



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



CENUR  
Litoral Norte  
Salto

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Subárea Biofísica

PEDECIBA

Cinética preestacionaria de modificaciones oxidativas  
de ácidos nucleicos.

*Nitración de guanina por peroxinitrito: estudio cinético-termodinámico.*

Estudiante: Lic. Ana Gabriela Sánchez Reolon

Orientador: Dr. R. Daniel Peluffo

Co-orientadora: Dra. Deborah J. Keszenman

PDU de Biofísicoquímica

CENUR Litoral Norte, Salto – Universidad de la República

Febrero 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quisiera agradecer al Dr. R. Daniel Peluffo y a la Dra. Deborah J. Keszenman por guiarme en este camino de aprendizaje. Las enseñanzas han sido muchas, no sólo desde la escritura de este manuscrito, sino las charlas y discusiones sobre la temática, que han abarcado muchas horas y han sido por demás fructíferas.

A mi esposo Pablo y a mi madre Ana Gloria, porque su apoyo incondicional ha sido fundamental para la realización de esta tesis. A la familia que siempre está presente dando su apoyo, especialmente a Chunchina, Gustavo, Ana y Loreley.

A mis compañeras de PDU, Natalia, María José, Adriana y Valentina, siempre dispuestas a dar una mano para que las cosas salieran.

A las chicas de “Almuerzo CENUR”, porque han sido muy importantes en este transitar llamado tesis.

Por último, a todos los compañeros del Edificio Central y Partenón con los que he compartido charlas, mates y café.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
2. INTRODUCCIÓN .....	7
2.1 Un poco de historia sobre los ácidos nucleicos .....	7
2.2 Estructura de los ácidos nucleicos.....	7
2.2.1 Componentes de los ácidos nucleicos.....	8
2.2.2 Enlace fosfodiéster .....	11
2.2.3 Apareamiento de bases nitrogenadas .....	11
2.3 Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno .....	13
2.3.1 Radical superóxido .....	13
2.3.2 Óxido nítrico.....	13
2.3.3 Formación y reactividad de peroxinitrito .....	14
2.4 Daños nitro-oxidativos del ADN .....	16
2.4.1 Consecuencias moleculares y celulares de la formación de 8-NitroGua ..	19
2.5 Fundamentación de la investigación.....	21
3. OBJETIVOS .....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
4.1 Materiales .....	24
4.2 Protocolos experimentales.....	24
4.2.1 Caracterización de las soluciones de peroxinitrito y guanina .....	24
4.2.2 Cinética de formación de 8-NitroGua.....	27
4.3 Análisis termodinámico .....	28
4.4 Análisis estadístico .....	29
4.5 Diseño de estructuras químicas.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Evaluación del entorno fisicoquímico (pH y temperatura) para la reacción entre guanina y peroxinitrito.....	30
5.2 Cursos temporales de formación de 8-NitroGua.....	34
5.2.1 Formación de 8-NitroGua en función de la concentración de guanina .....	34
5.4.2 Formación de 8-NitroGua en función de la concentración de peroxinitrito	42
5.3 Curso temporal de decaimiento de ONOO <sup>-</sup> a pH 7,40 .....	48

5.4 Efecto de antioxidantes y atrapadores de radical hidroxilo en la cinética de formación de 8-NitroGua.....	53
5.5 Estudios de la estabilidad de 8-NitroGua.....	56
6. DISCUSIÓN .....	58
6.1 ADN desde una perspectiva numérica y flujo celular de peroxinitrito .....	58
6.2 Cinética de decaimiento de peroxinitrito .....	59
6.3 Formación de 8-NitroGua.....	61
6.4 Posibles mecanismos de nitración de guanina por peroxinitrito.....	66
6.5 Consistencia interna del análisis cinético.....	67
6.6 Estabilidad química de 8-NitroGua .....	70
7. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	73
7.1 Incidencia de la temperatura sobre el pH: buffers fosfato .....	73
7.2 Espectro de absorción de ONOO <sup>-</sup> y su estabilidad en 0,1 mM NaOH .....	74
7.3 Determinación del coeficiente de extinción molar de Gua .....	75
7.4 Ensayos control de nitración de Gua por ONOO <sup>-</sup> .....	76
7.5 Amplitudes de los ajustes biexponenciales para la formación de 8-NitroGua.	77
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## 1. RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN

La estabilidad del genoma es fundamental para la supervivencia de todo organismo. Cuando la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) supera la capacidad antioxidante de la célula, estas especies pueden producir modificaciones en los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos, que pueden alterar la fisiología celular. Dentro de las ERN se encuentra el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que se produce por la reacción controlada por difusión entre el óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) y el anión superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ). Una vez formado, el  $\text{ONOO}^-$  puede participar de reacciones de oxidación de uno y dos electrones con biomoléculas. Las bases nitrogenadas que componen el ADN, guanina (Gua), adenina (Ade), citosina (Cyt), y timina (Thy), son susceptibles de recibir o donar electrones dependiendo del entorno químico en el que se encuentren. Dadas las características químicas del  $\text{ONOO}^-$ , puede producir daño oxidativo, nitración y nitrosación en las bases nitrogenadas, cuya pérdida espontánea genera sitios abásicos. Los daños oxidativos del ADN son los más frecuentemente estudiados, sin embargo, aún no se ha profundizado en el conocimiento de la formación, persistencia y degradación de las lesiones de nitración. Por tanto, se propone como objetivo el estudio cinético y termodinámico de las reacciones de  $\text{ONOO}^-$  con bases de nucleótidos. Hemos comenzado la investigación enfocándonos en la base purica guanina dado que por su bajo potencial redox es la base del ADN más fácilmente oxidable en condiciones fisiológicas.

En el presente trabajo se estudió la formación de 8-Nitroguanina (8-NitroGua) mediante la reacción de peroxinitrito y sus productos de homólisis con la base Gua en un equipo de mezclado rápido de flujo detenido SX20 (Applied Photophysics) con un tiempo de mezcla de  $\sim 2$  ms. Los cursos temporales para la reacción de Gua y  $\text{ONOO}^-$  en tampón fosfato (pH 7,40) se registraron a temperaturas en el rango de 10 – 40°C. Nuestros resultados evidenciaron que la nitración de guanina presentó dos componentes cinéticos: un componente rápido (se completa en milisegundos) y un componente lento (se completa en segundos). Debido a que la concentración de  $\text{ONOO}^-$  decae con el tiempo, se estudió paralelamente su descomposición espontánea en nuestras condiciones experimentales. Se observó que el  $\text{ONOO}^-$  se descompone a anión  $\text{NO}_3^-$  siguiendo una cinética de primer orden con una constante

de velocidad similar a la observada para el componente lento de nitración. Por lo tanto, los resultados muestran que la formación de 8-NitroGua ocurre con una cinética bifásica y es limitada por la descomposición del peroxinitrito. El mecanismo de nitración parece incluir una combinación de efectos directos del  $\text{ONOO}^-$  y de sus intermedios radicalares sobre la Gua. Por otro lado, se observó ausencia de desnitración espontánea de 8-NitroGua durante al menos 4 horas, tanto a temperatura ambiente como a  $37^\circ\text{C}$ . Este comportamiento ha sido observado en oligodeoxinucleótidos, postulando a la 8-NitroGua como un marcador de daño de nitración de ADN por ERN. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la nitración de guanina por  $\text{ONOO}^-$  alcanza niveles significativos en unos pocos cientos de milisegundos en medios que reproducen condiciones fisiológicas, sugiriendo que el proceso es cinéticamente relevante *in vivo*. Por otro lado, la estabilidad y persistencia de la 8-NitroGua una vez formada, sugieren que ésta podría desempeñar un papel a largo plazo en la mutagénesis y el cáncer.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Un poco de historia sobre los ácidos nucleicos**

Desde el descubrimiento de la nucleína en 1869 por Friedrich Miescher (1), posteriormente denominada ácido nucleico, muchos investigadores han contribuido a descifrar su estructura y funcionamiento. A comienzos del siglo XX, Phoebus Levene descubrió el orden de los tres componentes principales de la unidad denominada nucleótido, fosfato – azúcar – base. Las contribuciones fundamentales que ayudaron a revelar la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) fueron dos: la Ley de Chargaff cuyo enunciado establece que en el ácido nucleico la proporción de adeninas es igual a la proporción de timinas, y por tanto la proporción de guaninas y citosinas son equivalentes (2); y el trabajo realizado por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins que determinó mediante cristalografía de rayos X la estructura helicoidal regularmente repetida del ADN (3, 4). Estos aportes permitieron a James Watson y Francis Crick proponer en 1953 la estructura molecular del ADN (5, 6).

El conocimiento sobre los ácidos nucleicos aportado por diversos investigadores en las siguientes décadas ha incrementado enormemente la comprensión del genoma humano. Su estudio ha permitido entender que su integridad y estabilidad son esenciales para la vida; sin embargo, agentes químicos, físicos y biológicos pueden atacarlo y cualquier daño resultante, si no es eficientemente reparado, puede llevar a la muerte celular, a mutaciones y posiblemente al cáncer (7).

### **2.2 Estructura de los ácidos nucleicos**

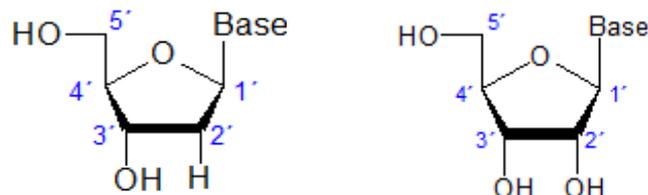
El estudio y conocimiento de las características estructurales de los ácidos nucleicos es esencial para comprender su función biológica. Según su composición química se clasifican en ácido ribonucleico (ARN) y ADN, presentando grandes similitudes entre ellos. En sus estructuras primarias ambos son polímeros lineales compuestos de monómeros llamados nucleótidos. Un nucleótido es la unidad mínima de repetición que consta de tres componentes distintos: el azúcar, la base

nitrogenada y el grupo fosfato. La base nitrogenada está unida al azúcar pentosa en la posición anomérica a través de un enlace  $\beta$  – glucosídico, dando lugar a un nucleósido. Los nucleósidos se polimerizan mediante la formación de un éster fosfato de uno de los grupos hidroxilo del azúcar pentosa. De esta forma, la cadena se mantiene unida por un esqueleto de azúcar – fosfato desde el cual se extienden las bases (8). La unión de dos nucleótidos se denomina dinucleótido, un ácido nucleico corto (menos de 50 monómeros) se refiere como oligonucleótido y los ácidos nucleicos largos se denominan polinucleótidos.

### 2.2.1 Componentes de los ácidos nucleicos

#### **2.2.1.1 El azúcar**

El ADN y el ARN presentan una molécula de pentosa que se ha cerrado formando un anillo furanosa de cinco miembros. La variación entre las estructuras presentes en el ADN y el ARN es la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroxilo en el segundo carbono del anillo. En el ADN, el azúcar pentosa es 2-desoxi-D-ribosa, mientras que en el ARN es D-ribosa (Figura 2.1).

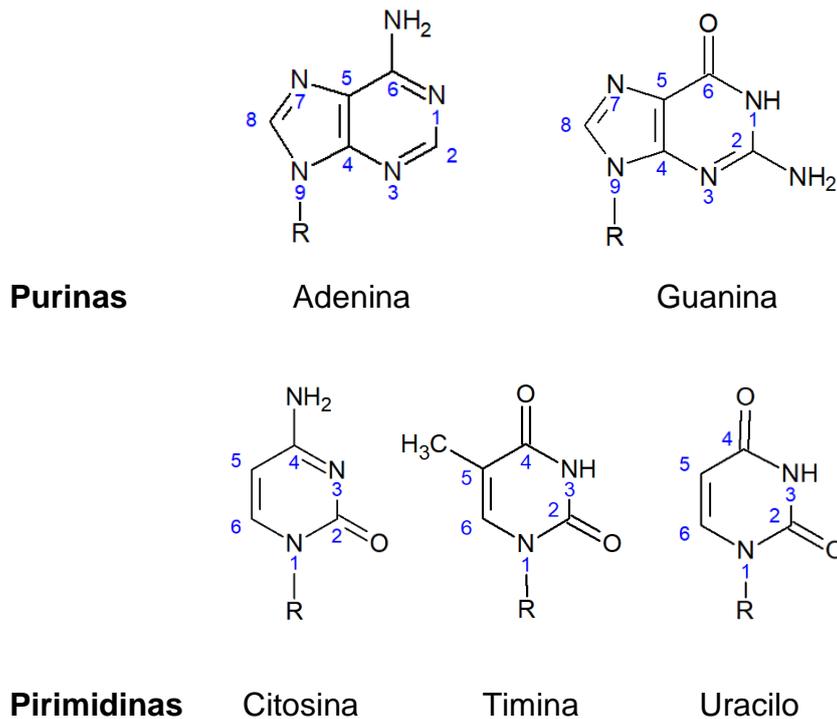


**Figura 2.1. Estructura de la pentosa en el ADN (izquierda) y ARN (derecha).**

#### **2.2.1.2 La base nitrogenada**

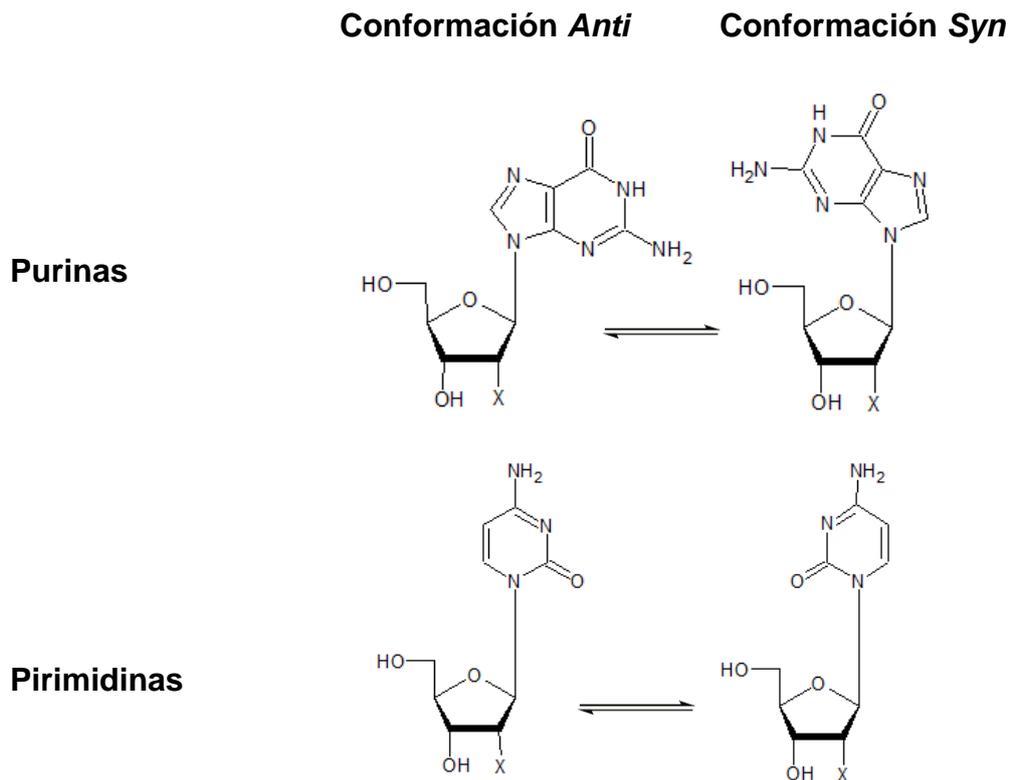
La base nitrogenada es el componente característico de los nucleósidos. Existen cinco bases en la naturaleza, tres son comunes a ADN y ARN: adenina (Ade), citosina (Cyt), y guanina (Gua), mientras que timina (Thy) y uracilo (Ura) difieren únicamente por la presencia de un sustituyente metilo, encontrándose respectivamente en el ADN y ARN.

Las bases pueden clasificarse en dos grupos basados en su estructura: purinas y pirimidinas. Las primeras son Gua y Ade siendo moléculas con dos ciclos, mientras que las pirimidinas son Cyt, Thy y Ura las cuales son moléculas con estructura monocíclica. La estructura química y el sistema de numeración para las bases se realiza acorde a la IUPAC-IUB (9). Los grupos anexados al anillo reciben el mismo número que la posición a la que están unidos (Figura 2.2).



**Figura 2.2. Bases nitrogenadas purinas y pirimidinas.**

El análisis de la estructura espacial del ADN evidencia que la base se encuentra en un plano perpendicular a la parte glucosídica. De hecho, la base puede adoptar una de las dos orientaciones principales en relación al enlace glucosídico (Figura 2.3). La conformación más estable y consecuentemente la más prevalente es la *anti*. En la conformación alternativa *syn*, la posición del enlace glucosídico es tal que la base se orienta arriba del anillo glucosídico lo que puede resultar en interacciones estéricas no favorables. (10).



**Figura 2.3. Conformación de nucleósidos *anti* (izquierda) y *syn* (derecha).**  
 La letra X representa tanto H como OH.

La barrera energética entre las conformaciones *anti* y *syn* en los desoxirribonucleósidos es inferior a  $42 \text{ kJ.mol}^{-1}$  y tiende a ser más baja con purinas que con pirimidinas. Cuando la guanina forma parte de un nucleósido, no se observa una mayor tendencia a adoptar la conformación *syn*. Ahora bien, siendo parte de un nucleótido sí lo hace, probablemente debido a la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo amino N2 y el fosfato 5' (11). Sustituciones en la posición C8 de una base púrica también puede dar lugar a la desestabilización de la conformación *anti*, provocando que la base adopte preferentemente la conformación *syn* (12). Estos importantes hallazgos brindan información sobre las preferencias conformacionales de los nucleósidos las cuales pueden afectar el apareamiento de bases (interacciones de enlaces de hidrógeno) debido a la introducción de impedimentos estéricos.

### 2.2.2 Enlace fosfodiéster

Los nucleótidos, formados por una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato (Figura 2.4), se encuentran unidos covalentemente tanto en el ADN como el ARN por grupos fosfato, donde el grupo fosfato 3'-hidroxilo (-OH) de un azúcar se une al grupo 5'-hidroxilo del siguiente nucleótido creando un enlace fosfodiéster (13). De esta forma, cada cadena de polinucleótidos tiene una polaridad química, con sus dos extremos químicamente diferentes (8). Así, el esqueleto covalente de los ácidos nucleicos consiste en grupos alternados de fosfato y pentosa, con las bases nitrogenadas como grupos laterales unidos al esqueleto a intervalos regulares. Los esqueletos tanto del ADN como del ARN son hidrófilos. Los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar forman enlaces de hidrógeno con el agua. Los grupos fosfato están cargados negativamente a pH 7, y las cargas negativas generalmente son neutralizadas por interacciones iónicas con cargas positivas en proteínas, iones metálicos y poliaminas (13).

### 2.2.3 Apareamiento de bases nitrogenadas

El modelo de apareamiento de bases más comúnmente encontrado en la naturaleza es el apareamiento de bases de tipo Watson y Crick (WC), el cual propone que la adenina se empareja con la timina, y la guanina con la citosina. Esta propuesta no sólo toma en cuenta la Ley de Chargaff, sino también los parámetros estructurales de la doble hélice determinada por cristalografía de rayos X (2, 5, 6).

Para el correcto reconocimiento y apareamiento, se requiere que las bases se encuentren predominantemente en sus formas tautoméricas ceto y amino (1). Los enlaces de hidrógeno involucrados en la formación de los pares de bases pueden considerarse como una interacción electrostática entre un protón y un dador de electrones, y juegan un rol clave en la estabilización de la estructura secundaria del ADN. La energía promedio de estos enlaces de hidrógeno está entre 6 – 10 kJ.mol<sup>-1</sup> (1). Cada par de bases se encuentra formado por una purina y una pirimidina (Figura 2.5). El acoplamiento canónico de WC se produce entre adenina y timina en el ADN y uracilo en el ARN, con la formación de dos enlaces de hidrógeno. En el caso de la guanina, se acopla con la citosina tanto en el ADN como en el ARN, a

través de la formación de tres enlaces de hidrógeno, lo que contribuye a que este par de bases sea termodinámicamente más estable. Ambos apareamientos se ajustan a los requisitos geométricos específicos, de ahí que cualquier secuencia podría acomodarse dentro del mismo marco de doble hélice (8).

Por otro lado, a través del estudio de estructuras cristalinas del ADN, Karst Hoogsteen (14) describió una disposición geométrica alternativa de enlaces de hidrógeno en el par A:T. De igual manera, el par G:C también puede formar un apareamiento alternativo al tipo WC. Los pares de bases de Hoogsteen requieren que la base rote sobre el enlace glucosídico de forma de utilizar la cara *syn* de la purina para generar enlaces de hidrógeno con la cara *anti* de la pirimidina (Figura 2.6). El par de bases Hoogsteen G:C difiere del de WC por dos razones, el nitrógeno N7 imidazol se utiliza para la formación de enlaces de hidrógeno, y la base citosina debe protonarse por lo que se forman solo dos enlaces de hidrógeno. Por tanto, las propiedades químicas de las bases nitrogenadas predichas por este modelo son significativamente diferentes a las del apareamiento de bases Watson y Crick.

#### Watson – Crick

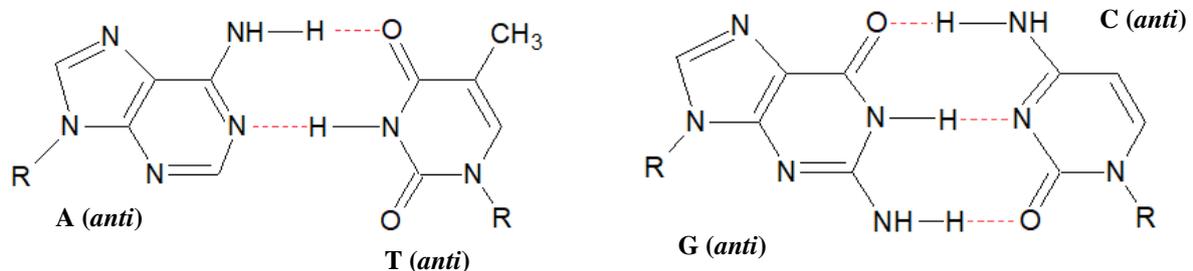


Figura 2.5. Pares de base Watson-Crick.

#### Hoogsteen

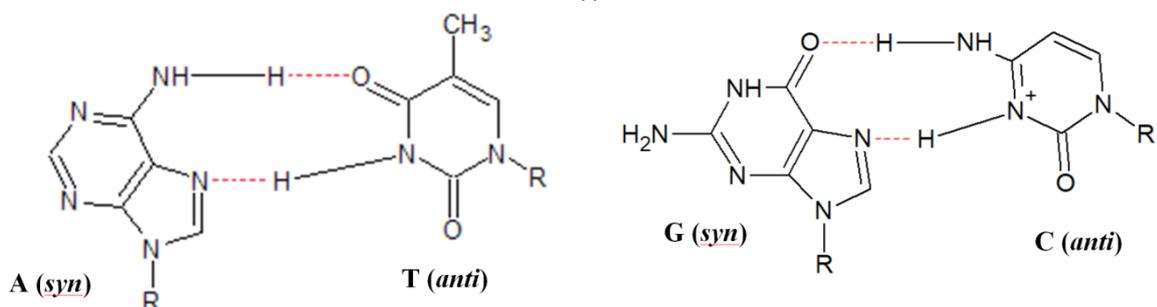


Figura 2.6. Pares de base Hoogsteen.

