as an intracellular messenger in blood platelets. *Prog Hemost Thromb*. **9**, 177-202
- 216 Mellor, H. and Parker, P. J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*. **332 (Pt 2)**, 281-292
- 217 Marti, G. E., Magruder, L., Schuette, W. E. and Gralnick, H. R. (1988) Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. *Cytometry*. **9**, 448-455
- 218 Gilio, K., Harper, M. T., Cosemans, J. M., Konopatskaya, O., Munnix, I. C., Prinzen, L., Leitges, M., Liu, Q., Molkenkin, J. D., Heemskerk, J. W. and Poole, A. W. (2010) Functional divergence of platelet protein kinase C (PKC) isoforms in thrombus formation on collagen. *J Biol Chem*. **285**, 23410-23419
- 219 Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. **257**, 7847-7851
- 220 Baldassare, J. J., Henderson, P. A., Burns, D., Loomis, C. and Fisher, G. J. (1992) Translocation of protein kinase C isozymes in thrombin-stimulated human platelets. Correlation with 1,2-diacylglycerol levels. *J Biol Chem*. **267**, 15585-15590
- 221 Shibasaki, M. (2000) [Phorbols: chemical synthesis and chemical biology]. *Yakugaku Zasshi*. **120**, 76-90
- 222 Mosior, M. and Newton, A. C. (1996) Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry*. **35**, 1612-1623
- 223 Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2000) Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J Physiol*. **529 Pt 1**, 159-169
- 224 Holinstat, M., Boutaud, O., Apopa, P. L., Vesci, J., Bala, M., Oates, J. A. and Hamm, H. E. (2011) Protease-activated receptor signaling in platelets activates cytosolic phospholipase A2alpha differently for cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase catalysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **31**, 435-442
- 225 Patel-Hett, S., Richardson, J. L., Schulze, H., Drabek, K., Isaac, N. A., Hoffmeister, K., Shivdasani, R. A., Bulinski, J. C., Galjart, N., Hartwig, J. H. and Italiano, J. E., Jr. (2008) Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*. **111**, 4605-4616
- 226 Aharonovitz, O. and Granot, Y. (1996) Stimulation of mitogen-activated protein kinase and Na⁺/H⁺ exchanger in human platelets. Differential effect of phorbol ester and vasopressin. *J Biol Chem*. **271**, 16494-16499

- 227 Oancea, E., Teruel, M. N., Quest, A. F. and Meyer, T. (1998) Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol.* **140**, 485-498
- 228 Magallon, J., Chen, J., Rabbani, L., Dangas, G., Yang, J., Bussel, J. and Diacovo, T. (2011) Humanized mouse model of thrombosis is predictive of the clinical efficacy of antiplatelet agents. *Circulation.* **123**, 319-326
- 229 Rudolph, T. K., Rudolph, V., Edreira, M. M., Cole, M. P., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Franek, A., Pekarova, M., Khoo, N. K., Hasty, A. H., Baldus, S. and Freeman, B. A. (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **30**, 938-945
- 230 Trostchansky, A., Bonilla, L., Gonzalez-Perilli, L. and Rubbo, H. (2012) Nitro-Fatty Acids: Formation, Redox Signaling, and Therapeutic Potential. *Antioxid Redox Signal*
- 231 Groeger, A. L., Cipollina, C., Cole, M. P., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Freeman, B. A. and Schopfer, F. J. (2010) Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol.* **6**, 433-441
- 232 Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R. and Marnett, L. J. (2001) Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol.* **11**, 752-760
- 233 Burner, U., Furtmuller, P. G., Kettle, A. J., Koppenol, W. H. and Obinger, C. (2000) Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem.* **275**, 20597-20601

Producción científica en el marco de esta tesis

Artículos publicados en revistas internacionales arbitradas

“Regulation of Protein Kinase C by Nitroarachidonic Acid: Implications on human platelet activation”. *Bonilla L., O'Donnell V.B., Clark S., Rubbo, H., Trostchansky A. (2013)*. Archives in Biochemistry and Biophysics (ABB) (IN PRESS).

“Nitro fatty acids: Formation, Redox Signaling and Therapeutic Potential”. *Trostchansky A., Bonilla L., González-Perilli L., Rubbo H. (2012)*. Antioxidants Redox Signaling (ARS). ISSN: 1557-7716.

“Nitroarachidonic Acid: a novel peroxidase inhibitor of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase 1 and 2”. *Bonilla L., Trostchansky A., Thomas C.P., O'Donnell V.B., Marnett L.J., Radi R., Rubbo H. (2011)*. The Journal of Biological Chemistry (JBC). Vol 286; issue 15; pages 12891-900.

“6-Methyl Nitroarachidonate: a novel esterified nitroalkene which inhibits platelet aggregation and exerts cGMP mediated vascular relaxation”. *Blanco F, Ferreira A.M., López G.V., Bonilla L., González M., Cerecetto H., Trostchansky A., Migliaro E.R., Rubbo H. (2010)*. Free Radical Biology and Medicine (FRBM). Vol. 50; issue 3; pages 411-418.

Capítulos de libros

“Lipid Nitration”. *L. Bonilla* and *H. Rubbo*. Chapter VIII In “Principles of Free Radical Biomedicine, Volume I”. ISBN: 978-1-61209-773-2. Editores: K. Pantopoulos, H.M. Schipper, pp. (2011) Nova Science Publishers, Inc.