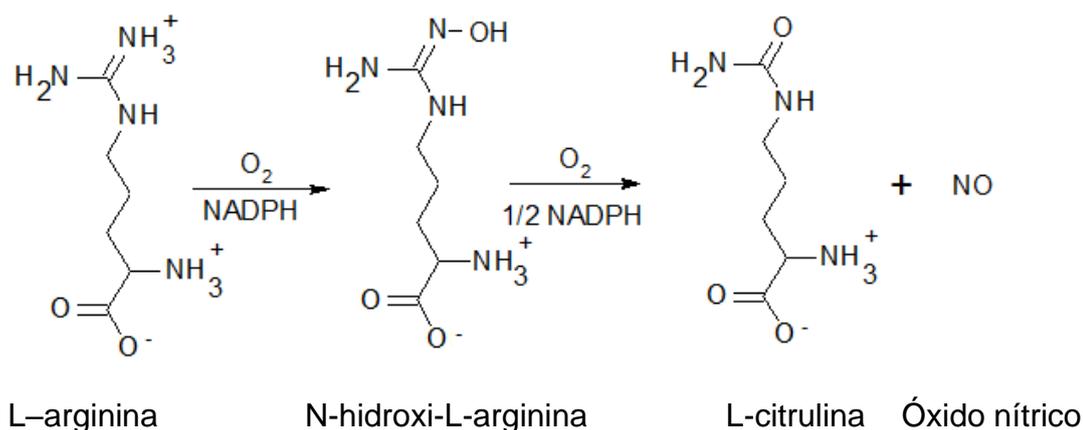
## **2.3 Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno**

### 2.3.1 Radical superóxido

El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es generado por la reducción monoelectrónica del oxígeno molecular ( $O_2$ ) (15). Es una especie radical poco reactiva, pudiendo actuar como agente reductor a pH neutro y oxidante a pH menores que su pKa (4,8) (16). Debido a su naturaleza aniónica, en condiciones fisiológicas el superóxido no atraviesa libremente las membranas biológicas (15). Sin embargo, estudios recientes en fagosomas de macrófagos (pH 5 a 6) muestran que concentraciones micromolares de  $O_2^{\cdot-}$  favorecen la acumulación de la forma neutra radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), la cual puede fácilmente permear membranas (17).

### 2.3.2 Óxido nítrico

Dentro de las especies reactivas del nitrógeno (ERN) se encuentra el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), el cual juega un rol esencial en muchos procesos biológicos, como ser la neurotransmisión (18), vasodilatación (19) y la respuesta inmune (20). El óxido nítrico es producido primariamente por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina y  $O_2$ , requiriendo la presencia de los cofactores: NADPH, FMN, FAD y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) para la isoforma inducible (iNOS) y además el complejo calcio-calmodulina (Ca-CaM) para las isoformas constitutivas endotelial y neuronal (eNOS y nNOS) (Figura 2.7) (21). Dado su pequeño tamaño y su naturaleza de radical hidrófobo no cargado, el  $NO^{\cdot}$  puede difundir fácilmente a través de membranas celulares y desempeñar su rol en cascadas bioquímicas (22).



**Figura 2.7. Síntesis de óxido nítrico por la enzima NOS.**

Determinaciones *in vivo* indican que la [NO<sup>\*</sup>] basal opera en el rango de 0,1 hasta 100 nM (este último en miocitos cardíacos) (23, 24). Por encima de estos valores fisiológicos es tóxico y por tanto su producción debe ser estrechamente controlada tanto espacial como temporalmente para minimizar sus efectos indeseados (25). Por la misma razón, también es fundamental conocer los procesos que median su desaparición. Así, los procesos que controlan el destino del NO<sup>\*</sup> en los sistemas biológicos incluyen difusión y su reacción con numerosos blancos celulares como grupos -SH, metales de transición y otros radicales libres, como el superóxido, para formar anión peroxinitrito (26).

### 2.3.3 Formación y reactividad de peroxinitrito

Una gran proporción de los efectos indirectos del NO<sup>\*</sup> son mediados por la formación de peroxinitrito<sup>a</sup>. La principal vía de formación de anión peroxinitrito en los sistemas biológicos es la reacción controlada por difusión entre los radicales óxido nítrico y anión superóxido. Su constante de velocidad determinada por diversas metodologías se encuentra en el rango 4 – 16 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> en distintos diseños experimentales (27) (Esquema 2.1).

<sup>a</sup> El término peroxinitrito se utiliza para hacer referencia a la suma de anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y su ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH); la IUPAC recomienda oxoperoxonitrato (-1) y oxoperoxonitrato de hidrógeno, respectivamente (28).



**Esquema 2.1. Formación de anión peroxinitrito.**

El  $\text{ONOO}^-$  es un ión estable a pH alcalino. Como todo ácido débil, en solución acuosa este anión se encuentra en equilibrio con su forma no disociada, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ,  $\text{pK}_a = 6,8$  a  $37^\circ\text{C}$ ). En condiciones fisiológicas (pH 7,4), el 80% del  $\text{ONOOH}$  se encuentra en su forma aniónica, por tanto, ambas especies estarán presentes en diferentes proporciones dependiendo del pH local (29). Se observa que en ausencia de blancos de reacción, el  $\text{ONOO}^-$  es relativamente estable, mientras que el  $\text{ONOOH}$  decae rápidamente por homólisis de su enlace *peroxo* a ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y un 30% a dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) y radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Esquema 2.2) (30-32).



**Esquema 2.2. Homólisis del ácido peroxinitroso.**

Si el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es atrapado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) se convierte en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  siendo la velocidad de esta reacción de  $(1,6 - 2,3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7,0 y temperatura ambiente ( $20 - 25^\circ\text{C}$ ) (33, 34). Considerando las constantes de velocidad para la reacción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con SOD y con  $\text{NO}^\bullet$ , se observa que el peroxinitrito se formará a una velocidad mayor de la que la SOD puede eliminar el radical superóxido.

La reacción entre  $\text{ONOO}^-$  y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es una de las reacciones más importantes en los sistemas biológicos puesto que puede formar radicales tóxicos. Esta reacción da como resultado la formación de anión nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) con una constante de velocidad de  $5,8 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$  (35). Bajo condiciones *in vivo*, la formación de radical carbonato es más probable que ocurra dada la continua formación metabólica de  $\text{CO}_2$  en tejidos de mamíferos, donde los niveles de  $\text{CO}_2$  en equilibrio con bicarbonato se aproximan a  $1 - 2 \text{ mM}$  en ambos compartimentos, intracelular y extracelular (36). Debido a que el anión  $\text{ONOOCO}_2^-$  es altamente inestable sufrirá homólisis de su enlace peroxo

para formar un par radical geminado confinado dentro de una jaula de solvente,  $\{\text{NO}_2^\cdot; \text{CO}_3^{\cdot-}\}$  (radical carbonato y radical dióxido de nitrógeno). Este par radical puede o bien recombinar en la jaula para dar nitrato o bien difundir a la solución general (36, 37).

El  $\text{ONOO}^-$  es una especie altamente reactiva que causa la rápida oxidación de grupos sulfhidrilo y tioésteres. También produce la nitración e hidroxilación de compuestos aromáticos, como tirosina, triptófano y fenilalanina (38, 39), por acción directa o a través de la reacción con  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  y  $\text{NO}_2^\cdot$  mediante la formación de sus radicales aminoacídicos (27). Así, el  $\text{ONOO}^-$  es responsable de la nitración de los anillos aromáticos de residuos de tirosina en proteínas para formar 3-nitrotirosina la cual se utiliza en la actualidad como marcador tisular de daño mediado por  $\text{ONOO}^-$  (40, 41). No obstante, investigaciones *in vivo* revelan que no toda la 3-nitrotirosina formada es producto de peroxinitrito (42, 43). Más aún, dado que la nitración de tirosina es mediada por reacción radicalar también se observa la formación de productos secundarios como 3,3'-ditirosina (27). Siendo el  $\text{ONOO}^-$  un oxidante y nucleófilo puede producir daño en macromoléculas, incluyendo los ácidos nucleicos.

## 2.4 Daños nitro-oxidativos del ADN

A nivel celular las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno pueden ser de origen exógeno o endógeno, siendo estas últimas generadas durante el metabolismo celular normal en condiciones aeróbicas. La exposición del ADN a dichas especies reactivas puede producir daños en sus componentes fundamentales. Si los daños no son apropiadamente reparados o persisten pueden dar lugar no sólo a eventos letales sino también a mutagénesis, inestabilidad genómica y transformación maligna, procesos que juegan un rol fundamental en la iniciación y promoción de la carcinogénesis (44, 45).

Las cuatro bases nitrogenadas que componen el ADN (Gua, Ade, Cyt y Thy), son susceptibles a recibir o donar electrones dependiendo del entorno químico en el que se encuentren. La tendencia que posee una molécula de ser aceptor o dador de electrones se determina calculando su potencial de óxido-reducción (redox). Es interesante que en el caso de las bases nitrogenadas solo se han reportado hasta el



combinación del radical  $\text{NO}_2^\cdot$  con la posición C8 de  $\text{Gua}(-\text{H})^\cdot$  produciendo 8-NitroGua. Por otro lado, si el centro radical se encuentra en la posición C5 se produce finalmente NI (51).

En el caso de los nucleósidos, la reacción tanto de guanosina (Guo) como de dGuo con el radical hidroxilo presenta una velocidad que es controlada por difusión con una constante de velocidad de  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH fisiológico 7,34 – 7,45 (52). El estudio experimental de las modificaciones químicas de la Gua evidencia la producción de 8-Hidroxi guanina (8-OxoGua), siendo esta una modificación altamente mutagénica y la más frecuentemente hallada en los cánceres humanos (53). Específicamente, el mecanismo mutagénico se produce por la formación de un enlace entre 8-OxoGua y adenina durante la replicación del ADN, dando origen a una transversión de G:C a T:A (54). Se ha descrito que el nivel basal de 8-OxoGua es de 12 cada  $10^6$  bases (55). Por otro lado, un estudio realizado en individuos fumadores sugiere que el ADN contiene niveles bajos de 8-NitroGua (25 cada  $10^6$  bases), mientras que en grandes fumadores y pacientes con cáncer de pulmón los niveles son significativamente superiores ( $\sim 1500 - 1800$  cada  $10^6$  bases) (56).

Se ha observado que la reacción del  $\text{ONOO}^-$  con ADN nativo en solución acuosa a pH 7,5 – 7,8, genera enlaces cruzados de G:T (pero no de G:A) y productos de nitración/oxidación de Gua, incluyendo: 8-NitroGua, NI, 8-OxoGua, espiroiminodihidantoina (Sp), y 5-guanidinohidantoina (Gh). El compuesto Sp se genera en medios alcalinos, mientras que Gh se produce en condiciones ácidas (57, 58). Por otro lado, adenosina (Ado) y dAdo también reaccionan con  $\text{ONOO}^-$  y sufren nitración en C8 y posiblemente también en C2. Sin embargo, a diferencia de Guo o dGuo, Ado y dAdo experimentan una extensa oxidación en la posición C8. A medida que el pH de la reacción disminuye, la cantidad de oxidación en C8 mediada por  $\text{ONOO}^-$  aumenta tanto para Ado y dAdo como para Guo y dGuo. No obstante, la formación de 8-NitroGua a partir de dGuo no se ve favorecida con la disminución del pH (59). A pesar de la existencia de determinaciones cualitativas y cuantitativas de las especies arriba mencionadas, la bibliografía relacionada no brinda información mecanística sobre tales modificaciones.

#### 2.4.1 Consecuencias moleculares y celulares de la formación de 8-NitroGua

El estudio de las condiciones fisicoquímicas para la formación de 8-NitroGua mediada por  $\text{ONOO}^-$  evidencia que el pH óptimo para su formación es aproximadamente 8,0. De hecho, se reporta un aumento en la concentración de 8-NitroGua a medida que el pH aumenta de 4,0 a 8,0, pero la misma disminuye en forma drástica en el intervalo de pH de 8,5 a 10,0 (41). Ohshima y cols. reportan un rendimiento de 8-NitroGua de 6% cuando concentraciones equimolares de Gua y  $\text{ONOO}^-$  se incuban a pH 7,5 y temperatura ambiente (56). La incorporación de un grupo nitro en la Gua provoca la desestabilización del par de base 8-NitroGua:C provocando un cambio en la conformación. Este cambio conformacional provoca que 8-NitroGua pueda formar dos enlaces de hidrógeno con la base opuesta, en vez de tres. Como resultado, el ADN sufre depurinación espontánea de 8-NitroGua, formándose un sitio abásico (ABS). Una vez liberada la base, las polimerasas posiblemente incorporen adenina frente al sitio abásico, provocando una transversión  $G \rightarrow T$  (60, 61). La resolución de los sitios abásicos generados por depurinación por el mecanismo de reparación por escisión de bases podría dar lugar también a la reparación con baja probabilidad de error pero esta posibilidad no ha sido aún estudiada en profundidad (60, 62).

En condiciones de pH próximas a la neutralidad (pH 7,4), el monodesoxinucleósido guanosina (dGuo) es el más vulnerable de ser atacado por el  $\text{ONOO}^-$  seguido por el ADN de simple hebra y por último el ADN de doble hebra (63). Más aún, se ha observado la incorporación en el ADN de 8-NitroGua formando parte del pool de nucleótidos. Esto, en consecuencia, puede dar lugar a la aparición de mutaciones por la incorporación de bases modificadas (56). La velocidad de degradación de 8-Nitrodesoxiguanosina (8-NitrodGuo) observada en un oligodesoxinucleótido sintético fue de 1,6%/h (vida media = 31 h) a 25°C (64). Sin embargo, otros autores reportan una vida media de ~6 min a 25°C cuando está presente en un monodesoxinucleósido (63). La vida media de depurinación de 8-NitroGua se estima en 1,6 h a 37°C en ADN de hebra simple, mientras que en ADN doble hebra se reporta de 2,4 h a 37°C. Esta depurinación da lugar a la formación de un ABS potencialmente mutagénico (63, 64). Si los sitios abásicos no son correctamente procesados, pueden generar roturas de cadena simple en el ADN. También, se ha reportado que a pH ácido se inducen significativamente más roturas

de simple hebra que a pH neutro o alcalino, sugiriendo que el ácido peroxinitroso o los intermediarios similares al radical hidroxilo son responsables del daño (39).

#### 2.4.1.1 Mecanismos de defensa antioxidante

Las células han desarrollado sistemas de defensa de manera que los radicales libres derivados del oxígeno y nitrógeno puedan ser transformados a productos de escasa o nula toxicidad. Por tanto, la protección celular no solo comprende la captura de los intermediarios tóxicos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones que generan (65). El equilibrio en las células de las especies radicales y no radicales derivadas del oxígeno y del nitrógeno puede ser controlado por mecanismos de defensa antioxidante para eliminar estas especies. Los antioxidantes celulares pueden agruparse en: enzimáticos, que incluyen una variedad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasas (GPx), catalasas (CAT), y peroxirredoxinas (Prx) (66, 67), y antioxidantes no enzimáticos endógenos y exógenos capaces de evitar su propagación, como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, coenzima Q, glutatión (GHS), carotenoides, y flavonoides que son capaces de reaccionar con las especies reactivas oxidándose ellos mismos (68, 69).

#### 2.4.1.2 Mecanismos de reparación del ADN

La reparación del daño del ADN es vital para el mantenimiento de la estabilidad genómica durante el estrés oxidativo. Algunos productos oxidados de Gua son reconocidos por ADN glicosilasas, las cuales pertenecen a familias de enzimas que reconocen lesiones específicas como la ADN formamidopirimidina glicosilasa (Fpg) de bacterias y la 8-OxoGua glicosilasa humana (hOGG1). Estas enzimas presentan dos actividades: N-glicosilasa y AP-liasa y forman parte del mecanismo de reparación por escisión de bases (BER, del inglés) (70). A través de su actividad glicosilasa, generan un sitioapurínico / apirimidínico (AP) debido a que escinden la base púrica oxidada, mientras que con su actividad AP-liasa cortan los extremos 3' y 5' del sitio AP, dejando una hendidura del tamaño de una base (71, 72). Durante la replicación, la presencia de una lesión como la 8-OxoGua produce

el *bypass* de la base modificada y se incorpora una adenina al otro lado de la lesión. En consecuencia se observa un proceso de replicación que conlleva a un mecanismo propenso a error (50). Por otro lado, el homólogo eucariota de Fpg llamado NEIL1 actúa pobremente sobre 8-OxoGua, pero sí reconoce y procesa sus productos de oxidación: spiroiminodihidantoina (Sp) y guanidinohidantoina (Gh). El estudio de los mecanismos de reparación de estas lesiones en el ADN plantea que son buenos sustratos para la reparación por escisión de bases y de la reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés). Es así que los productos: 8-OxoGua, Sp y Gh pueden ser procesados por ambas vías NER y BER compitiendo entre ellas, mientras que NI puede repararse únicamente por BER (50). Hasta el momento, el mecanismo descrito para la corrección de la base 8-NitroGua es la depurinación espontánea. La naturaleza mutagénica de 8-NitroGua resulta de la generación de un sitio abásico y de su apareamiento incorrecto llevando una transversión G → T como explicado en 2.4.1 (73). De hecho, no se conoce aún un mecanismo enzimático que reconozca la lesión 8-NitroGua (56) así como otros mecanismos de procesamiento de estas lesiones aún no han sido dilucidados (60, 62).

## 2.5 Fundamentación de la investigación

El daño oxidativo del ADN se ha estudiado extensamente, sin embargo, aún hoy existe una brecha en el conocimiento sobre el daño por estrés de nitración. Se han utilizados diversos abordajes para identificar y/o cuantificar la cantidad de bases nitradas en el ADN, como por ejemplo mediante inmunohistoquímica (74), electroforesis de ADN (64) y derivatización química acoplada en línea a extracción en fase sólida en cromatografía líquida con espectrometría de masa en tándem (75). Si bien se conocen las reacciones del peroxinitrito con componentes del ADN mayoritariamente estudiadas en Gua, dGuo y productos de oxidación de Gua, los datos son limitados y resultan de estudios comparativos entre las reacciones de oxidación y nitración. Más aún, a partir de la bibliografía consultada se observa que hasta el momento no se encuentra información disponible sobre las cinéticas de formación de productos nitrados y sus derivados en condiciones fisiológicas. Estos datos son importantes para establecer el marco temporal de estas reacciones de

nitración las cuales son potencialmente generadoras de daño en el ADN. Además, abrirían la puerta hacia la profundización en la comprensión de los mecanismos de reparación involucrados en el procesamiento de dichas lesiones buscando enzimas de reconocimiento específico capaces de detectar bases nitradas, así como sus velocidades de procesamiento. Las modificaciones sufridas por las bases pueden provocar alteraciones en el material genético, comprometiendo no solo la viabilidad celular e integridad del genoma, sino también constituir un mecanismo de regulación de la expresión génica.

Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación propone estudiar cuantitativamente los aspectos cinético-termodinámicos de la reacción de nitración de guanina por peroxinitrito.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Bajo la hipótesis de que la reacción de bases púricas con especies productoras de modificaciones nitrantes como el  $\text{ONOO}^-$  ocurre en un marco temporal compatible con (y posiblemente determina) la aparición de lesiones genómicas, se propone como objetivo general estudiar las cinéticas de formación y desaparición de 8-Nitroguanina.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar para la base nitrogenada guanina y en presencia de  $\text{ONOO}^-$  el comportamiento de las reacciones a pH, temperatura y concentraciones seleccionadas.
2. Cuantificar los cursos temporales de nitración y degradación en función de la concentración de guanina.
3. Cuantificar los cursos temporales de nitración y degradación en función de la concentración de peroxinitrito.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

Se utilizó la base guanina (Gua), peso molecular 151,1 g.mol<sup>-1</sup> adquirida en MP Biomedicals (EEUU). El peroxinitrito de sodio empleado en los experimentos fue gentilmente donado por el Prof. Dr. Rafael Radi (Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR). El mismo se sintetizó en un reactor de flujo detenido a partir de NaNO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acidificado con HCl, y el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanente se eliminó tratando la solución stock con MnO<sub>2</sub> granular. Para su utilización se controló que el contenido de nitrito fuera menor a 20%, en relación a peroxinitrito (76). Los reactivos de grado analítico para la preparación de las disoluciones de trabajos fueron: fosfato de sodio monobásico y dibásico (Avantor Performance Materials, México), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) (Applichem, España), hidróxido de sodio (Biopack, Argentina) y ácido clorhídrico (HCl) (Laboratorio Cicarelli, Argentina). Los siguientes reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (USA): cloruro de sodio, dióxido de manganeso, manitol y ácido L-ascórbico. Se adquirió el dimetilsulfóxido en Carlo Erba (Italia) y el glutatión reducido en Merck (Alemania). Todas las disoluciones fueron preparadas en agua ultrapura desionizada para evitar la contaminación con metales traza. Se utilizó agua fresca y hervida en cada preparación y las soluciones de trabajo se sonicaron inmediatamente antes de su uso para desgasearlas (77).

### 4.2 Protocolos experimentales

#### 4.2.1 Caracterización de las disoluciones de peroxinitrito y guanina

##### 4.2.1.1 Cuantificación de anión peroxinitrito

La solución stock de ONOO<sup>-</sup> en 1 M NaOH se dividió en alícuotas y almacenó a -80°C. Previo a cada experimento se determinó la concentración de ONOO<sup>-</sup> en la alícuota por espectrofotometría de absorción UV-Visible a 302 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV1800 (Japón). El cálculo de la concentración se realizó aplicando la expresión lineal de la Ley de Lambert-Beer:

$$\text{Abs} = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

donde Abs es la absorbancia de la molécula,  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar, b es el camino óptico ( $b = 1 \text{ cm}$ ) y C la concentración molar del compuesto. Hughes y Nicklin (78) han reportado el coeficiente de extinción molar del peroxinitrito en solución acuosa alcalina en  $1670 \pm 50 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a dicha longitud de onda (78). La concentración de  $\text{ONOO}^-$  se determinó tomando una dilución 1/100 en  $\text{ONOO}^-$  en 0,1 mM NaOH.

#### 4.2.1.2 Espectro de absorción y estabilidad de $\text{ONOO}^-$

Se realizó el espectro de absorción de 1 mM  $\text{ONOO}^-$  en una solución de 100 mM NaCl y 0,1 mM DTPA en agua desionizada. A partir de su representación gráfica se identificó la longitud de onda que corresponde al máximo de absorción, y la dispersión porcentual de la absorbancia centrada en el máximo.

La estabilidad de  $\text{ONOO}^-$  en 0,1 mM NaOH se determinó mediante estudios de decaimiento. Se obtuvieron los cursos temporales de decaimiento de 1 mM de  $\text{ONOO}^-$  utilizando el espectrofotómetro Shimadzu UV1800 en un volumen final de 2 mL durante 120 s. A los datos obtenidos se les ajustó una ecuación exponencial decreciente y se obtuvo un valor de  $k = 0,33 \text{ min}^{-1}$  con un  $t_{1/2} = 2,10 \text{ min}$ . Los tiempos de manipulación previos al llenado de la jeringa B para comenzar la reacción fueron menores a 10 s. De acuerdo al patrón de decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en 0,10 mM NaOH la pérdida de concentración nominal fue menor al 5 %, y la concentración inicial del anión no fue corregida.

#### 4.2.1.3 Decaimiento de $\text{ONOO}^-$ en función del pH y la temperatura

Se estudió el decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en solución amortiguadora por espectrofotometría de absorción UV-Vis. Se utilizó buffer fosfato de sodio 0,1 M en el rango de pH: 7,0, 7,4 y 8,0. El pH de cada solución buffer fue medido utilizando un pH-metro Accumet AB15 (exactitud relativa  $\pm 0,01$ ) en baño termostático (PolyScience, estabilidad de temperatura  $\pm 0,04^\circ\text{C}$ ) a temperaturas: 18, 23, 28 y  $33^\circ\text{C}$ . Los cursos temporales de decaimiento de 1 mM  $\text{ONOO}^-$  se realizaron en

espectrofotómetro Shimadzu UV1800 con control de temperatura en un volumen final de 2 mL durante 120 s.

#### 4.2.1.4 Descomposición de ONOO<sup>-</sup> a pH fisiológico

Los registros de decaimiento de ONOO<sup>-</sup> se realizaron en un equipo de mezclado rápido y flujo detenido SX20 Applied Photophysics (Leatherhead, Inglaterra) con un tiempo de mezclado de ~2 ms y un camino óptico de 1 cm. La descomposición de ONOO<sup>-</sup> fue seguida a 302 nm, en el intervalo de temperatura 10 – 40°C ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ) usando un termocirculador PolyScience (estabilidad de temperatura  $\pm 0,04^\circ\text{C}$ ) acoplado al sistema SHU (Sample Handling Unit) que administra las jeringas. En la jeringa A se colocó 200 mM buffer fosfato (2X: corresponde al doble de la molaridad final por el efecto de dilución en la celda óptica), 100 mM NaCl, 0,1 mM DTPA (quelante de metales). De aquí en adelante se denomina solución FND a la solución conteniendo 100 mM buffer fosfato, 100 mM NaCl y 0,1 mM DTPA. En la jeringa B se ensayaron concentraciones de ONOO<sup>-</sup> 2X para concentraciones finales de 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$ , diluidas en 100 mM NaCl, 0,1 mM DTPA y 0,1 mM NaOH. La fuerza iónica de la solución de mezcla fue de  $I = 0,2$ . Para el estudio cinético se mantuvo una relación de volúmenes 1:1, con tiempos de adquisición de 1,0 y 5,0 s.

#### 4.2.1.5 Espectro de absorción de guanina a pH 7,40

Se realizaron espectros de absorción de guanina a concentraciones crecientes (10, 20, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) en solución FND determinando sus distintos máximos de absorción. A partir de sus representaciones gráficas se identificaron las longitudes de onda que corresponden a sus máximos de absorción en nuestras condiciones experimentales, y se determinaron los coeficientes de extinción molar a cada  $\lambda_{\text{máx}}$ .

## 4.2.2 Cinética de formación de 8-NitroGua

### 4.2.2.1 Reacción de ONOO<sup>-</sup> con Guanina

Se estudió la formación de 8-NitroGua utilizando un equipo de mezclado rápido y flujo detenido SX20 Applied Photophysics. Los registros se realizaron a  $\lambda = 396$  nm, que corresponde al máximo de absorción reportado para 8-NitroGua (41). Se realizaron ensayos de dependencia de concentración de Gua y ONOO<sup>-</sup> manteniendo constante el otro reactivo en el rango de temperaturas (10 – 40)°C. A la solución FND contenida en la jeringa A se le agregó la solución de Gua (a concentración 2X por efecto de dilución). La jeringa B presentó la misma composición usada en el estudio de decaimiento de ONOO<sup>-</sup> (sección 4.2.1.4). Las soluciones se prepararon a partir de soluciones stock y se sonicaron inmediatamente antes de cada experimento. Los compuestos a estudiar se agregaron al comienzo de las determinaciones y se utilizó una relación 1:1 de volúmenes. La fuerza iónica de la solución de mezcla fue de  $I = 0,2$ . Una vez finalizada la reacción se registró una variación de pH de 7,40 a 7,42 – 7,60, dependiendo de la concentración de guanina usada. Los cursos temporales de formación se siguieron por 1,0, 5,0 y 10,0 segundos.

### 4.2.2.2 Estudio de la estabilidad de 8-NitroGua

El estudio de estabilidad de 8-NitroGua se realizó a 25 y 37°C en solución FND utilizando el espectrofotómetro UV-Vis a 396 nm. La reacción se llevó a cabo en celda de cuarzo en volumen final de 3 mL en presencia de 200  $\mu$ M Gua y 400  $\mu$ M ONOO<sup>-</sup>. Se registró la absorbancia por 60 segundos cada 0,2 s y, a partir del minuto, cada 0,5 h durante 4 h.

### 4.2.2.3 Estimación del coeficiente de extinción molar de 8-NitroGua

Se realizaron dos tipos de ensayos para la estimación del coeficiente de extinción molar de 8-NitroGua, uno a concentración fija de ONOO<sup>-</sup> y variando la concentración de Gua, y otro manteniendo una relación de concentración entre ONOO<sup>-</sup> y Gua de 2:1. Para cada experimento se realizó un espectro de absorción

antes del agregado de ONOO<sup>-</sup> y otro al finalizar el ensayo (a  $t = 0$  s y  $t = 60$  s). Se superpusieron los barridos espectrales del inicio y final de cada experimento individual, y se determinó la diferencia de absorbancias a las longitudes de onda de absorción de guanina reportadas (246 y 274 nm) (79, 80). Adicionalmente, se determinó la absorbancia a 396 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  de 8-NitroGua). A partir de estos datos, se graficaron los valores de absorbancia a 396 nm en función de la diferencia de concentración de Gua de los espectros al inicio y al final para la longitud de onda de 274 nm (máximo de absorbancia con mejor definición). La estimación del coeficiente de extinción molar para 8-NitroGua se realizó utilizando la Ley de Lambert-Beer.

#### 4.2.2.4 Efecto de antioxidantes y atrapadores de OH<sup>•</sup> en la formación de 8-NitroGua

Se estudió la formación de 8-NitroGua en presencia de glutatión reducido, ascorbato, DMSO y manitol. Los ensayos se llevaron a cabo a 20°C utilizando la metodología empleada en el registro de los cursos temporales de nitración de guanina. Usando la condición experimental de 400  $\mu\text{M}$  peroxinitrito y 200  $\mu\text{M}$  guanina, se adicionó a la jeringa A un volumen suficiente de antioxidantes/atrapadores de OH<sup>•</sup> para una concentración final de 10 mM. También se testeó una concentración mayor para cada compuesto. Los cursos temporales de nitración se siguieron a 396 nm por 1,0 y 5,0 s.

### 4.3 Análisis termodinámico

Con el objetivo de estudiar la dependencia con la temperatura tanto de la velocidad de decaimiento de ONOO<sup>-</sup> como de la formación de 8-NitroGua, las determinaciones se realizaron en solución FND entre 10 y 40°C. Mediante la ecuación de Arrhenius se determinó el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción:

$$k = A \cdot e^{\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right)}$$

donde  $k$  es la constante de velocidad obtenida a una dada temperatura,  $A$  es el factor pre-exponencial que representa la frecuencia y orientación relativa a la cual

los átomos y moléculas colisionan para dar producto,  $E_a$  es la mínima energía necesaria para que la reacción ocurra y se denomina energía de activación,  $R$  la constante universal de los gases ideales y  $T$  la temperatura absoluta a la que se llevó a cabo la reacción. Mediante la linealización de la ecuación de Arrhenius se graficaron los logaritmos naturales de las constantes de velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta, y su posterior ajuste a los datos experimentales, obteniéndose las energías de activación a partir de las pendientes correspondientes.

#### **4.4 Análisis estadístico**

Se representaron los datos correspondientes a 3-7 experimentos independientes (promedio  $\pm$  error estándar) y se ajustaron ecuaciones por regresión no lineal usando el programa SigmaPlot versión 10.0 (Systat Software, Inc.). Cada experimento realizado en el equipo SX20 consistió de entre 5 y 15 “disparos” consecutivos de los reactivos en las jeringas A y B; los cursos temporales así obtenidos fueron recolectados y evaluados para su eventual inclusión en el análisis estadístico. El análisis estadístico incluyó comparaciones entre las constantes de velocidad mediante la realización de tests  $t$  de Student. Se consideraron como significativas las comparaciones con un valor  $p < 0,05$ , como muy significativas las comparaciones con un valor  $p < 0,01$  y altamente significativas las comparaciones con un valor  $p < 0,001$ .

#### **4.5 Diseño de estructuras químicas**

Las figuras que contienen estructuras químicas en las secciones Introducción (Figuras: 2.1 a 2.7) y Discusión (Esquema 6.2) fueron realizadas con el programa Advanced Chemistry Development, Inc./ChemSketch de uso académico y personal (Toronto, Canadá).

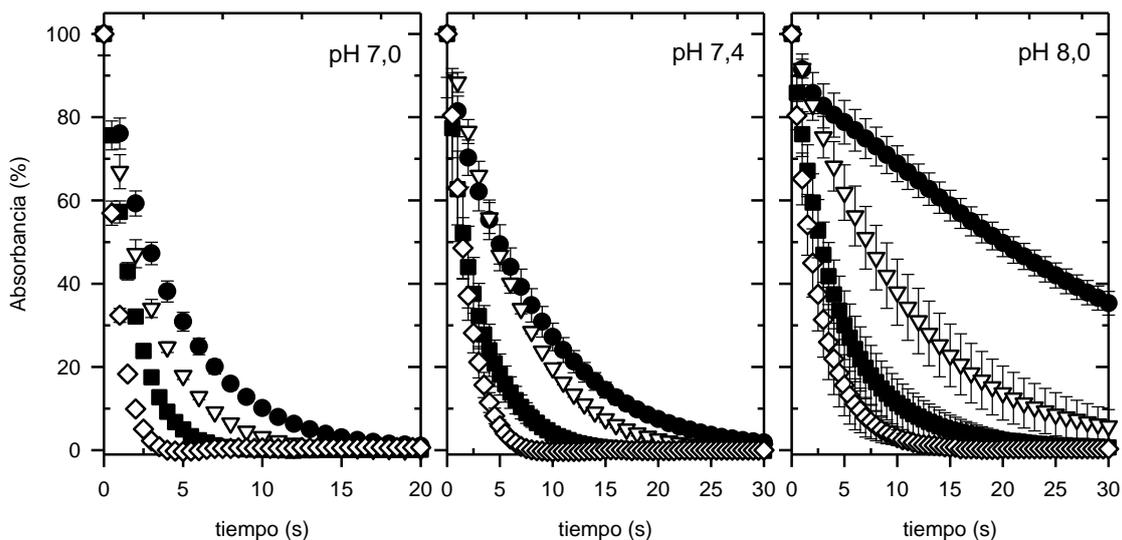
## 5. RESULTADOS

El proceso por el cual diversas modificaciones químicas del ADN generan mutaciones ha sido largamente estudiado (7, 81). Sin embargo, el estudio cuantitativo de los cursos de formación y degradación de componentes modificados por nitración aún no ha sido abordado en profundidad. Con el objetivo general de estudiar la cinética de formación y desaparición de las modificaciones de nitración en la base nitrogenada guanina se comenzó con la determinación y análisis de las condiciones fisicoquímicas para la formación de productos nitrados en función de pH y temperatura (objetivo específico 1).

### 5.1 Evaluación del entorno fisicoquímico (pH y temperatura) para la reacción entre guanina y peroxinitrito

En la revisión bibliográfica de las soluciones buffer utilizadas en estudios individuales de los compuestos guanina y peroxinitrito, se observa mayoritariamente el uso de los buffers fosfato y Tris-HCl. No obstante, el estudio de la reacción de peroxinitrito con compuestos capaces de sufrir oxidación determinó que el buffer Tris-HCl inhibe las oxidaciones mediadas por peroxinitrito, alterando así el resultado del ensayo (82). A su vez, se ha observado que la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  en algunos buffers de Good conteniendo ácido sulfónico aminoetano y aminopropano produce agentes oxidantes secundarios y por tanto, su uso no es recomendado (83, 84).

Se comenzó con el estudio del decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en buffer fosfato de sodio 100 mM mediante espectrofotometría UV-Visible. El curso temporal de decaimiento de 100  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  se registró en el rango de temperaturas 18 – 33°C (Figura 5.1).

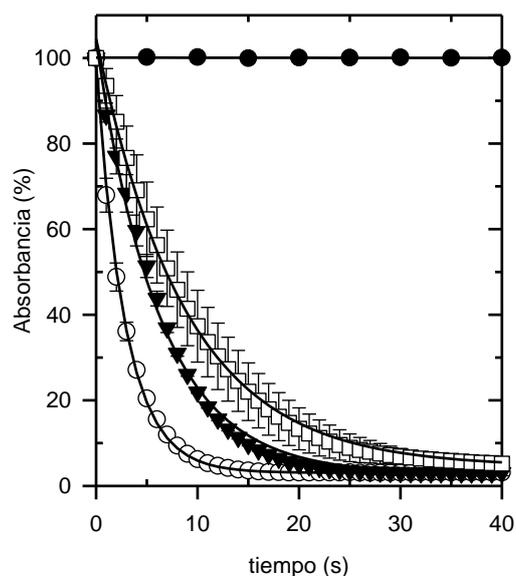


**Figura 5.1. Decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en buffer fosfato en función de la temperatura y el pH.** La concentración de  $\text{ONOO}^-$  para todas las condiciones fue de  $100 \mu\text{M}$ , a pH 7,0, 7,4 y 8,0. Las temperaturas ensayadas fueron:  $18^\circ\text{C}$  (●),  $23^\circ\text{C}$  (▽),  $28^\circ\text{C}$  (■) y  $33^\circ\text{C}$  (◇). Las absorbancias se normalizaron al valor inicial. La frecuencia de muestreo fue de 1,0 s para 18 y  $23^\circ\text{C}$  y de 0,50 s para 28 y  $33^\circ\text{C}$ . Nótese la distinta escala temporal para pH 7,0. Se representan datos de 3-4 experimentos independientes (promedio  $\pm$  error estándar).

Los cursos temporales mostraron que el decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  sigue un comportamiento exponencial simple a cada pH y temperatura. Por consiguiente, los datos experimentales fueron analizados mediante el ajuste de la siguiente ecuación exponencial decreciente:

$$\left( \frac{Abs}{Abs_{t=0}} \right) \cdot 100 = A_o \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Ec. 5.1}$$

La Figura 5.2 muestra las curvas de decaimiento en función del pH a una temperatura dada con sus respectivos ajustes exponenciales. Para comparación, se incluye también el comportamiento de  $\text{ONOO}^-$  en 1 M NaOH. Las constantes de velocidad  $k$  así determinadas para cada condición se muestran en la Tabla 5.1.



**Figura 5.2. Decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en función del pH en buffer fosfato a  $23^\circ\text{C}$ .** Los cursos temporales mostrados corresponden a NaOH 1,0 M (pH 14,0 (●)), buffer fosfato 0,10 M (pH 7,0 (○), pH 7,4 (▼), pH 8,0 (□)) y la concentración de  $\text{ONOO}^-$  fue de  $100\ \mu\text{M}$ . Las curvas a través de los símbolos representan el ajuste de la Ec. 5.1 a los datos experimentales. Los valores representados corresponden a 3 experimentos independientes para cada pH (promedio  $\pm$  error estándar).

**Tabla 5.1. Constantes de velocidad para el decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en buffer fosfato en función de la temperatura y el pH.**

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	<i>k</i> en buffer fosfato de sodio ( $\text{s}^{-1}$ )		
	pH 7,00	pH 7,40	pH 8,00
18	$0,24 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
23	$0,35 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$
28	$0,58 \pm 0,00$	$0,34 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,00$
33	$1,15 \pm 0,00$	$0,53 \pm 0,00$	$0,37 \pm 0,00$

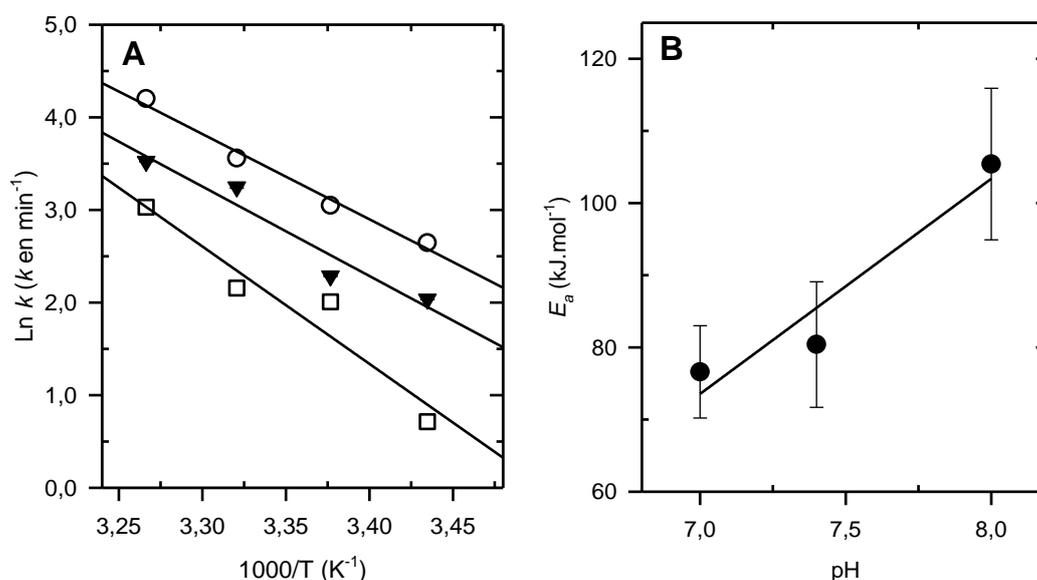
Los promedios  $\pm$  error estándar provienen de 3-4 ensayos para cada condición.

La inspección de esta Tabla muestra que la velocidad de decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  se incrementa con el aumento de la temperatura a todos los pHs ensayados, y que dicha velocidad disminuye con el aumento del pH a todas las temperaturas ensayadas.

Para analizar la dependencia con la temperatura se construyeron gráficos de Arrhenius con la ecuación linealizada:

$$\ln k = \left(\frac{-E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \quad \text{Ec. 5.2}$$

donde la pendiente ( $-E_a/R$ , con  $R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) provee la energía de activación ( $E_a$ ) para cada valor de pH y el corte con la ordenada es el factor pre-exponencial ( $A$ ).



**Figura 5.3. Análisis termodinámico para la descomposición de  $\text{ONOO}^-$ .** (A) Gráficos de Arrhenius para el decaimiento en buffer fosfato 0,10 M (pH 7,0, 7,4 y 8,0, en círculos, triángulos y cuadrados, respectivamente). Donde no se observan las barras de error, éstas son menores que el tamaño de los símbolos. (B) Energías de activación ( $E_a$ ) en función del pH. Las barras de error representan los errores estándar de las pendientes de las regresiones lineales obtenidas en el panel A.

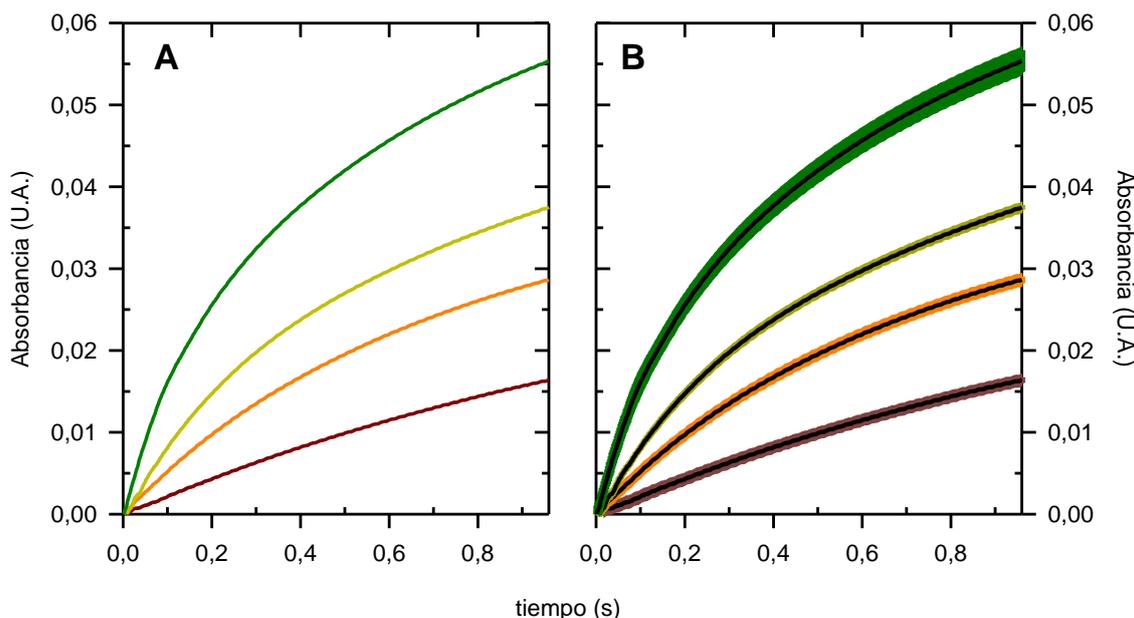
La Figura 5.3A muestra, dentro del error experimental, el comportamiento lineal predicho por la ecuación de Arrhenius. La Figura 5.3B muestra un aumento lineal de la energía de activación en función del pH, con valores que van desde 70 (pH 7,0) a 116  $\text{kJ.mol}^{-1}$  (pH 8,0). Este comportamiento fue consistente con la noción de que el  $\text{ONOO}^-$  es más estable (mayor  $E_a$  necesaria para descomponerse en productos) a pHs alcalinos (85).

## 5.2 Cursos temporales de formación de 8-NitroGua

### 5.2.1 Formación de 8-NitroGua en función de la concentración de guanina

El estudio cuantitativo de las reacciones de nitración en ácidos nucleicos es de fundamental importancia. Sin embargo, existen escasos reportes acerca de estos abordajes cuantitativos, comparados con los estudios cualitativos de identificación y caracterización (25, 59). Por ello, se comenzó midiendo los cursos temporales de nitración en función de la concentración de guanina dejando fija la concentración de agente nitrante (objetivo específico 2).

Se inició el estudio mediante la reacción de 400  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  con 400  $\mu\text{M}$  Gua en 0,10 M buffer fosfato pH 7,40, 0,10 M NaCl y 0,10 mM DTPA (solución FND, ver Materiales y Métodos) a cuatro temperaturas (10 – 40°C) en un equipo de mezclado rápido y flujo detenido. El curso temporal de formación de 8-NitroGua se registró a su  $\lambda_{\text{máx}}$  de 396 nm. Es de remarcar que a esta longitud de onda el espectro de absorción del  $\text{ONOO}^-$  se superpone solo en un 4,75% con la absorbancia de 8-NitroGua (ver Figura 2SA).

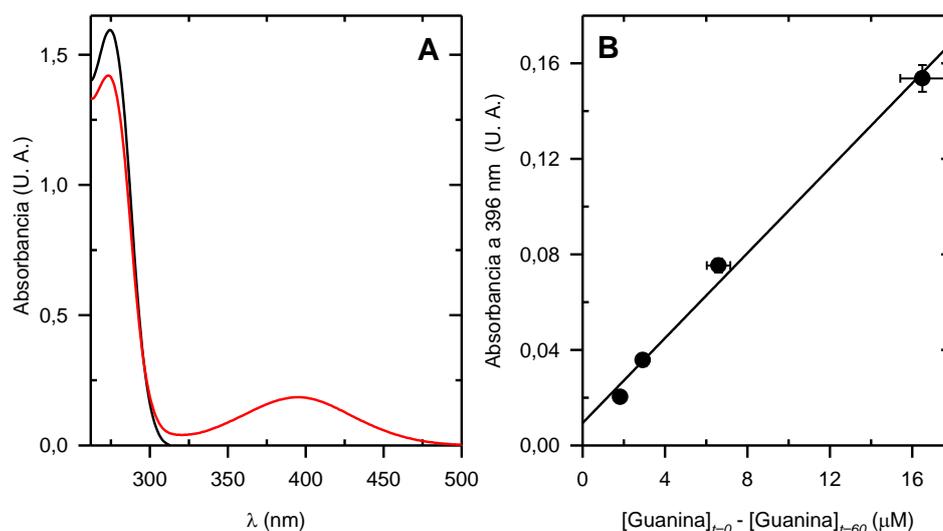


**Figura 5.4. Cinética de formación de 8-NitroGua en función de la temperatura.** (A) Curvas promedio a 10 (marrón), 20 (naranja), 30 (verde claro) y 40°C (verde oscuro). (B) Promedios (negro)  $\pm$  error estándar (colores según panel A) de los cursos temporales mostrados en (A) ( $n = 37, 37, 37$  y  $38$  determinaciones correspondientes a 3 experimentos independientes realizados a 10, 20, 30 y 40°C respectivamente). Todas las adquisiciones se realizaron cada 2,0 ms.