Exposiciones orales en congresos y jornadas

2011 “Enzymatic formation of nitroarachidonic acid and its signaling modulatory actions on human platelet activation”. 18th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology in Medicine (SFRBM). Atlanta, GA, Estados Unidos.

2011 “Efectos antiplaquetarios del ácido nitroaraquidónico por modulación de las enzimas ciclooxigenasa y PKC”. VII Encuentro de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM). Montevideo, Uruguay.

2011 “Nitroarachidonic Acid modulates human platelet activation through inhibition of PGHS and PKC”. VII Free Radical Biology Society Meeting (SFRBM)- South American Group. San Pablo, Brasil.

2010 “Inhibición de la activación plaquetaria por ácido nitroaraquidónico”. 1er Simposio CEINBIO: “Óxido Nítrico, Oxidantes y Antioxidantes en Sistemas Biológicos”. CEINBIO, Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay.

2009 “Ácido nitroaraquidónico: el primer inhibidor de la actividad peroxidasa en Prostaglandina Endoperoxido H sintasa 1 y 2”. VI encuentro de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM). Montevideo, Uruguay.

2009 “Nitration of arachidonic acid modulates prostaglandin H synthase-1 activity”. “Young Scientists Conesul Symposia” en el “XXXVIII Annual meeting of the brazilian society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)” San Pablo, Brazil.

Presentación de trabajos en formato poster

Y. Xu, Y. Gu, L. Bonilla, A. Trostchansky, H. Rubbo, R. Radi, S. Qian. "Free Radical-Based Inhibitory Effects of Nitric Oxide and Nitroarachidonic Acid on COX/AA Pathway". 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology in Medicine (SFRBM). San Diego, CA, Estados Unidos. 2012.

L. Bonilla, A. Trostchansky, A. Merlino, L.J. Marnett, H. Rubbo. " Interacción de la enzima ciclooxigenasa con ácido nitroaraquidónico: Rol de la His388". XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Maldonado, Uruguay. 2012.

M. Lamas, L. Bonilla, V.G. López, H. Rubbo, A. Ferreira. "Estudio de la capacidad del ácido nitroaraquidónico de activar al receptor nuclear PPAR-gamma". XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Maldonado, Uruguay. 2012.

L. Bonilla, V.B. O`Donnell, A. Trostchansky, H. Rubbo. "Efectos antiplaquetarios del ácido nitroaraquidónico por modulación de las enzimas ciclooxigenasa y PKC". VII Encuentro de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM). Montevideo, Uruguay. 2011.

A. Trostchansky, L. Bonilla, L. González, V.B. O`Donnell, H. Rubbo. "Nitroarachidonic Acid regulates Arachidonic Acid metabolism in vascular cells: differential role in Lipoxygenases and Cyclooxygenases". VII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)- South American Group. Sao Paulo, Brazil. 2011.

A. Merlino; S. Portillo; L. Bonilla; A. Trostchansky; H. Rubbo; E.L. Coitiño. "Insights into the mechanism of binding of nitro fatty acids to mammalian COX-2". 1st International Conference on Bioinformatics (SoIBio). Termas del Chillán, Chile. 2010.

L. Bonilla, A. Trostchansky, V. B. O`Donnell, L. J. Marnett, R. Radi, H. Rubbo. "Interaction of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase with the nitrated derivative of Arachidonic Acid". *3rd Latin American Protein Society Meeting*. Salta, Argentina. Octubre 2010.

L. Bonilla, C. Thomas, V. O`Donnell, H. Rubbo, A. Trostchansky. "Modulación de las vías ciclooxigenasa y lipoxigenasa por ácido nitro-araquidónico en plaquetas activadas". *XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB)*. Maldonado, Uruguay. Mayo 2010.

L. Bonilla, A. Trostchansky, V. B. O`Donnell, C. Batthyany, L. J. Marnett, R. Radi, and H. Rubbo. "Ácido nitroaraquidónico: el primer inhibidor de la actividad peroxidasa en prostaglandina endoperoxido H sintasa 1 y 2". *Primer encuentro nacional de ciencias químicas- PEDECIBA Química (ENACUI)*. Montevideo, Uruguay. Diciembre 2009.

L. Bonilla, A. Trostchansky, V. B. O`Donnell, C. Batthyany, L. J. Marnett, R. Radi, and H. Rubbo. "Nitroarachidonic acid: the first peroxidase inhibitor of Prostaglandin H Synthase 1 and 2". *16th meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)*. San Francisco, California. Noviembre 2009.

L. Bonilla, A. Trostchansky, V. B. O`Donnell, C. Batthyany, L. J. Marnett, R. Radi, and H. Rubbo. "Nitration of arachidonate leads to a novel mechanism for inhibition of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase". *VI Meeting of SFRBM South American Group- Free Radicals and Antioxidants in Chile*. Santiago, Chile. Setiembre 2009.

L. Bonilla, A. Trostchansky, V. B. O`Donnell, C. Batthyany, L. J. Marnett, R. Radi, H. Rubbo. "Nitration of arachidonic acid modulates prostaglandin H synthase-1 activity". *"XXXVIII Annual meeting of the brazilian society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)"* San Pablo, Brazil. Mayo 2009.