Como se observa en la Figura 5.4, el curso temporal de formación de 8-NitroGua presentó dos componentes: un componente de crecimiento rápido y un componente de crecimiento lento. La Figura 5.4A permite observar el aumento de la velocidad de nitración a medida que aumenta la temperatura. La Figura 5.4B incluye los errores estándar lo cual permite ver la excelente reproducibilidad del comportamiento experimental y la estadísticamente significativa distinción de los cursos temporales a las distintas temperaturas ensayadas.

Para estudiar los cursos temporales de formación de 8-NitroGua en términos de su concentración y no de absorbancia fue necesario disponer de su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ). La búsqueda bibliográfica exhaustiva de este coeficiente no proporcionó información sobre las condiciones experimentales ni las metodologías empleadas (valores reportados de  $9144 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 400 nm pH 7,0 (86) y  $9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 400 nm pH 7,5 (87)). Debido a ello, se propuso una metodología que permitiera su determinación en nuestras condiciones experimentales.

Se realizaron barridos espectrales de formación de 8-NitroGua previo y posterior a la incorporación de ONOO<sup>-</sup>, y se superpusieron, determinándose la diferencia de absorbancias a las longitudes de onda de absorción de guanina reportadas (246 y 274 nm). Las diferencias de absorbancia a 274 nm en los barridos espectrales previos y posteriores a la formación de 8-NitroGua se usaron para calcular las diferencias de concentración de Gua y se graficaron las absorbancias a 396 nm en función de estas diferencias de concentración (Figura 5.5), bajo la suposición de que la Gua se convierte estequiométricamente en 8-NitroGua.



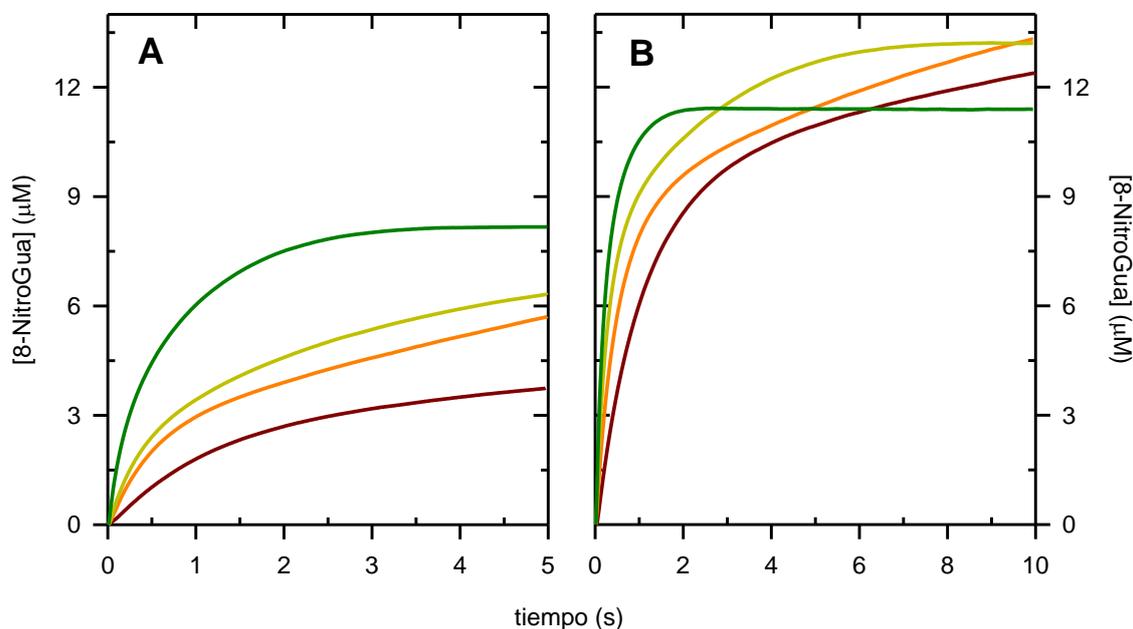
**Figura 5.5. Estimación del coeficiente de extinción molar para 8-NitroGua.**

(A) Barrido espectral representativo de 9 ensayos. En negro se observa el espectro a  $t = 0$  y en rojo a  $t = 60$  s. Nótese el incremento en la absorbancia a 396 nm a expensas de la disminución a 274 nm (rojo). (B) Absorbancia de 8-NitroGua en función de la diferencia de concentración de Gua entre  $t = 0$  y  $t = 60$  s. La línea corresponde a la siguiente recta de mejor ajuste:

$$\text{Abs} = (8,9 \times 10^{-3} \pm 5,7 \times 10^{-4}) \mu\text{M}^{-1} \times \Delta[\text{Gua}] + (9,4 \times 10^{-3} \pm 5,1 \times 10^{-3}) \text{ U. A.}$$

La recta de mejor ajuste que se muestra en la Figura 5.5B permitió estimar un coeficiente de extinción para 8-NitroGua de  $8.900 \pm 566 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , en razonable concordancia con los datos reportados más arriba para distintas condiciones experimentales.

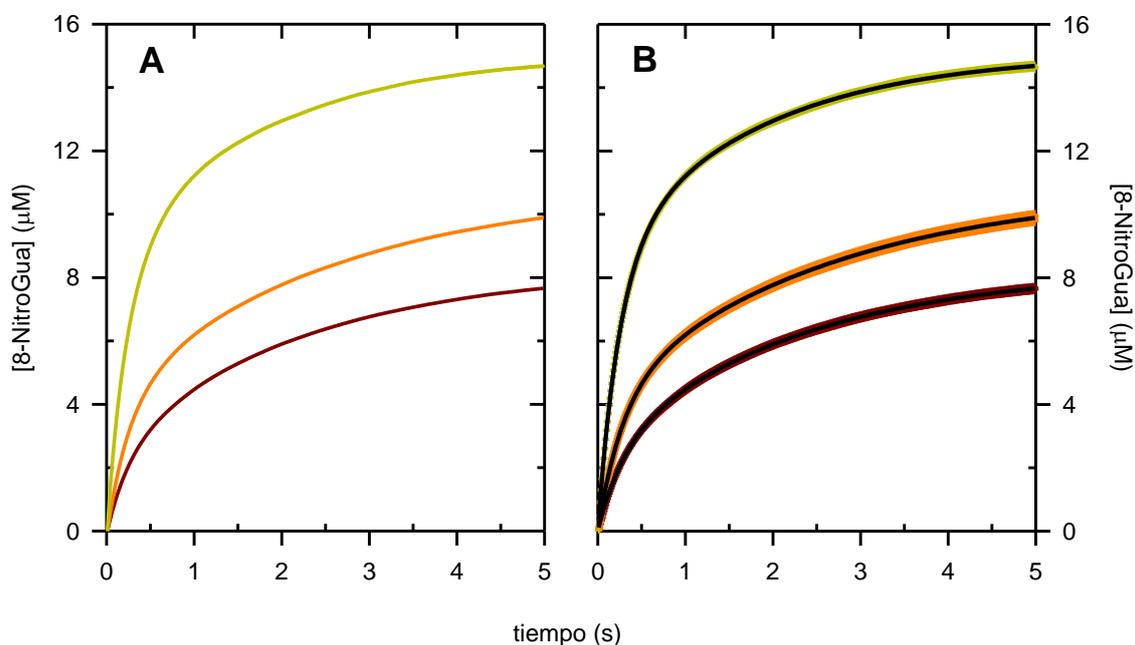
A continuación, se realizaron ensayos a concentración fija de  $\text{ONOO}^-$  ( $400 \mu\text{M}$ ) y  $400 \mu\text{M}$  Gua en el rango de temperaturas de  $10$  a  $40^\circ\text{C}$  a distintos tiempos de adquisición (Figura 5.6).



**Figura 5.6. Curso temporal de formación de 8-NitroGua en función de la temperatura.** La reacción entre  $400 \mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  y  $400 \mu\text{M}$  Gua se registró independientemente a  $5,0$  s (A) y  $10$  s (B), con adquisición de datos cada  $10$  y  $20$  ms, respectivamente. Se graficó el promedio de  $3$  experimentos a las cuatro temperaturas de trabajo:  $10$  (marrón),  $20$  (naranja),  $30$  (verde claro) y  $40^\circ\text{C}$  (verde oscuro). Las absorbancias fueron convertidas en concentración de 8-NitroGua usando el  $\epsilon = 8.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , estimado en este trabajo.

La Figura 5.6 muestra que a los tiempos de adquisición de  $5,0$  y  $10$  s son evidentes los dos componentes cinéticos, excepto quizás a  $40^\circ\text{C}$ . Estas características se ven en su total magnitud en la Figura 5.4, que muestra un experimento en idénticas condiciones experimentales pero adquirido a  $1,0$  s. A su vez, la Figura 5.6B muestra que la curva a  $40^\circ\text{C}$  presentó un plateau a partir de  $\sim 2,0$  s del comienzo de la reacción. Este comportamiento podría representar el nivel de 8-NitroGua obtenido una vez que todo el  $\text{ONOO}^-$  se ha consumido o el máximo rendimiento para la reacción de nitración a  $40^\circ\text{C}$  (ver sección 5.1 y 5.3 para un análisis más detallado).

A continuación, se muestran curvas de formación de 8-NitroGua a distintas concentraciones de Gua a una temperatura seleccionada (Figura 5.7).



**Figura 5.7. Dependencia de los cursos temporales con la concentración de Gua.** (A) Cursos temporales promedio de formación de 8-NitroGua a las siguientes concentraciones de Gua: 100 (marrón), 200 (naranja) y 400 (verde). (B) Promedios  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ) de los experimentos en (A) incluyendo los mejores ajustes doble exponenciales (líneas negras). Ensayos realizados a 30°C con adquisición de datos cada 10 ms.

Considerando la velocidad inicial de nitración, en la Figura 5.7 se observa un aumento de la pendiente inicial de las curvas a medida que aumenta la concentración de Gua. Una segunda pendiente que podría homologarse al componente lento de nitración parece mostrar valores similares sugiriendo que ese componente no cambia con la concentración de Gua. La Figura 5.7B muestra los datos experimentales con el mejor ajuste de la siguiente ecuación doble exponencial:

$$[8 - NitroGua] = A_1 \cdot (1 - e^{-(k_{f1} \cdot t)}) + A_2 \cdot (1 - e^{-(k_{s1} \cdot t)}) \quad \text{Ec. 5.3}$$

Las constantes de velocidad  $k_{f1}$  (componente rápido) y  $k_{s1}$  (componente lento) obtenidas de las regresiones no lineales se reportan en la Tabla 5.2 y las correspondientes amplitudes ( $A_1$  y  $A_2$ ) se reportan en Material Suplementario.

**Tabla 5.2. Constantes de velocidad  $k_{f1}$  y  $k_{s1}$  en función de [Gua] y temperatura.**

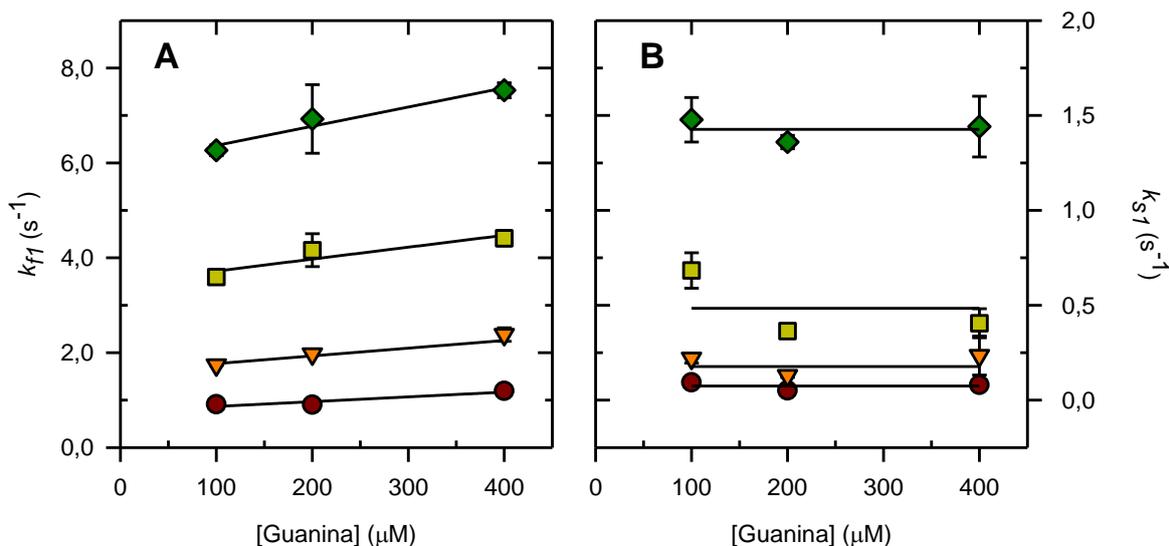
[Gua] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{f1}$ ( $\text{s}^{-1}$ )			
	10°C	20°C	30°C	40°C
<b>100</b>	0,91 $\pm$ 0,06	1,74 $\pm$ 0,01	3,59 $\pm$ 0,10	6,26 $\pm$ 0,11
<b>200</b>	0,90 $\pm$ 0,03	1,97 $\pm$ 0,03	4,16 $\pm$ 0,34	6,93 $\pm$ 0,72
<b>400</b>	1,19 $\pm$ 0,06	2,38 $\pm$ 0,14	4,41 $\pm$ 0,16	7,53 $\pm$ 0,16

[Gua] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{s1}$ ( $\text{s}^{-1}$ )			
	10°C	20°C	30°C	40°C
<b>100</b>	0,09 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,12
<b>200</b>	0,05 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,01	1,36 $\pm$ 0,04
<b>400</b>	0,08 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,10	0,41 $\pm$ 0,08	1,44 $\pm$ 0,16

Los valores a cada concentración de Gua y temperatura resultaron del ajuste doble exponencial de 3 experimentos independientes para cada condición.

Las diferencias entre los valores de las constantes de velocidad  $k_{f1}$  a cada par de temperaturas consecutivas para una concentración dada de Gua resultaron significativas ( $p = 0,01$ ). Las constantes de velocidad  $k_{s1}$  no presentaron diferencias significativas ( $p = 0,05$ ).

Para estudiar la dependencia de la velocidad de nitración con la concentración de Gua, se graficaron las constantes de velocidad obtenidas de los ajustes biexponenciales a cada concentración de Gua y a cada temperatura (Figura 5.8).



**Figura 5.8. Constantes de velocidad para la formación de 8-NitroGua en función de la concentración de Gua.** (A) Representación de constantes de velocidad para el componente rápido ( $k_{f1}$ ). Las líneas representan regresiones lineales a cada temperatura. (B) Representación de constantes de velocidad para el componente lento ( $k_{s1}$ ). Las líneas representan el valor promedio de las tres constantes a cada temperatura. Determinaciones realizadas a una concentración constante de  $400 \mu\text{M ONOO}^-$  a temperaturas:  $10^\circ\text{C}$  (●),  $20^\circ\text{C}$  (▼),  $30^\circ\text{C}$  (■) y  $40^\circ\text{C}$  (◆).

Los valores de las constantes de velocidad  $k_{f1}$  para la formación de 8-NitroGua (Figura 5.8A) aumentaron linealmente con la concentración de Gua a todas las temperaturas. En cambio, las constantes de velocidad  $k_{s1}$  no evidencian dependencia alguna con la concentración de Gua. Por tanto, la Figura 5.8B muestra rectas de pendiente cero, con los siguientes valores promedio de constantes de velocidad:  $0,07$ ,  $0,18$ ,  $0,48$  y  $1,43 \text{ s}^{-1}$  a  $10$ ,  $20$ ,  $30$  y  $40^\circ\text{C}$ , respectivamente.

El análisis por regresión lineal de los valores en la Figura 5.8A, usando la siguiente ecuación:

$$k_{f1} = k_a \cdot [\text{Gua}] + k_b \quad \text{Ec. 5.4}$$

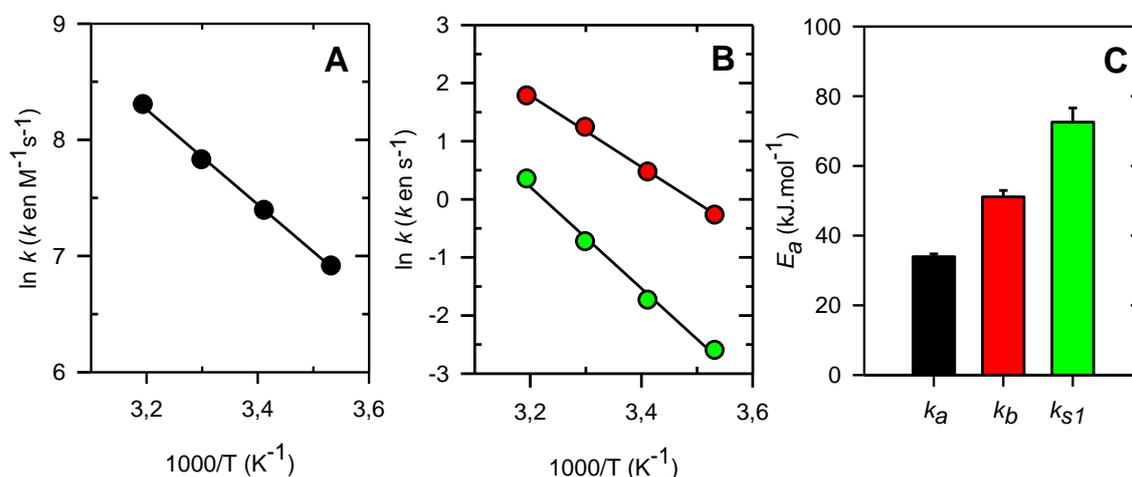
proporcionó los valores reportados en la Tabla 5.3 para las ordenadas en el origen ( $k_b$ , constantes de primer orden) y las pendientes ( $k_a$ , constantes de segundo orden)

en función de la temperatura, para la reacción entre Gua y ONOO<sup>-</sup> en este diseño experimental de Gua variable y ONOO<sup>-</sup> constante.

**Tabla 5.3. Constantes de velocidad de 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> orden que componen  $k_{f1}$ .**

Temperatura (°C)	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_b$ (s <sup>-1</sup> )
10	$1,00 \times 10^3 \pm 3,88 \times 10^2$	$0,77 \pm 0,10$
20	$1,63 \times 10^3 \pm 2,36 \times 10^2$	$1,61 \pm 0,06$
30	$2,52 \times 10^3 \pm 1,09 \times 10^3$	$3,47 \pm 0,29$
40	$4,05 \times 10^3 \pm 8,89 \times 10^2$	$5,96 \pm 0,24$

El ajuste lineal para cada temperatura de la Figura 5.8A reportó valores de R<sup>2</sup> de: 0,87; 0,98; 0,84 y 0,95 a 10, 20, 30 y 40°C, respectivamente.



**Figura 5.9. Gráficos de Arrhenius para la velocidad de formación de 8-NitroGua (Gua variable).** (A) Constantes de velocidad de 2<sup>do</sup> orden ( $k_a$ ) mostradas en la Tabla 5.3. (B) Constantes de 1<sup>er</sup> orden:  $k_b$  (●), ordenadas en el origen de las regresiones lineales de la Figura 5.8A) y  $k_{s1}$  (●), valor promedio de las constantes de velocidad de la Figura 5.8B). (C) Energías de activación calculadas a partir de las pendientes de las rectas de mejor ajuste (código de colores igual que en los paneles A y B). Las regresiones lineales para las tres constantes están representadas en negro.

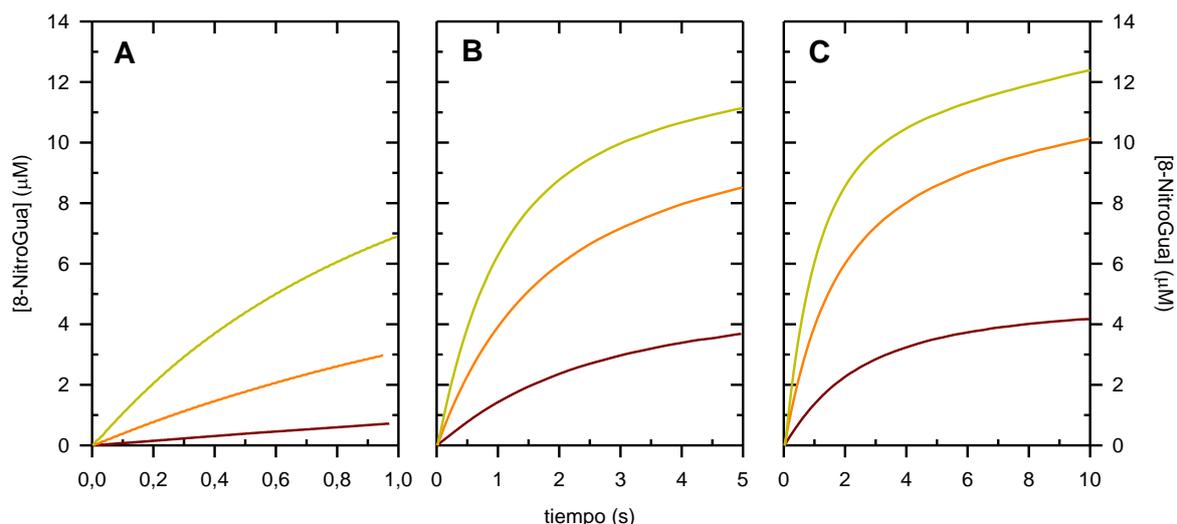
La Figura 5.9 muestra las transformaciones de Arrhenius para las constantes de velocidad ( $k_a$ ,  $k_b$  y  $k_{s1}$ ) reportadas en la Tabla 5.3 y en la página anterior. Dicho análisis permitió obtener energías de activación de  $33,9 \pm 0,8$ ,  $51,1 \pm 1,8$  y  $72,5 \pm 4,0$  kJ.mol<sup>-1</sup> para  $k_a$ ,  $k_b$  y  $k_{s1}$ , respectivamente. El análisis estadístico mostró que el

valor de  $E_a$  para la reacción de segundo orden ( $k_a$ ) es significativamente menor comparado con los valores obtenidos para  $k_b$  y  $k_{s1}$  ( $p = 0,004$  en ambos casos). El valor de  $E_a$  calculado para  $k_b$  también mostró ser significativamente menor que el valor correspondiente hallado para  $k_{s1}$  ( $p = 0,004$ ) (Figura 5.9C).

#### 5.4.2 Formación de 8-NitroGua en función de la concentración de peroxinitrito

Por razones de simetría con la sección anterior y considerando la reacción bimolecular bajo estudio, se estudian aquí los cursos temporales de formación de 8-NitroGua en función de la concentración de  $\text{ONOO}^-$  manteniendo constante la concentración de Gua (objetivo específico 3).

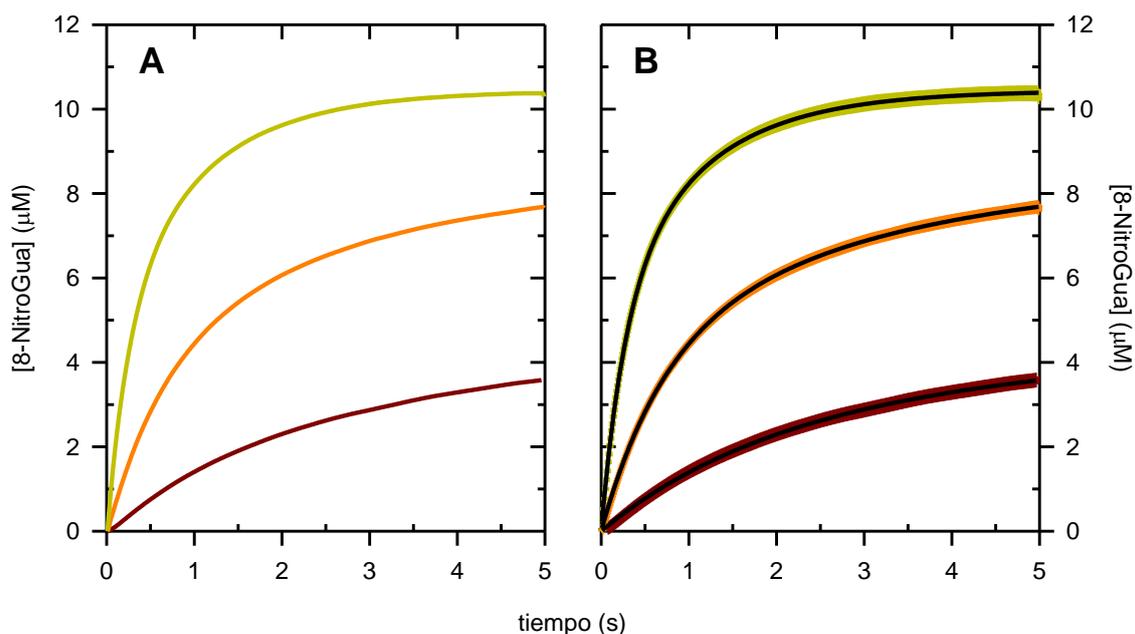
Se investigó la formación de 8-NitroGua a concentraciones crecientes de  $\text{ONOO}^-$  (100, 200 y 400  $\mu\text{M}$ ) manteniendo la concentración de Gua fija en 400  $\mu\text{M}$ . Similar a lo mostrado en la Figura 5.7 a concentración de Gua variable, los cursos temporales en función de la concentración de  $\text{ONOO}^-$  evidenciaron dos componentes cinéticos a una temperatura dada (Figura 5.10).



**Figura 5.10. Formación de 8-NitroGua en función de la concentración de  $\text{ONOO}^-$  a  $10^\circ\text{C}$ .** Cursos temporales promedio de formación de 8-NitroGua a las siguientes concentraciones de  $\text{ONOO}^-$ : 100 (marrón), 200 (naranja) y 400  $\mu\text{M}$  (verde). Los registros provienen de tres experimentos independientes con adquisición de datos cada 2,0 ms (A), 10 ms (B) y 20 ms (C). Las absorbancias fueron convertidas en concentración de 8-NitroGua usando el  $\epsilon = 8.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , estimado en este trabajo.

Considerando la velocidad inicial de nitración, la Figura 5.10 muestra un aumento de la pendiente inicial de las curvas a medida que aumenta la concentración de  $\text{ONOO}^-$ . A un tiempo de adquisición de 5,0 s o más (Figura 5.10 B y C) la nitración de guanina está dominada en su mayoría por el componente lento.

A continuación se estudió la dependencia con la temperatura a una concentración dada de  $\text{ONOO}^-$ . La Figura 5.11 muestra datos adquiridos promediados de la formación de 8-NitroGua en presencia de 200  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  a 10, 20 y  $30^\circ\text{C}$ .



**Figura 5.11. Curso temporal de formación de 8-NitroGua en función de la temperatura.** La reacción entre 200  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  y 400  $\mu\text{M}$  Gua se registró con adquisición de datos cada 10 ms. (A) Valores promedio de tres experimentos a 10 (marrón), 20 (naranja) y 30°C (verde). (B) Valores promedio  $\pm$  error estándar de los tres experimentos graficados en (A) incluyendo los mejores ajustes doble exponenciales a cada temperatura (líneas en color negro).

Se observa que a 10°C la curva mostró un componente lento en fase cuasi-lineal, mientras que a 30°C la curva tiende a un valor máximo a tiempos comparables. De hecho, en los registros a 5,0 s se observa un plateau a partir de  $\sim 4,0$  s del comienzo de la reacción. Como se mencionó en los experimentos de la Figura 5.6, este comportamiento invariante en el tiempo podría representar el máximo rendimiento en la reacción de nitración a una temperatura dada o bien el nivel de 8-NitroGua obtenido una vez que todo el  $\text{ONOO}^-$  se ha consumido (ver sección 5.1 y 5.3). La Figura 5.11B muestra los datos experimentales con el mejor ajuste de la siguiente función doble exponencial:

$$[8 - \text{NitroGua}] = A_3 \cdot (1 - e^{-(k_{f2} \cdot t)}) + A_4 \cdot (1 - e^{-(k_{s2} \cdot t)}) \quad \text{Ec. 5.5}$$

Las constantes de velocidad  $k_{f2}$  (componente rápido) y  $k_{s2}$  (componente lento) en función de la concentración de  $\text{ONOO}^-$  y la temperatura se detallan en la Tabla 5.4, y las correspondientes amplitudes ( $A_3$  y  $A_4$ ) se reportan en Material Suplementario.

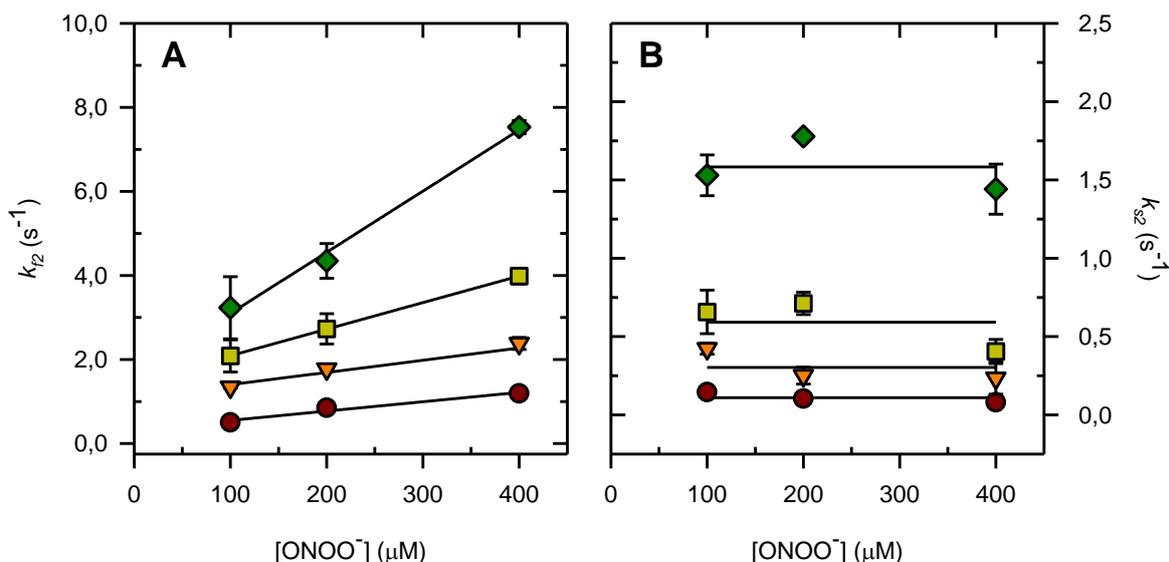
**Tabla 5.4. Constantes de velocidad  $k_{f2}$  y  $k_{s2}$  en función de  $\text{ONOO}^-$  y la temperatura.**

[ $\text{ONOO}^-$ ] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{f2}$ ( $\text{s}^{-1}$ )			
	10°C	20°C	30°C	40°C
100	0,50 ± 0,09	1,34 ± 0,02	2,08 ± 0,38	3,23 ± 0,74
200	0,85 ± 0,01	1,78 ± 0,01	2,73 ± 0,37	4,35 ± 0,41
400	1,19 ± 0,06	2,38 ± 0,14	4,41 ± 0,16	7,53 ± 0,16

[ $\text{ONOO}^-$ ] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{s2}$ ( $\text{s}^{-1}$ )			
	10°C	20°C	30°C	40°C
100	0,14 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,66 ± 0,41	1,53 ± 0,13
200	0,10 ± 0,00	0,25 ± 0,05	0,71 ± 0,07	1,78 ± 0,02
400	0,08 ± 0,02	0,24 ± 0,10	0,41 ± 0,08	1,44 ± 0,16

Los valores a cada concentración de  $\text{ONOO}^-$  y temperatura resultaron del ajuste doble exponencial de 3 experimentos independientes para cada condición.

Para investigar la dependencia de la velocidad de nitración con la concentración de  $\text{ONOO}^-$ , las constantes de velocidad obtenidas de los ajustes biexponenciales a cada concentración de  $\text{ONOO}^-$  y a cada temperatura se graficaron en la Figura 5.12.



**Figura 5.12. Constantes de velocidad para la formación de 8-NitroGua en función de la concentración de ONOO<sup>-</sup>.** (A) Representación de constantes de velocidad para el componente rápido ( $k_{f2}$ ). Las líneas representan regresiones lineales a cada temperatura. (B) Representación de constantes de velocidad para el componente lento ( $k_{s2}$ ). Las líneas representan el valor promedio de las tres constantes a cada temperatura. Determinaciones realizadas a una concentración constante de 400 μM Gua a temperaturas: 10 (●), 20 (▼), 30 (■) y 40°C (◆).

La constante de velocidad  $k_{f2}$  para la formación de 8-NitroGua (Figura 5.12A) aumentó linealmente con la concentración de ONOO<sup>-</sup> a todas las temperaturas. En cambio, el valor de la constante de velocidad  $k_{s2}$  no varió de manera consistente a cada temperatura y por tanto parece ser independiente de la concentración de ONOO<sup>-</sup> dentro del error experimental (Figura 5.12B). Este comportamiento fue similar al observado en la Figura 5.8B para Gua variable.

El análisis por regresión lineal de los valores en la Figura 5.12A, usando la siguiente ecuación:

$$k_{f2} = k_c \cdot [\text{Gua}] + k_d \quad \text{Ec. 5.6}$$

proporcionó los valores reportados en la Tabla 5.5 para las ordenadas en el origen ( $k_d$ , constantes de primer orden) y las pendientes ( $k_c$ , constantes de segundo orden)

en función de la temperatura, para la reacción entre Gua y ONOO<sup>-</sup> en este diseño experimental ONOO<sup>-</sup> variable y Gua constante.

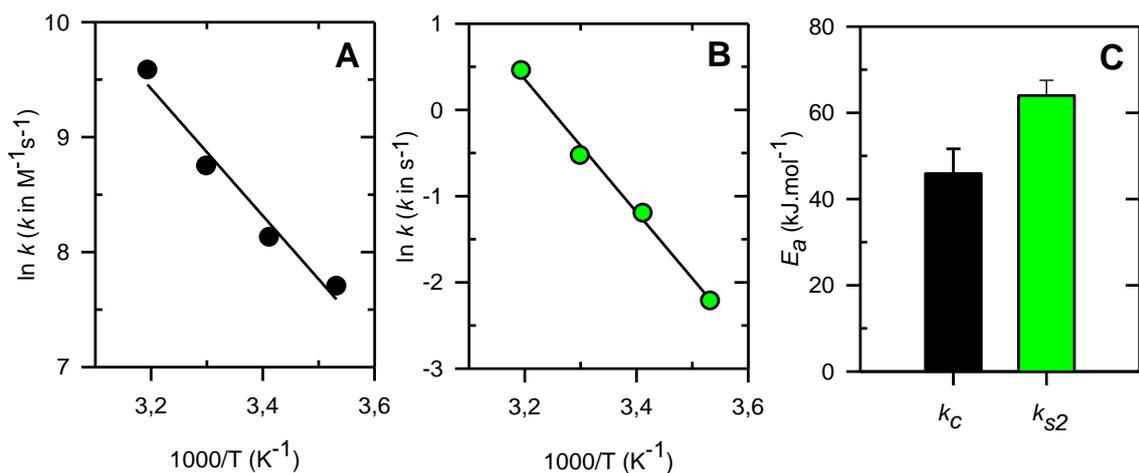
**Tabla 5.5. Constantes de velocidad de 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> orden que componen  $k_{f2}$ .**

Temperatura (°C)	$k_c$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )
10	$2,22 \times 10^3 \pm 4,37 \times 10^2$	$0,33 \pm 0,12$
20	$3,40 \times 10^3 \pm 3,16 \times 10^2$	$1,04 \pm 0,08$
30	$6,32 \times 10^3 \pm 4,23 \times 10^1$	$1,46 \pm 0,01$
40	$1,46 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^3$	$1,64 \pm 0,31$

El ajuste lineal para cada temperatura de la Figura 5.12A reportó valores de R<sup>2</sup> de: 0,96; 0,99; 0,99 y 0,99 a 10, 20, 30 y 40°C, respectivamente.

Por otro lado, las constantes de velocidad  $k_{s2}$  no mostraron dependencia consistente con la concentración de ONOO<sup>-</sup> (Figura 5.12B) y por lo tanto los valores a cada temperatura fueron promediados, obteniéndose constantes de velocidad de 0,11, 0,30, 0,59 y 1,58 s<sup>-1</sup> a 10, 20, 30 y 40°C, respectivamente.

La Figura 5.13 muestra el análisis termodinámico de las constantes de velocidad ( $k_c$  y  $k_{s2}$ ) reportadas en la Tabla 5.5 y en el párrafo anterior. El valor de ordenada al origen ( $k_d$ ) corresponde a la constante de velocidad de nitración a [ONOO<sup>-</sup>] = 0. Dado que no puede existir nitración en ausencia de agente nitrante, consideramos que  $k_d$  carece de significado físico y por lo tanto no fue incluida en el análisis.



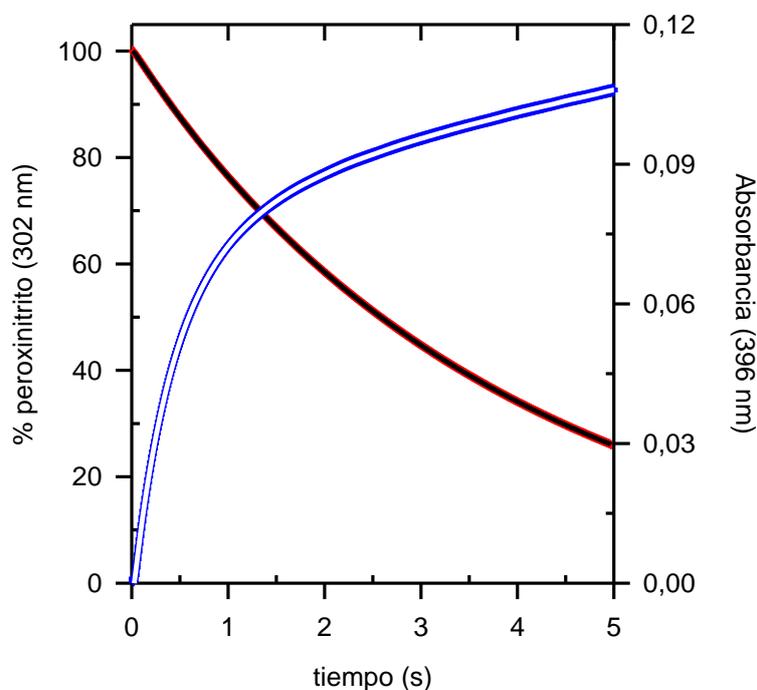
**Figura 5.13. Gráficos de Arrhenius para la formación de 8-NitroGua (ONOO<sup>-</sup> variable).** (A) Análisis para las constantes de velocidad de 2<sup>do</sup> orden  $k_c$  (●) mostradas en la Tabla 5.5. (B) Análisis termodinámico de las constantes de 1<sup>er</sup> orden  $k_{s2}$  (●), valor promedio de las constantes de velocidad de la Figura 5.12B). (C) Energías de activación para las reacciones descritas por las constantes:  $k_c$  (negro) y  $k_{s2}$  (verde).

Las energías de activación calculadas para  $k_c$  y  $k_{s2}$  fueron de  $45,9 \pm 5,7$  y  $64,0 \pm 3,6$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectivamente (Figura 5.13C). El análisis estadístico mostró que el valor de  $E_a$  para la reacción de segundo orden fue significativamente menor ( $p = 0,005$ ) que el valor de  $E_a$  para las constantes de primer orden  $k_{s2}$ .

### 5.3 Curso temporal de decaimiento de ONOO<sup>-</sup> a pH 7,40

A pesar de haber determinado antes por espectrofotometría el comportamiento cinético-termodinámico del decaimiento de ONOO<sup>-</sup> en buffer fosfato (sección 5.1), decidimos, usando un pH fisiológico, realizar un estudio más detallado de la descomposición de ONOO<sup>-</sup> en las mismas condiciones experimentales usadas para estudiar la dependencia temporal de la reacción de nitración de guanina, bajo la hipótesis que, a partir de cierto momento, el decaimiento de ONOO<sup>-</sup> podría limitar la velocidad de nitración de la base. Este estudio más detallado se llevó a cabo en el equipo de mezclado rápido y flujo detenido (usado en nuestros experimentos de nitración), el cual cuenta con una resolución temporal al menos 200 veces mayor a la del espectrofotómetro Shimadzu y un rango de temperaturas más amplio.

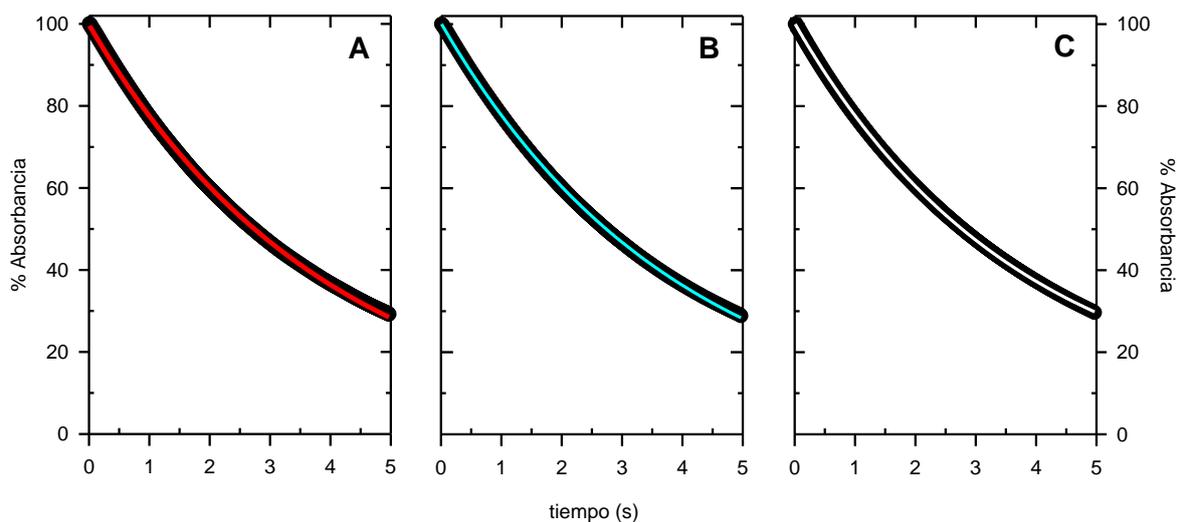
De hecho, la Figura 5.14 muestra simultáneamente los cursos temporales de decaimiento de peroxinitrito y la aparición de 8-NitroGua. Nótese que en estas condiciones experimentales el  $\text{ONOO}^-$  decae al 50% de su concentración inicial ( $400 \mu\text{M}$ ) en alrededor de 2,5 s, tiempo a partir del cual su concentración se vuelve limitante respecto a Gua ( $200 \mu\text{M}$ ).



**Figura 5.14. Cinéticas de decaimiento de peroxinitrito y formación de 8-NitroGua a 20°C.** En negro se presenta la curva porcentual promedio  $\pm$  error estándar (rojo) del decaimiento de  $400 \mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$ . En blanco se representan las absorbancias promedio  $\pm$  error estándar (azul) para la cinética de formación de 8-NitroGua en la condición experimental  $200 \mu\text{M}$  Gua y  $400 \mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$ . Ambas adquisiciones fueron realizadas cada 10 ms.

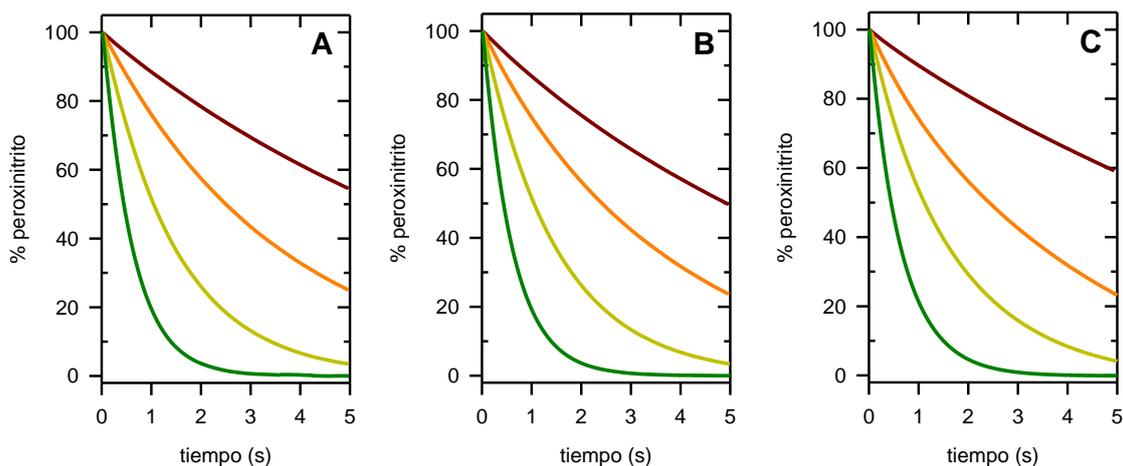
El estudio del decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  se realizó a concentraciones de 100, 200 y  $400 \mu\text{M}$  en solución FND (fuerza iónica controlada y ausencia de metales de transición), en el rango de temperaturas 10 –  $40^\circ\text{C}$ . La Figura 5.15 muestra registros del decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  seguido a 302 nm para las tres concentraciones a  $20^\circ\text{C}$ . Como se puede observar, las absorbancias normalizadas resultaron superponibles a las distintas concentraciones, indicando que la cinética de decaimiento de peroxinitrito es independiente de su concentración (Figura 5.15A). A partir de los

registros de decaimiento de  $400 \mu\text{M ONOO}^-$  se procedió al ajuste de una ecuación exponencial simple (Ec. 5.1) a los datos experimentales, donde los parámetros  $A$  y  $k$  representan la amplitud y la constante de velocidad, respectivamente. Como se observa en la Figura 5.15B, una curva exponencial simple decreciente ajusta de manera adecuada los datos experimentales.



**Figura 5.15. Cursos temporales de decaimiento de distintas concentraciones de  $\text{ONOO}^-$  a  $20^\circ\text{C}$ .** (A) Absorbancias porcentuales  $\pm$  error estándar (negro) de datos experimentales para el decaimiento de  $100 \mu\text{M ONOO}^-$  y el ajuste de una función exponencial decreciente en rojo ( $k_{\text{ONOO}} = 0,31 \text{ s}^{-1}$ ). (B) Absorbancias porcentuales  $\pm$  error estándar (negro) para el decaimiento de  $200 \mu\text{M ONOO}^-$  con el ajuste de una función exponencial decreciente en celeste ( $k_{\text{ONOO}} = 0,31 \text{ s}^{-1}$ ). (C) Absorbancias porcentuales  $\pm$  error estándar (negro) para el decaimiento de  $400 \mu\text{M ONOO}^-$  con el ajuste de una función exponencial decreciente en blanco ( $k_{\text{ONOO}} = 0,25 \text{ s}^{-1}$ ). Los tres paneles se construyeron a partir de datos obtenidos cada 10 ms.

Una vez caracterizado el comportamiento cinético del decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  a  $20^\circ\text{C}$  se procedió a evaluar su dependencia con la temperatura en el rango  $10 - 40^\circ\text{C}$ . La Figura 5.16 muestra los cursos temporales para esta reacción a las tres concentraciones de  $\text{ONOO}^-$  ensayadas, en función de la temperatura.



**Figura 5.16. Dependencia del decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  con la temperatura.** Se muestra el decaimiento de 100  $\mu\text{M}$  (A), 200  $\mu\text{M}$  (B) y 400  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  (C) en función del tiempo a temperaturas de 10 (marrón), 20 (naranja), 30 (verde claro) y 40°C (verde oscuro). La frecuencia de adquisición de datos fue de 10 ms en todos los casos.

Nótese que a 40°C el anión desaparece completamente en  $\sim 3$  s. Se ajustaron funciones exponenciales simples para cada condición y las constantes de velocidad se reportan en la Tabla 5.6. Se puede observar que, consistente con lo reportado en la Figura 5.16, a una temperatura dada las constantes de velocidad de decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  a pH 7,40 son independientes de la concentración de este anión.

**Tabla 5.6. Constantes de velocidad de decaimiento en función de la concentración de  $\text{ONOO}^-$  y la temperatura.**

T(°C)	[ $\text{ONOO}^-$ ] ( $\mu\text{M}$ )		
	100	200	400
	$k_{\text{ONOO}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{ONOO}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{ONOO}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
10	$0,13 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,00$
20	$0,31 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,00$
30	$0,72 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,00$
40	$1,40 \pm 0,14$	$1,67 \pm 0,06$	$1,42 \pm 0,01$

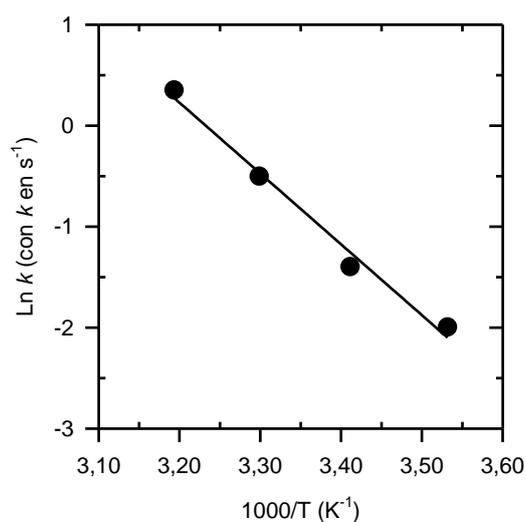
Promedios  $\pm$  error estándar para 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  ( $n = 41 - 57$  determinaciones correspondientes a 3 experimentos independientes realizados a 10, 20, 30 y 40°C respectivamente).

Además, de los registros de decaimiento a las cuatro temperaturas se determinó el porcentaje de ONOO<sup>-</sup> que permaneció en solución a distintos tiempos a partir de una concentración inicial de 400 μM (Tabla 5.7).

**Tabla 5.7. Concentración porcentual de ONOO<sup>-</sup> en función del tiempo y la temperatura.**

tiempo (s)	Temperatura (°C)			
	10	20	30	40
0,3	95,9%	93,5%	86,7%	75,7%
1,0	93,3%	81,0%	58,9%	28,7%
5,0	72,4%	37,0%	23,6%	0,00%

La Figura 5.17 muestra el análisis termodinámico de las constantes de velocidad ( $k_{ONOO}$ ) reportadas en la Tabla 5.6 para 400 μM ONOO<sup>-</sup>.



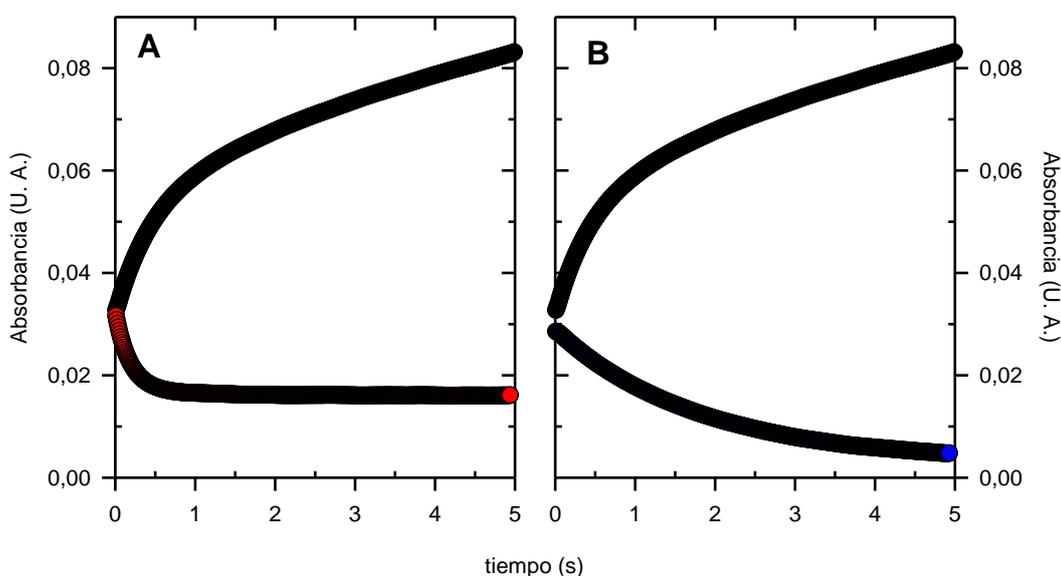
**Figura 5.17. Gráfico de Arrhenius.** Se muestran los datos correspondientes del decaimiento de 400 μM ONOO<sup>-</sup>.

La energía de activación obtenida de la pendiente del gráfico de Arrhenius fue de  $58,3 \pm 4,6$  kJ.mol<sup>-1</sup>. El valor de la  $E_a$  para el decaimiento de peroxinitrito determinado mediante técnicas de mezclado rápido resultó ser significativamente menor ( $p = 0,011$ ) que el valor de  $80,4 \pm 8,7$  kJ.mol<sup>-1</sup> reportado en la Figura 5.3 para buffer fosfato a pH 7,40 usando técnicas espectrofotométricas (ver Discusión).

## 5.4 Efecto de antioxidantes y atrapadores de radical hidroxilo en la cinética de formación de 8-NitroGua

El  $\text{ONOO}^-$  decae a  $\text{NO}_3^-$  a través de especies radicales intermediarias ( $\text{NO}_2^*$ ,  $\text{OH}^*$ ). Como una aproximación para dilucidar el mecanismo de nitración de guanina por peroxinitrito usamos las propiedades de antioxidantes y atrapadores de radicales que tienen la capacidad o bien de interaccionar directamente (evitando el efecto de oxidación) o de interactuar con los intermediarios de decaimiento.

A partir del diseño experimental de  $200 \mu\text{M}$  Gua y  $400 \mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  se realizaron adquisiciones de datos a  $396 \text{ nm}$  y  $20^\circ\text{C}$  en ausencia y presencia de  $10 \text{ mM}$  de los antioxidantes glutatión reducido o ascorbato.

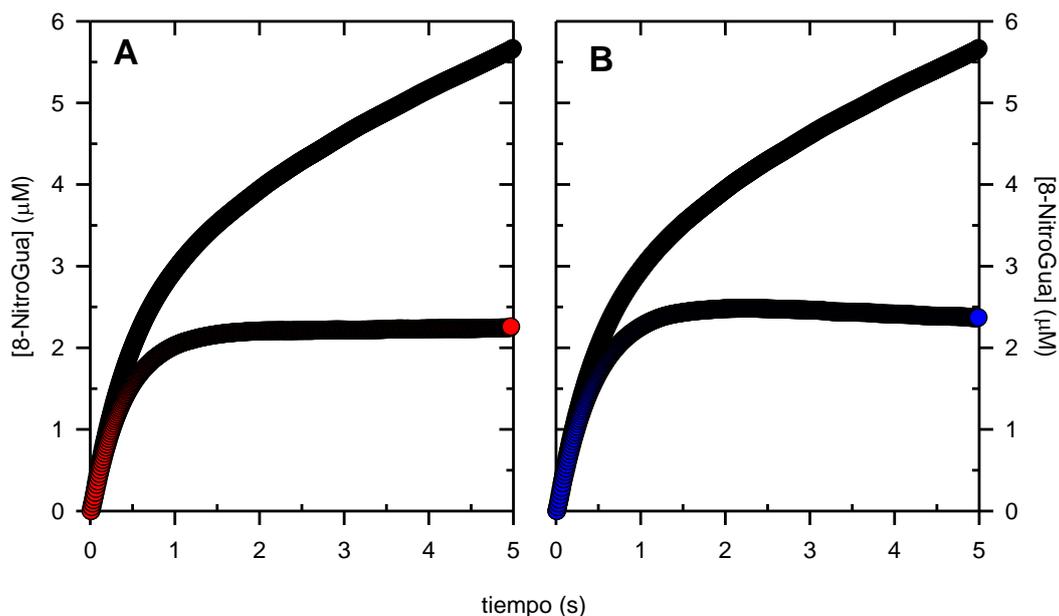


**Figura 5.18. Efecto de antioxidantes en la cinética de formación de 8-NitroGua.** (A) Curso temporal de nitración de Gua en ausencia (●) y presencia (●) de glutatión reducido. (B) Curso temporal de nitración de Gua en ausencia (●) y presencia (●) de ascorbato. Las determinaciones se realizaron a  $20^\circ\text{C}$  y a una frecuencia de adquisición de  $10 \text{ ms}$ .

La Figura 5.18 muestra el efecto de la presencia de antioxidantes en la cinética de formación de 8-NitroGua. Cuando se añade glutatión (Figura 5.18A) o ascorbato (Figura 5.18B) a la mezcla de reacción, se observa que en vez de aumentar, la absorbancia a  $396 \text{ nm}$  decae en función del tiempo. En nuestras

condiciones experimentales (ver Material Suplementario) hemos determinado que el peroxinitrito absorbe a 396 nm todavía un 4,75% de su valor máximo medido a 302 nm. Partiendo de una concentración nominal de peroxinitrito de 400  $\mu\text{M}$ , observamos que los registros de la Figura 5.18 comienzan ( $t = 0$ ) a un valor de absorbancia de aproximadamente 0,03 U.A., tanto en ausencia como en presencia de antioxidantes. Este valor es consistente con la absorbancia inicial calculada a 400  $\mu\text{M}$  peroxinitrito para 396 nm (0,032 U.A.), considerando el coeficiente de extinción molar del  $\text{ONOO}^-$  (Ver Figura 2S). Más aún, esta absorbancia inicial decae, en presencia de antioxidantes, a un valor residual cercano a cero (ver Discusión). En conclusión, en presencia de glutatión o ascorbato no se observa nitración de Gua por  $\text{ONOO}^-$ .

Experimentos similares en presencia de 10 mM de los atrapadores de radical hidroxilo, manitol (Figura 5.19A) y DMSO (Figura 5.19B), muestran que, contrario al efecto de antioxidantes, en este caso se observa nitración de Gua. Sin embargo, se evidencia un cambio en la cinética de formación de 8-NitroGua desde un comportamiento biexponencial (ausencia de atrapadores) a uno exponencial simple.

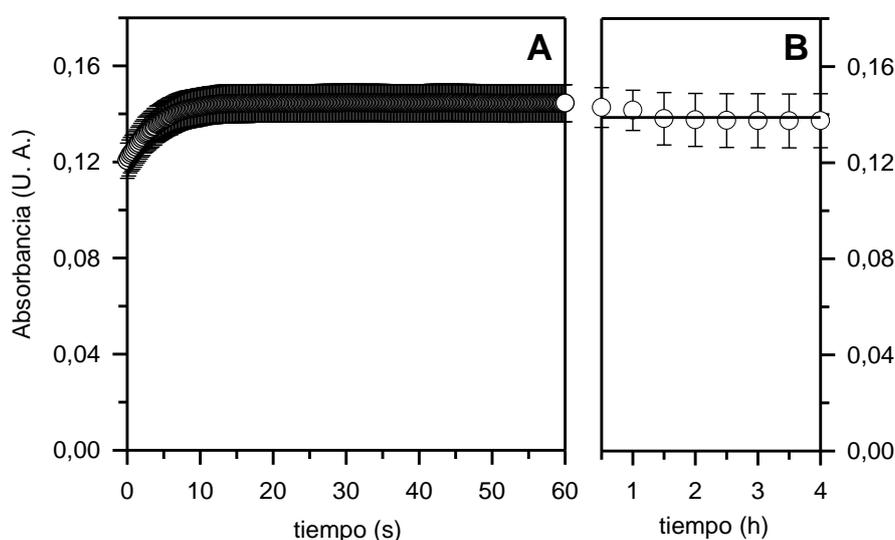


**Figura 5.19. Efecto de atrapadores en la cinética de formación de 8-NitroGua.** (A) Registro de la cinética de nitración de Gua en ausencia (●) y presencia (●) de manitol. (B) Registro de la cinética de nitración de Gua ausencia (●) y presencia (●) de DMSO. Las determinaciones se realizaron a 20°C y a una frecuencia de adquisición de 10 ms. Las absorbancias fueron llevadas a cero para  $t = 0$  de nitración de Gua.

El análisis por regresión no lineal, permitió obtener constantes de velocidad para cada condición. La curva control (200  $\mu\text{M}$  Gua + 400  $\mu\text{M}$  ONOO $^-$ ) presentó una constante de velocidad rápida ( $k_f$ ) de  $2,05 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  y una constante de velocidad lenta ( $k_s$ ) de  $0,12 \pm 0,00 \text{ s}^{-1}$ . En presencia de 10 mM manitol o DMSO el ajuste de una función exponencial simple permitió obtener constantes de velocidad de  $2,36 \pm 0,00 \text{ s}^{-1}$  y  $2,36 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. Además, la Figura 19 muestra una disminución de aproximadamente 60% en los niveles de 8-NitroGua con respecto al valor control, transcurridos 5,0 s. Por consiguiente, la presencia de atrapadores parece eliminar el componente lento de nitración, dejando sólo el componente rápido que alcanza un nivel de 8-NitroGua  $\leq 40\%$  del valor control.

## 5.5 Estudios de la estabilidad de 8-NitroGua

Para investigar si la modificación nitrante una vez formada es estable o desaparece en una ventana de tiempo compatible con procesos bioquímicos en el ADN, a partir de los cursos temporales de formación de 8-NitroGua se estudió su estabilidad en solución FND reproduciendo condiciones fisiológicas. Los ensayos se realizaron en espectrofotómetro UV-Visible a 396 nm en presencia de 200  $\mu\text{M}$  Gua y 400  $\mu\text{M}$  ONOO $^-$ . Se recolectaron datos por 60 s cada 0,20 s, y luego se siguió registrando por 4 h cada 0,5 h. Los ensayos se llevaron a cabo a 25 y 37°C.



**Figura 5.20. Estudio de estabilidad de 8-NitroGua.** El panel A presenta el registro de la cinética de nitración de Gua en 60 s a 25°C. El panel B muestra los niveles de 8-NitroGua al cabo de 4 h. Se representaron los promedios  $\pm$  error estándar de 9 experimentos independientes. La línea en el panel B representa el promedio de 8 valores experimentales.

La Figura 5.20 muestra que el nivel de 8-NitroGua al cabo de 4 h no presentó variación respecto al valor alcanzado a los 60 s. El mismo patrón de estabilidad se observó a 25 y 37°C. Por lo tanto, la 8-NitroGua es estable químicamente a pH 7,40 y no presentó desnitración espontánea al menos 4 h después de formada. Cabe señalar que debido a las manipulaciones previas de las determinaciones espectrofotométricas manuales y teniendo en cuenta que la primer medida se registra a los 200 ms, la curva en la Figura 5.20A no comienza de cero, sino a valores que son aproximadamente el 80% del máximo. De todas maneras, es

importante notar, que aún sin usar el equipo de mezclado rápido es posible detectar el crecimiento de la concentración de 8-NitroGua con el tiempo.

Los ensayos que nos llevaron a la estimación del coeficiente de extinción molar de 8-NitroGua (Figura 5.5B) pusieron en evidencia una baja eficiencia de nitración. De hecho, en presencia de exceso de  $\text{ONOO}^-$  (400  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  y 200  $\mu\text{M}$  Gua) se observó espectrofotométricamente la formación de 17,3  $\mu\text{M}$  8-NitroGua (usando ese coeficiente de extinción molar), lo cual representa sólo un 8,6 % de la concentración inicial de guanina. Si bien de acuerdo al diseño experimental la Gua parece ser el reactivo limitante, la concentración de  $\text{ONOO}^-$  es función decreciente del tiempo, no sólo participando en la reacción de nitración sino que a través de su decaimiento espontáneo. El decaimiento de peroxinitrito condiciona entonces la formación de 8-NitroGua (ver Discusión).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 ADN desde una perspectiva numérica y flujo celular de peroxinitrito

La información genética contenida en cada célula individual debe ser transmitida fielmente de generación en generación. La pérdida de integridad genómica por agentes exógenos o subproductos del metabolismo celular, como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno puede inducir eventos carcinogénicos (88). De acuerdo a la Ley de Chargaff (2) una célula contiene en el núcleo igual proporción de adeninas que timinas, y por tanto la misma proporción de guaninas que citosinas. Una molécula de ADN de doble hebra presenta un 20,7% de guaninas (89). A su vez, una célula HeLa presenta un volumen nuclear de aproximadamente 0,22 pL (90). A partir de estos datos y considerando un genoma diploide de 6,4 Gpb (8), se puede calcular que la concentración de guanina en el genoma humano es de 22,0 mM.

Naturalmente, la guanina es un componente más en el núcleo junto a los demás nucleótidos, iones, cofactores, proteínas, etc., por lo que la probabilidad de que cualquier guanina sea modificada será función del entorno fisicoquímico en el cual se encuentre y su localización nuclear. Por tanto, las bases nitrogenadas, en particular la guanina que es objeto de estudio en el presente trabajo pueden resultar expuestas a especies químicas de alta reactividad que fluyen en el entorno intracelular. Entre estas especies se encuentra el peroxinitrito, el cual una vez formado a partir de  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en el citoplasma, es capaz de cruzar las membranas biológicas por dos mecanismos diferentes: (i) la forma aniónica a través del intercambiador  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , y (ii) el ácido sin disociar por difusión pasiva (91). Debido a las modificaciones a nivel del ADN, se propone que el peroxinitrito tiene la habilidad de entrar a las células y alcanzar el núcleo (92). Asumiendo un coeficiente de difusión (D) para  $\text{ONOO}^-$  similar al de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) de  $1.500 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (93, 94), se calcula, usando la ecuación de difusión de partículas en solución ( $x = \sqrt{2 D t}$ ), que el  $\text{ONOO}^-$  recorre en una dimensión una distancia de 54,8  $\mu\text{m}$  en 1,0 s.

Una célula epitelial promedio tiene un diámetro de 15-21  $\mu\text{m}$  en su eje mayor (8, 95). Considerando la distancia de difusión calculada arriba para el  $\text{ONOO}^-$ , y suponiendo ausencia de colisiones con otras partículas, es posible estimar que esta

especie reactiva o su ácido conjugado, puede difundir longitudinalmente a través de entre dos y tres células completas en 1 s. Si se considera una difusión perpendicular al plano de un tejido, el  $\text{ONOO}^-$  podrá difundir completamente a través del mismo en unos pocos segundos. Sin embargo, en su pasaje por membranas, citoplasma y núcleo esta especie reaccionará con un gran número de moléculas de diferente composición, incluyendo a la base guanina y desoxirribonucleótidos, disminuyendo así el alcance de su desplazamiento por difusión. De hecho, la vida media biológica del peroxinitrito en un interior celular colmado de moléculas blanco ha sido estimado en 10 – 20 ms (96).

Si bien las reacciones entre  $\text{ONOO}^-$  y ácidos nucleicos se han realizado en Gua, dGuo y productos de oxidación de Gua, los datos son limitados y resultan de estudios comparativos entre las reacciones de oxidación y nitración. Nuestro relevamiento bibliográfico indicaría que no existe información disponible sobre las cinéticas de formación de productos nitrados y sus derivados en condiciones fisiológicas.

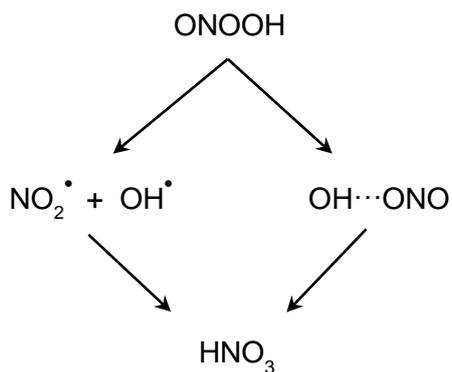
## 6.2 Cinética de decaimiento de peroxinitrito

En el proceso de estudiar la reacción de nitración entre guanina y peroxinitrito es necesario tomar en cuenta que este agente nitrante decae además espontáneamente con el tiempo. Nos encontramos entonces frente a una reacción en que la concentración de uno de los reactivos tiene dos dependencias temporales, pudiendo convertirse a partir de determinado momento en el reactivo limitante de la reacción de nitración. Por lo tanto, discutiremos primero la cinética de decaimiento de peroxinitrito a pH 7,40 y sus aspectos termodinámicos.

El ajuste por regresión no lineal de funciones exponenciales (Ec. 5.1) para el decaimiento de peroxinitrito a las tres concentraciones y a las cuatro temperaturas ensayadas mostró que la constante de velocidad  $k_{\text{ONOO}}$  es independiente de la concentración de peroxinitrito, a una temperatura determinada (Figura 5.15 y Tabla 5.6). A concentración de peroxinitrito constante,  $k_{\text{ONOO}}$  aumentó con la temperatura de manera consistente con una energía de activación de  $58 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figuras 5.16 y 5.17, Tabla 5.6). La reacción de decaimiento de peroxinitrito ocurre con una

constante de velocidad medida de  $0,13 - 1,60 \text{ s}^{-1}$  dependiendo de la temperatura. La constante de velocidad medida a  $20^\circ\text{C}$  y pH 7,40 fue de  $0,25 \text{ s}^{-1}$ , permitiendo estimar una constante de velocidad independiente del pH de  $1,2 \text{ s}^{-1}$  para este componente ( $k = \frac{k_{HA} \cdot [H^+]}{[H^+] + k_a}$ , (97)). Este valor es similar al reportado para el decaimiento exponencial simple de peroxinitrito ( $1,3 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , (27, 97)). La energía de activación obtenida a partir de nuestro análisis termodinámico ( $58,3 \pm 4,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) mostró ser significativamente menor ( $p = 0,007$ ) en comparación con el valor de  $86,5 \pm 0,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$  reportado en la literatura para el decaimiento de peroxinitrito (98). Esta discrepancia podría ser explicada considerando que los estudios de Padmaja y cols. (98) fueron realizados usando buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH 4,4 y fuerza iónica =  $0,1$ , en comparación con nuestro buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH 7,4, fuerza iónica =  $0,2$  y la presencia de quelantes de metales de transición ( $0,1 \text{ mM}$  DTPA). Interesantemente, nuestras determinaciones espectrofotométricas de baja resolución temporal para el decaimiento de peroxinitrito, realizadas en buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH 7,40, pero a una fuerza iónica menor a  $0,1$  y en ausencia de quelantes de metales de transición, presentaron un valor de  $E_a = 80,4 \pm 8,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , similar al reportado por Padmaja y cols.

El peroxinitrito se forma por la reacción limitada por difusión entre  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  *in vivo*. Está bien establecido para las tres isoformas de NOS que, en condiciones de L-arginina o  $\text{BH}_4$  limitante, las subunidades dioxigenasa y reductasa se desacoplan resultando el oxígeno molecular el aceptor final de electrones para formar radical superóxido (99, 100). Por lo tanto, en un escenario celular de sustrato (L-arginina) o cofactor ( $\text{BH}_4$ ) limitante, donde algunas unidades de NOS produzcan  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y otras  $\text{NO}^\bullet$  (40, 101), tendremos una fuente endógena de producción de  $\text{ONOO}^-$  y, dependiendo del pH, de ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ). Este ácido, a pH 7,40 representa el 20% de la concentración total de peroxinitrito (ver Introducción). Koppenol y cols. (Koppenol, et al., 1992) describieron la isomerización de  $\text{ONOO}^-$  a anión nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como una reacción que sigue una cinética de 1<sup>er</sup> orden (proceso exponencial simple). Radi y cols. han descrito dos mecanismos factibles por los cuales el  $\text{ONOOH}$  puede isomerizar a nitrato: 1) por homólisis, produciendo  $\text{NO}_2^\bullet$  y  $\text{HO}^\bullet$  para dar  $\text{NO}_3^-$ , y 2) mediante el rearrreglo interno del  $\text{ONOOH}$  para dar  $\text{HNO}_3$  (102). Estas dos posibilidades se encuentran representadas en el Esquema 6.1.



**Esquema 6.1. Decaimiento de peroxinitrito.**

Independientemente del mecanismo de isomerización a  $\text{NO}_3^-$ , nuestros resultados indican que al cabo de 5,0 s queda una concentración remanente del 72% del  $\text{ONOO}^-$  inicial a  $10^\circ\text{C}$ , y a  $40^\circ\text{C}$  este anión desapareció completamente del medio de reacción (Tabla 5.7). Este comportamiento hace prever que a partir de cierto tiempo de su reacción con guanina el peroxinitrito se vuelve el reactivo limitante y eventualmente su concentración tiende a cero.

### 6.3 Formación de 8-NitroGua

La nitración endógena de ADN constituye una vía importante de daño *in vivo* (103). Nuestros estudios entre guanina y peroxinitrito mostraron que el patrón de formación de 8-NitroGua presenta dos componentes cinéticos. El primer componente presenta un crecimiento exponencial rápido, donde el peroxinitrito comienza a nitrar la guanina, en una reacción cuya velocidad es función de la concentración de ambos reactivos ( $k_{f1}$ , Figuras 5.8A;  $k_{f2}$ , Figura 5.12A). A continuación, el componente lento de nitración crece con una constante de velocidad que es entre 7 y 19% del valor calculado para el componente rápido ( $400 \mu\text{M}$  Gua y  $400 \mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$ ,  $10 - 40^\circ\text{C}$ ), velocidad que mostró ser independiente tanto de la concentración de Gua como de  $\text{ONOO}^-$  ( $k_{s1}$ , Figuras 5.8B;  $k_{s2}$ , Figura 5.12B).

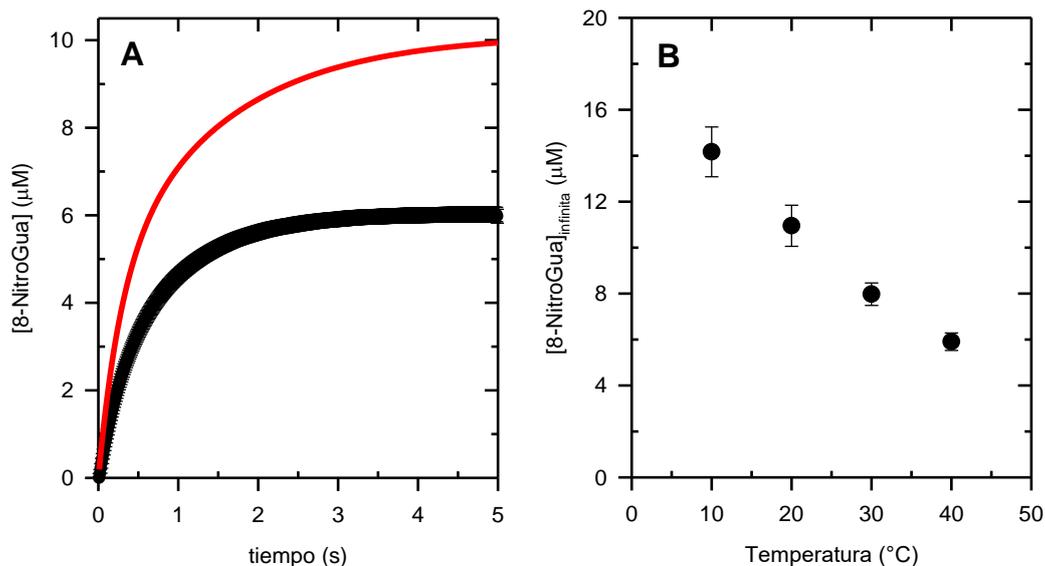
Las constantes de nitración rápida,  $k_{f1}$  y  $k_{f2}$ , mostraron una dependencia lineal con la concentración de Gua y  $\text{ONOO}^-$ , respectivamente a todas las temperaturas. De las pendientes de las rectas de mejor ajuste se obtuvieron constantes de 2<sup>do</sup> orden cuyos valores variaron desde 1.000 a 4.050  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $k_a$ , [Gua] variable, Tabla 5.3), y desde 2.200 a 14.600  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $k_c$ ,  $[\text{ONOO}^-]$  variable, Tabla 5.5), en el rango de temperaturas 10 – 40°C. Este rango de valores para la velocidad de nitración de Gua por  $\text{ONOO}^-$  es compatible con las constantes de velocidad de 2<sup>do</sup> orden reportadas para las siguientes reacciones realizadas a pH 7,40: a) peroxinitrito con glutatión ( $1,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 37°C, (97)); b) peroxinitrito con hemoglobina ( $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 25°C, (91)); c) tirosina y mieloperoxidasa compuesto I ( $1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 20°C, (104)); d) tirosina y radical lipídico peroxilo ( $4,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 25°C, (105)).

Las diferencias observadas entre los valores de las constantes de velocidad de 2<sup>do</sup> orden,  $k_a$  y  $k_c$ , para el mismo rango de temperaturas no parecerían esperables para una reacción bimolecular (1:1) que involucra dos reactivos estables, considerando un diseño experimental simétrico donde se deja un reactivo constante y se varía el otro. Por lo tanto, una posible explicación para la discrepancia entre los valores de  $k_a$  y  $k_c$  es la dependencia temporal de la concentración de peroxinitrito considerando su decaimiento espontáneo. Es de hacer notar que los valores de  $k_{f1}$  ( $[\text{ONOO}^-]$  constante, de donde se obtiene  $k_a$ ) son mayores a los de  $k_{f2}$  ( $[\text{Gua}]$  constante, de donde se obtiene  $k_c$ ). Sin embargo, los experimentos realizados a concentración de guanina o  $\text{ONOO}^-$  variable arrojaron valores de energías de activación no significativamente diferentes ( $p = 0,051$ ) para  $k_a$  y  $k_c$ .

Con respecto a las ordenadas al origen,  $k_b$  y  $k_d$ , de las regresiones lineales usando las Ec. 5.4 y 5.6,  $k_b$  sería una estimación de la constante de decaimiento de peroxinitrito a  $[\text{Gua}] = 0$ , mientras que  $k_d$  representaría la velocidad de nitración en ausencia de agente nitrante, lo cual carece de significado físico. Una inspección de las Tablas 5.3 y 5.6 para 400  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  indica que los valores de  $k_b$  (proveniente de cursos temporales medidos a 396 nm) son en promedio 5 veces mayores que los correspondientes a  $k_{\text{ONOO}}$  (cursos temporales medidos a 302 nm) para el rango de temperaturas ensayadas. Por tanto, en caso de ser comparables, la ordenada al origen de la curva  $k_{f1} = f([\text{Gua}])$  parece corresponder a una reacción de primer orden significativamente más rápida que el decaimiento espontáneo de peroxinitrito,

o bien este decaimiento se encuentra acelerado. Sin embargo, el análisis termodinámico mostró barreras de energía de activación similares para las reacciones representadas por  $k_b$  ( $E_a = 51,1 \pm 1,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) y  $k_{ONOO}$  ( $E_a = 58,3 \pm 4,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) ( $p = 0,05$ ). Si el comportamiento espectrofotométrico del  $ONOO^-$  es el mismo a 302 y 396 nm, considerando que la reacción de decaimiento es de primer orden y habida cuenta que las constantes de velocidad ( $k_b$  y  $k_{ONOO}$ ) son diferentes, la fuente de la diferencia en los parámetros de activación debe provenir del factor de frecuencia pre-exponencial  $A$ . De las regresiones lineales de los gráficos de Arrhenius, considerando pendientes iguales, obtuvimos ordenadas al origen de  $A_{k_b} = 3,8 \pm 0,3 \times 10^{10}$  y  $A_{k_{ONOO}} = 0,7 \pm 0,1 \times 10^{10}$ . La relación  $A_{k_b}/A_{k_{ONOO}} = 5,4$ , es consistente con el comportamiento observado en donde la reacción de decaimiento de peroxinitrito en ausencia de Gua (constantes teóricas extrapoladas) muestra una mayor frecuencia de colisiones efectivas en comparación con el decaimiento de peroxinitrito experimentalmente medido.

El componente lento de nitración mostró valores de constantes de velocidad que son similares a los medidos para la reacción de decaimiento de  $ONOO^-$  a las cuatro temperaturas ( $k_{s1}$ , Tabla 5.2;  $k_{s2}$ , Tabla 5.4;  $k_{ONOO}$ , Tabla 5.6). Teniendo en cuenta que el decaimiento de peroxinitrito compite con la reacción de nitración de guanina, es de esperar que a partir de cierto tiempo el peroxinitrito se vuelva el reactivo limitante y eventualmente desaparezca del medio de reacción. Sugerimos pues, que el decaimiento de peroxinitrito termina limitando la velocidad de nitración y los niveles obtenidos de 8-NitroGua. En este escenario, la concentración de producto formado estaría subestimada con respecto a la capacidad real de nitración, ya que la concentración de peroxinitrito se agotaría antes de completar su reacción con Gua. Una forma de probar esta predicción es utilizar los parámetros de mejor ajuste biexponencial de un curso temporal medido a 1,0 s para generar una curva teórica que llegue a 5,0 s y compararla con un curso temporal medido a 5,0 s en idénticas condiciones. Este procedimiento se muestra en la Figura 6.1.

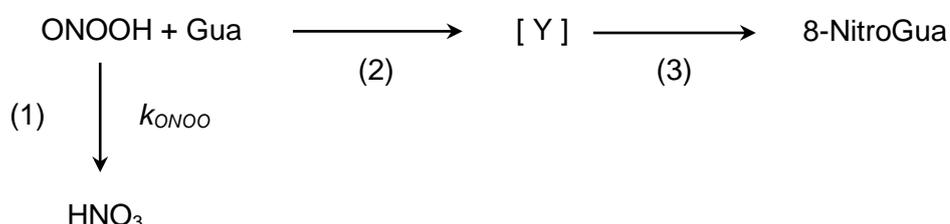


**Figura 6.1. Predicciones de peroxinitrito limitante.** (A) Curso temporal experimental para la formación de 8-NitroGua a partir de 100 μM Gua y 400 μM ONOO<sup>-</sup> a 30°C y 5,0 s (promedios ± error estándar, en negro). La línea roja representa una extrapolación a 5,0 s de una curva construida con los siguientes parámetros de mejor ajuste generados por análisis de un curso temporal de nitración adquirido en idénticas condiciones a 1,0 s:  $[8\text{-NitroGua}] = 0,039 (1 - \exp(-3,59 \cdot t)) + 0,051 (1 - \exp(-0,68 \cdot t))$ . (B) Suma de amplitudes ( $A_1 + A_2$ ) de mejores ajustes biexponenciales para cada temperatura reportados en la Tabla 1S (Material Suplementario). Los símbolos representan el promedio ± error estándar de amplitudes calculadas para 100, 200 y 400 μM Gua a una concentración fija de 400 μM ONOO<sup>-</sup>.

La curva roja (Figura 6.1A) predice un nivel de formación de 8-NitroGua 67% mayor al medido a 5,0 s. Este comportamiento resulta claro si se tiene en cuenta el perfil de la concentración de peroxinitrito en el tiempo. Así, considerando la Tabla 5.7 se observa que al cabo de 5,0 s a 30°C el peroxinitrito disponible es de un 24% (96 μM), mientras que la predicción basada en 1,0 s parte de una curva que aún conserva 59% (236 μM) de la concentración de peroxinitrito inicial. Sin embargo, es preciso notar que la curva roja tiende a un plateau siendo también una subestimación, en la medida que no se tiene una fuente de producción continua de peroxinitrito. Del mismo modo, la Tabla 5.7 muestra la desaparición creciente de

peroxinitrito a medida que aumenta la temperatura a un tiempo dado. Al mismo tiempo, la Figura 5.6B muestra que el curso temporal para la formación de 8-NitroGua alcanza un plateau a ~2,0 s a 40°C, y que dicho curso temporal tarda ~8,0 s en llegar a un plateau a 30°C. Los cursos temporales a 10 y 20°C se encuentran aún en fase creciente a los 10 s de registro. Estas observaciones permiten postular que la reacción de nitración alcanzará niveles mayores cuanto más tiempo permanezca el peroxinitrito en solución, algo que se obtiene a menor temperatura para un tiempo fijo. La Figura 6.1B, en donde se grafican niveles de 8-NitroGua a tiempo infinito en función de la temperatura, muestra que este postulado efectivamente se cumple. Este análisis pone en evidencia que el decaimiento de peroxinitrito limita tanto la velocidad de nitración como los niveles obtenidos de 8-NitroGua.

Un posible esquema de las reacciones teniendo en cuenta estas observaciones y el cambio de la concentración de peroxinitrito en función del tiempo, sería el siguiente:



**Esquema 6.2. Formación de 8-NitroGua.** Esquema cinético para la formación de 8-NitroGua tomando en cuenta el decaimiento de peroxinitrito.  $k_{\text{ONOO}}$  es una constante experimentalmente medida que incluye todos los pasos descritos en el Esquema 6.1. La reacción (1) es el decaimiento de peroxinitrito, las reacciones (2) y (3) representan la formación de 8-NitroGua vía un intermediario no especificado [Y].

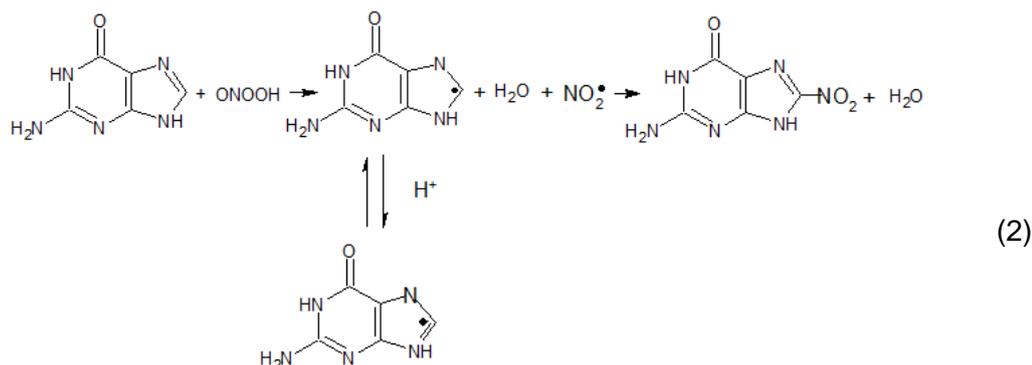
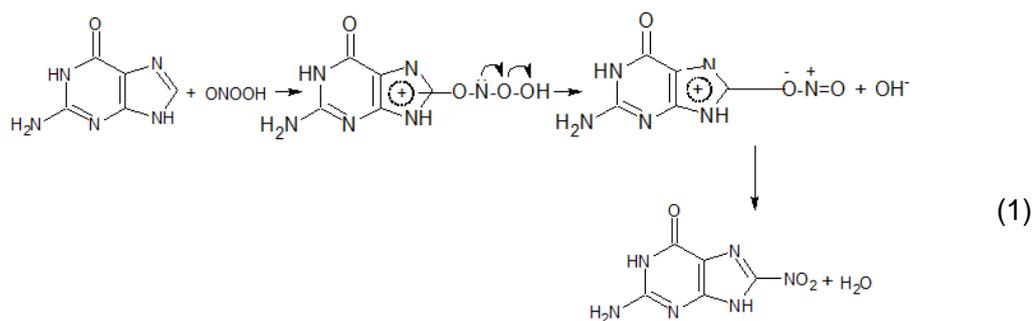
Según estudios experimentales y de dinámica molecular, la formación de 8-NitroGua ocurre a través de dos pasos. El primero es la extracción en la guanina (1,29 V vs NHE (electrodo de hidrógeno normal)) de un electrón produciendo un

radical catiónico (Gua<sup>•+</sup>) (0,53 V vs NHE), proceso que puede llevarse a cabo eficientemente por OH<sup>•</sup> (1,9 V vs NHE) y CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> (1,59 V vs NHE). Una vez formado el radical (Gua<sup>•+</sup>) se desprotona a pH fisiológico para dar lugar al radical neutro (Gua<sup>•</sup>) con densidad electrónica desapareada en O6, C5 y C8 (ver Figura 2.2). Nuestro intermediario [ Y ] del Esquema 6.2 correspondería entonces a los radicales {Gua<sup>•+</sup> + Gua<sup>•</sup>}. El segundo paso es la combinación de radicales (Gua<sup>•</sup>) y NO<sub>2</sub><sup>•</sup> (1,04 V vs NHE) para dar lugar a 8-NitroGua (25, 56, 106, 107). En un ambiente celular el candidato para el rol primario de extracción de un electrón es el CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> puesto que se forma por la reacción de peroxinitrito con CO<sub>2</sub>. En nuestro caso, las manipulaciones experimentales se realizaron de manera de minimizar la concentración de CO<sub>2</sub> en cada una de las determinaciones (ver Materiales y Métodos). En este sentido, podemos asumir que la producción de (Gua<sup>•+</sup>) en nuestro sistema *in vitro* se debió principalmente a la acción de OH<sup>•</sup> sobre la molécula de guanina.

#### 6.4 Posibles mecanismos de nitración de guanina por peroxinitrito

El proceso de nitración puede ocurrir por la acción oxidante del peroxinitrito (directa) o bien por un mecanismo radicalar (indirecta, OH<sup>•</sup> + NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) una vez que la guanina se convierte en el radical neutro (Gua<sup>•</sup>).

A partir de los ensayos realizados en presencia de glutatión reducido o ascorbato (acción directa) se observó que la sola presencia de estos compuestos elimina completamente la formación de 8-NitroGua, permaneciendo únicamente el decaimiento de peroxinitrito a 396 nm (Figura 5.18 A y B). Por el contrario, la adición de manitol o DMSO (acción indirecta) produjo un cambio en el comportamiento cinético de formación de 8-NitroGua, convirtiéndose de una cinética biexponencial a una de primer orden, con una constante de velocidad similar a la constante de nitración rápida de guanina (Figura 5.19 A y B). Estos resultados proponen que la formación de 8-NitroGua se llevaría a cabo por dos mecanismos: uno mediado por la acción oxidante directa del peroxinitrito sobre la guanina (presente en los experimentos con manitol o DMSO), y otro producido por la acción de los radicales generados en la homólisis del peroxinitrito (no observado en presencia de antioxidantes ni atrapadores de OH<sup>•</sup>). Así, las reacciones que se llevarían a cabo *in vitro* serían:



**Esquema 6.3. Reacciones de formación de 8-NitroGua.** Procesos propuestos para la formación de 8-NitroGua, mediante reacción directa (1) y reacción indirecta (2). Basado en un esquema de Alvarez y cols. (108) para explicar la nitración de triptófano.

A partir de estos mecanismos y en base a los datos experimentales presentados se propone que el componente rápido de nitración ( $k_{f1}$  y  $k_{f2}$ ) representa la acción directa de oxidación del peroxinitrito sobre la guanina (grupo de reacciones (1) del Esquema 6.3) y que el componente lento de nitración ( $k_{s1}$  y  $k_{s2}$ ) ocurre a través de un mecanismo radicalar (grupo de reacciones (2) del Esquema 6.3). En conclusión, la nitración de guanina por peroxinitrito involucra un mecanismo mixto.

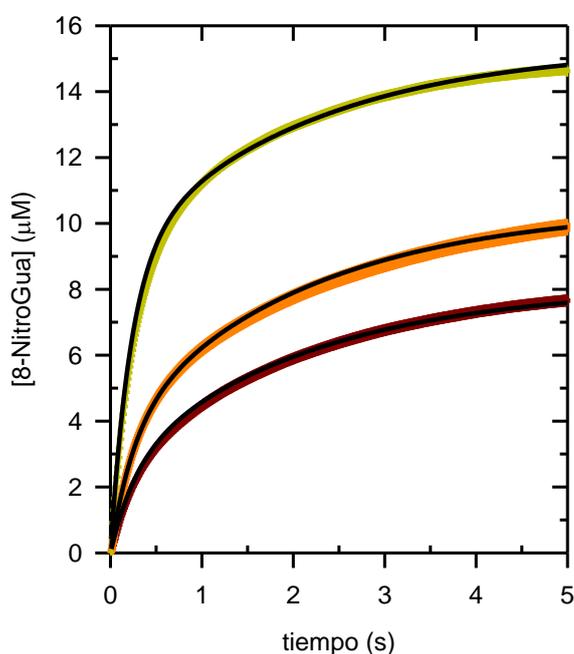
## 6.5 Consistencia interna del análisis cinético

El estudio de los cursos temporales de formación de 8-NitroGua en función de la concentración de guanina y temperatura permitió obtener una familia de constantes de velocidad de primer y segundo orden derivadas del ajuste inicial de funciones empíricas biexponenciales. Para corroborar la consistencia interna de

este procedimiento se reconstruyeron con estos parámetros derivados del análisis las ecuaciones originales como funciones explícitas del tiempo y la concentración de guanina:

$$[8\text{-NitroGua}]_{(t, [\text{Gua}])} = A_1 \cdot \{1 - \exp(-(2,52 \times 10^3 \cdot [\text{Gua}] + 3,47) \cdot t)\} + A_2 \cdot (1 - \exp(-4,99 \cdot t)) \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Estas ecuaciones se compararon con las curvas experimentales obtenidas en idénticas condiciones como se muestra en la Figura 6.2.



**Figura 6.2. Cursos temporales de formación de 8-NitroGua experimentales y predichos a 30°C.** Curvas experimentales (promedio  $\pm$  error estándar) a: 100 (marrón), 200 (naranja) y 400  $\mu\text{M}$  Gua (verde) de la Figura 5.7. Las líneas negras representan el comportamiento predicho por la Ec. 6.1 a cada concentración de Gua.

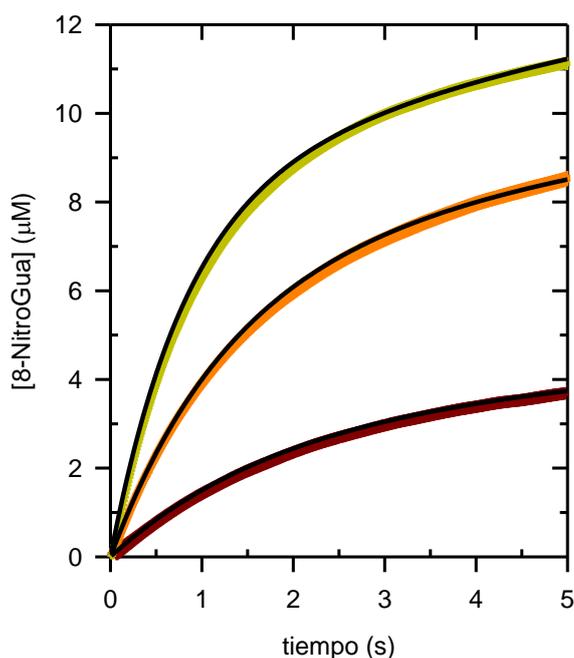
Para confeccionar las curvas se asignaron valores arbitrarios a las amplitudes  $A_1$  y  $A_2$  hasta obtener los niveles de 8-NitroGua experimentalmente observados a 4,99 s, usando las constantes de velocidad provenientes de los ajustes biexponenciales y de su dependencia explícita con la concentración de Gua. En la Tabla 6.1 se detallan los valores de amplitudes utilizados.

**Tabla 6.1. Amplitudes estimadas a concentración de Gua variable.**

[Guanina] ( $\mu\text{M}$ )	$A_1$ ( $\mu\text{M}$ )	$A_2$ ( $\mu\text{M}$ )
100	2,5	5,6
200	3,7	6,8
400	8,9	6,5

De la misma forma se contrastaron los cursos temporales experimentales con los predichos para la formación de 8-NitroGua en función de la concentración de peroxinitrito. Con este fin, se reconstruyeron las ecuaciones originales como funciones explícitas del tiempo y la concentración de peroxinitrito:

$$[\text{8-NitroGua}]_{(t, [\text{ONOO}^-])} = A_1 * \{1 - \exp(- (2,22 \times 10^3 * [\text{ONOO}^-] + 0,33) * t)\} \\ + A_2 * (1 - \exp(-0,11 * t)) \quad (\text{Ec. 6.2})$$



**Figura 6.3. Cursos temporales de formación de 8-NitroGua experimentales y predichos.** Curvas experimentales (promedio  $\pm$  error estándar,  $n = 3$ ) a: 100 (marrón), 200 (naranja) y 400  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  (verde). Ensayos realizados a 10°C con adquisición de datos cada 10 ms. Las líneas negras representan el comportamiento predicho por la Ec. 6.2 a cada concentración de  $\text{ONOO}^-$ .

Se asignaron valores arbitrarios a las amplitudes A1 y A2 hasta obtener los niveles de 8-NitroGua experimentalmente observados a 4,97 s, usando las constantes de velocidad provenientes de los ajustes biexponenciales y de su dependencia explícita con la concentración de ONOO<sup>-</sup>. En la Tabla 6.2 se detallan los valores de amplitudes usados.

**Tabla 6.2. Amplitudes estimadas a concentración de ONOO<sup>-</sup> variable.**

[ONOO <sup>-</sup> ] (μM)	A <sub>1</sub> (μM)	A <sub>2</sub> (μM)
100	3,0	2,2
200	6,4	5,3
400	8,2	7,2

En resumen, una inspección de las Figuras 6.2 y 6.3 muestra que las constantes de primer y segundo orden obtenidas en forma analítica a distintas temperaturas y concentraciones de reactivos reproducen adecuadamente el comportamiento experimental para la formación de 8-NitroGua.

## 6.6 Estabilidad química de 8-NitroGua

El seguimiento espectrofotométrico de 8-NitroGua formada a partir de 400 μM ONOO<sup>-</sup> y 200 μM Gua a pH 7,40 y 25°C evidenció que la base modificada no se desnitra espontáneamente cuando el curso temporal fue seguido por 4 h (Figura 5.20). Esta observación conlleva además el concepto de reacción irreversible sustentado por dos hechos: a) la reacción mostrada en el Esquema 6.2 no tiene reacción inversa, toda vez que desde 8-NitroGua y agua no se regenerarán Gua y peroxinitrito; b) el peroxinitrito *per se* decae espontánea e irreversiblemente con el tiempo (Esquema 6.1). Nuestros análisis espectrales y la estimación de un coeficiente de extinción molar para 8-NitroGua permiten estimar un rendimiento de nitración de ~8,6 % tanto a los 60 como a los 14.400 s. La reacción podría alcanzar un rendimiento mayor si el peroxinitrito no se agotara en los primeros 10 s de su reacción con guanina. La nitración de fenoles por parte de peroxinitrito en ausencia de anión bicarbonato resulta en un rendimiento entre 4 y 9 % (83). Estudios de

espectroscopía de masa para la detección de niveles de 8-NitroGua a pH 7,50 y temperatura ambiente reportaron un rendimiento de ~6 % a igual concentración de Gua y peroxinitrito (41). Estos hallazgos coinciden con nuestro rendimiento de 8,6 % obtenidos a pH 7,40 y en ausencia nominal de bicarbonato.

La estabilidad de una base púrica modificada puede resultar de fundamental importancia en mecanismos fisiopatológicos, que pueden llevar a un aumento de mutaciones, inestabilidad genómica y cáncer (44, 45). En este sentido, Sodum y Fiala (2001) reportaron que la vida media de 8-nitroguanosina es de ~5 h a 37°C (59). Cuando 8-NitroGua forma parte de ADN simple hebra su vida media es de 1,6 h a 37°C, mientras que en ADN doble hebra la vida media se incrementa a 2,4 h a la misma temperatura (109). Las modificaciones químicas como la 8-NitroGua al formar parte de la doble hebra de ADN pueden condicionar el apareamiento de tipo Watson – Crick, influyendo de esta manera en su permanencia en los ácidos nucleicos (60).

A nivel celular existen mecanismos de reparación de ADN que eliminan bases modificadas, pero poco se conoce sobre el procesamiento de daños por nitración de bases (56). Los estudios cinéticos de nitración de Gua aquí presentados así como nuestro resultado de estabilidad sugieren, mediante extrapolación a la molécula de ADN, que la formación y persistencia de la nitración son de relevancia biológica importante para determinar su reparación. El mecanismo enzimático que reconozca la lesión 8-NitroGua así como otros mecanismos de procesamiento de estas lesiones necesitan ser estudiados.

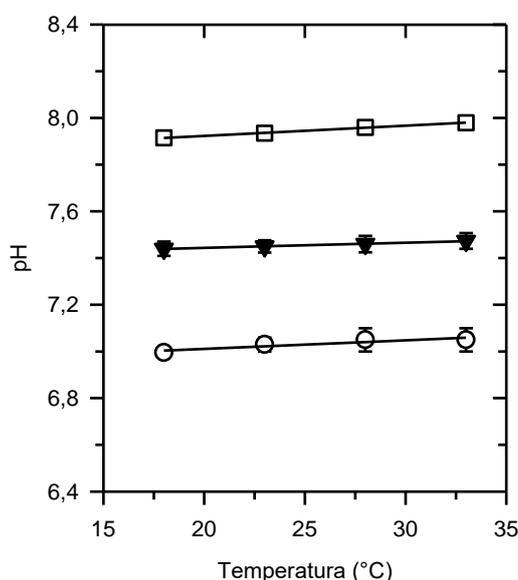
En conclusión, a partir de los resultados obtenidos con el objetivo de estudiar la cinética de formación y desaparición de las modificaciones de nitración en la base nitrogenada guanina se demuestra que:

- 1) La nitración de guanina por peroxinitrito presenta dos componentes cinéticos: un componente inicial rápido y seguido de un componente lento. La reacción de nitración alcanza niveles significativos en unos pocos cientos de milisegundos en medios que reproducen condiciones fisiológicas, sugiriendo que el proceso es cinéticamente relevante *in vivo*.
- 2) El uso de antioxidantes y atrapadores de radical hidroxilo permite postular que el mecanismo de nitración de guanina para dar 8-NitroGua se lleva a cabo mediante dos reacciones, una directa rápida seguida por un mecanismo radicalar.
- 3) La observada estabilidad y persistencia de la 8-NitroGua una vez formada, sustentan su posible rol en mutagénesis, inestabilidad genómica y cambios epigenéticos, relacionados con la carcinogénesis.
- 4) El decaimiento espontáneo de peroxinitrito en nuestras condiciones experimentales limita la velocidad de nitración y los niveles de 8-NitroGua.

## 7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### 7.1 Incidencia de la temperatura sobre el pH en buffer fosfato de sodio

Se comenzó el estudio de las condiciones experimentales evaluando la incidencia de la temperatura sobre el pH de la solución amortiguadora fosfato de sodio. Teniendo en cuenta el rango en el cual el espectrofotómetro puede regular la temperatura a nivel de la celda, se seleccionaron las temperaturas 18, 23, 28 y 33°C. Para cada condición se termostataron 10 mL de solución buffer en baño de agua y se registró el valor de pH (ver Materiales y Métodos). La figura 1S muestra que el buffer fosfato no presentó diferencias de pH entre 18 y 33°C.

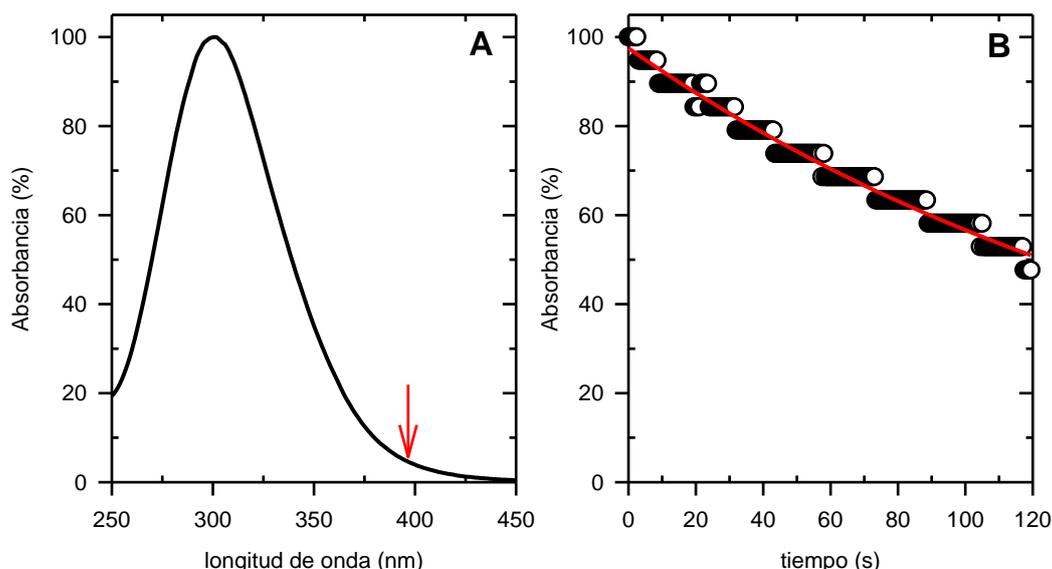


**Figura 1S. Dependencia del pH con la temperatura.** Buffer fosfato 0,10 M a pH 7,0 (O); 7,4 (▼) y 8,0 (□). Los datos representados corresponden a ensayos realizados por triplicado (promedio  $\pm$  error estándar).

A partir de los datos de la Figura 1S se determinó la variación de pH por grado Celsius de temperatura, obteniéndose un valor de 0,0034 unidades de pH/°C, para buffer fosfato.

## 7.2 Espectro de absorción de $\text{ONOO}^-$ y su estabilidad en 0,1 mM NaOH

Se realizó un espectro de absorción en espectrofotómetro Shimadzu UV1800 de 1 mM  $\text{ONOO}^-$  en agua desionizada conteniendo 100 mM NaCl y 0,10 mM DTPA. Se registró el máximo de absorbancia a 301 nm (la longitud de onda máxima reportada es 302 nm) (Figura 2SA). Nótese que a la longitud de onda de 396 nm el peroxinitrito absorbe un  $\sim 4,75\%$ .



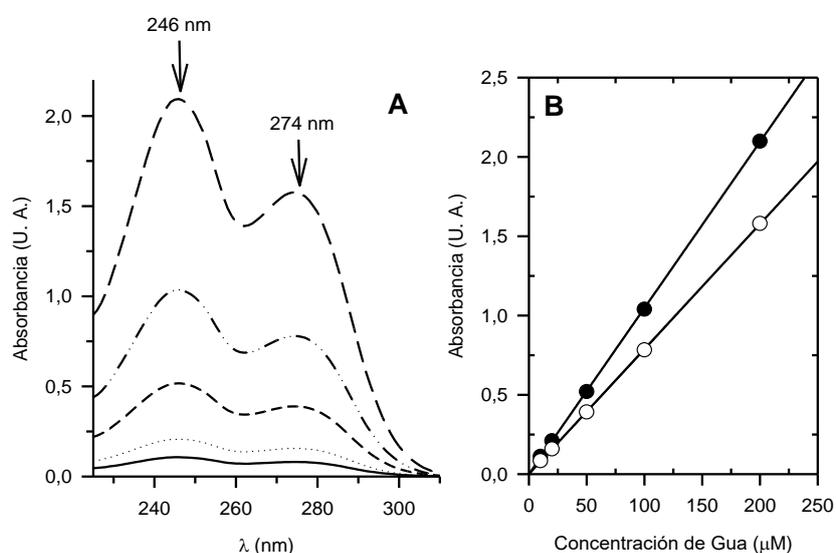
**Figura 2S. Espectro de absorción y ensayo de estabilidad de  $\text{ONOO}^-$ .**

(A) Espectro de absorción de 1 mM  $\text{ONOO}^-$ . La flecha roja señala el valor de longitud de onda de 396 nm. (B) Cinética de decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en 0,10 mM NaOH con adquisición de datos cada 0,5 s. La línea roja representa el ajuste de decaimiento exponencial.

El estudio de estabilidad de  $\text{ONOO}^-$  en NaOH 0,10 mM mostró un comportamiento exponencial simple para su decaimiento. A los datos obtenidos se les ajustó una ecuación exponencial decreciente, determinándose una constante de velocidad de  $0,33 \text{ min}^{-1}$  que corresponde a un  $t_{1/2} = 2,10 \text{ min}$ . Los tiempos de manipulación previos al llenado de la jeringa B para comenzar la reacción fueron menores a 10 s. De acuerdo al patrón de decaimiento de  $\text{ONOO}^-$  en 0,10 mM NaOH mostrado en la Figura 2SB, la pérdida de concentración nominal fue menor al 5 %, y la concentración inicial del anión no fue corregida.

### 7.3 Determinación del coeficiente de extinción molar de Gua

De acuerdo a Hotchkiss (79) y Robins y cols. (80) los máximos de absorción y los coeficientes de extinción molar de Gua fueron reportados en condiciones experimentales distintas a las del presente trabajo. Por tanto fue necesario determinar los coeficientes de extinción molar para nuestras condiciones experimentales. Así, se procedió a la obtención de espectros de absorción de concentraciones crecientes de Gua (10 – 200  $\mu\text{M}$ ). Los barridos se realizaron en solución FND a 25°C en espectrofotómetro UV-Visible (Figura 3S).



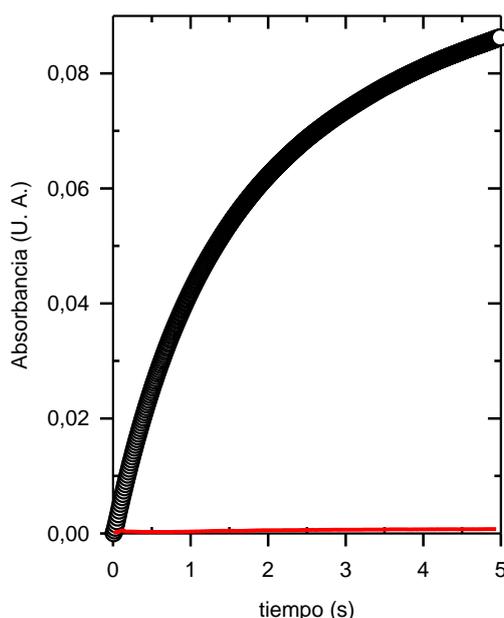
**Figura 3S. Barridos espectrales de Gua.** (A) Se representan soluciones a concentraciones crecientes de Gua: 10  $\mu\text{M}$  (continua), 20  $\mu\text{M}$  (punteada), 50  $\mu\text{M}$  (guiones), 100  $\mu\text{M}$  (puntos y guiones) y 200  $\mu\text{M}$  (guiones largos). Las flechas señalan los máximos de absorción para la base nitrogenada. (B) Absorbancia en función de concentración de Gua a sus máximos de absorción, 246 nm (●) y 274 nm (○). Las líneas representan regresiones lineales. En ambos casos están representados los promedios  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. Las barras de error fueron menores que el tamaño de los símbolos.

Los espectros mostraron picos de absorción máxima a 246 y 274 nm, en acuerdo con las longitudes de onda reportadas (Figura 3SA). La determinación del coeficiente de extinción molar se realizó a través del ajuste con la ecuación de

Lambert-Beer para ambas longitudes de onda utilizando un camino óptico de 1 cm (Figura 3SB). Se obtuvieron los siguientes coeficientes de extinción por regresión lineal  $\epsilon_{246} = 10.470 \pm 43 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{274} = 7.882 \pm 34 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , valores similares a los obtenidos por (80) de  $10.700$  y  $8150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , para  $246$  y  $274 \text{ nm}$ , respectivamente.

#### 7.4 Ensayos control de nitración de Gua por $\text{ONOO}^-$

En presencia de Gua y  $\text{ONOO}^-$  a la longitud de onda de  $396 \text{ nm}$  se registra un aumento de absorbancia. Para comprobar que la reacción de nitración requiere la presencia de agente nitrante ( $\text{ONOO}^-$ ), se realizaron ensayos control a partir de Gua y peroxinitrito descompuesto. Se realizó la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  en solución FND (pH 7,40) a temperatura ambiente, bajo exposición a la luz por  $1 \text{ h}$ . Se realizaron adquisiciones a  $396 \text{ nm}$  por  $5,0 \text{ s}$  a  $10^\circ\text{C}$ .



**Figura 4S. Ensayo control en la formación de 8-NitroGua a  $10^\circ\text{C}$ .** El promedio  $\pm$  error estándar de cursos temporales de formación de 8-NitroGua se representa en círculos blancos. La línea roja muestra la adquisición promedio de datos en presencia de Gua y  $\text{ONOO}^-$  descompuesto. Ensayos representativos de 3 experimentos.

Como se observa en la Figura 4S, el curso temporal de formación de 8-NitroGua presentó un aumento biexponencial de absorbancia transcurridos  $5,0 \text{ s}$ .

Por otro lado, la presencia de  $\text{ONOO}^-$  descompuesto en la mezcla de reacción con Gua mostró que no se produce nitración de Gua, observándose una absorbancia próxima a cero en el mismo período de tiempo. Resultados similares se obtuvieron en ausencia de Gua y presencia de  $\text{ONOO}^-$  fresco (no mostrados).

## 7.5 Amplitudes de los ajustes biexponenciales para la formación de 8-NitroGua

A partir de la aplicación de la Ec. 5.3 a los datos experimentales obtenidos en el diseño experimental de  $[\text{Gua}]$  variable y  $[\text{ONOO}^-]$  fijo se obtuvieron las siguientes amplitudes correspondientes a las constantes de velocidad reportadas en la Tabla 5.2.

**Tabla 1.S. Amplitudes  $A_1$  y  $A_2$  de las constantes de velocidad  $k_{f1}$  y  $k_{s1}$  en función de  $[\text{Gua}]$  y temperatura.**

[Gua] ( $\mu\text{M}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )			
	10	20	30	40
100	$A_1 = 6,85 \pm 0,00$	$A_1 = 6,63 \pm 0,00$	$A_1 = 2,02 \pm 0,00$	$A_1 = 1,91 \pm 0,00$
	$A_2 = 8,31 \pm 2,02$	$A_2 = 6,07 \pm 0,00$	$A_2 = 5,51 \pm 0,00$	$A_2 = 4,49 \pm 0,00$
200	$A_1 = 4,94 \pm 0,00$	$A_1 = 2,47 \pm 0,00$	$A_1 = 2,25 \pm 0,00$	$A_1 = 1,91 \pm 0,00$
	$A_2 = 6,97 \pm 4,49$	$A_2 = 7,30 \pm 0,00$	$A_2 = 6,74 \pm 0,00$	$A_2 = 3,37 \pm 0,00$
400	$A_1 = 8,99 \pm 0,00$	$A_1 = 7,42 \pm 0,00$	$A_1 = 5,28 \pm 0,00$	$A_1 = 4,16 \pm 0,00$
	$A_2 = 6,29 \pm 0,00$	$A_2 = 2,92 \pm 0,00$	$A_2 = 2,13 \pm 0,00$	$A_2 = 1,91 \pm 0,00$

Las absorbancias fueron convertidas en concentración de 8-NitroGua usando el  $\varepsilon = 8.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , estimado en este trabajo.

De la misma forma, ajustando la Ec. 5.5 a los datos experimentales obtenidos en el diseño experimental de  $[\text{ONOO}^-]$  variable y  $[\text{Gua}]$  fijo se obtuvieron las siguientes amplitudes correspondientes a las constantes de velocidad reportadas en la Tabla 5.4.

**Tabla 2.S. Amplitudes  $A_3$  y  $A_4$  de las constantes de velocidad  $k_{f2}$  y  $k_{s2}$  en función de  $[\text{ONOO}^-]$  y temperatura.**

[ONOO <sup>-</sup> ] ( $\mu\text{M}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )			
	10	20	30	40
100	$A_3 = 3,15 \pm 0,00$	$A_3 = 1,69 \pm 0,00$	$A_3 = 1,69 \pm 0,00$	$A_3 = 0,56 \pm 0,00$
	$A_4 = 2,04 \pm 0,00$	$A_4 = 2,47 \pm 0,00$	$A_4 = 0,79 \pm 0,00$	$A_4 = 0,56 \pm 0,00$
200	$A_3 = 5,96 \pm 0,00$	$A_3 = 4,38 \pm 0,00$	$A_3 = 2,70 \pm 0,00$	$A_3 = 3,15 \pm 0,00$
	$A_4 = 6,85 \pm 0,00$	$A_4 = 4,16 \pm 0,00$	$A_4 = 2,92 \pm 0,00$	$A_4 = 0,67 \pm 0,00$
400	$A_3 = 8,99 \pm 0,00$	$A_3 = 7,42 \pm 0,00$	$A_3 = 5,28 \pm 0,00$	$A_3 = 4,16 \pm 0,00$
	$A_4 = 6,29 \pm 0,00$	$A_4 = 2,92 \pm 0,00$	$A_4 = 2,13 \pm 0,00$	$A_4 = 1,91 \pm 0,00$

Las absorbancias fueron convertidas en concentración de 8-NitroGua usando el  $\varepsilon = 8.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , estimado en este trabajo.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. G M Blackburn MJGDLMW, Blackburn GM, Chemistry RSo, Egli M, Gait MJ, Flavell A, et al. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*: RSC Pub.; 2006.
2. Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*. 1950 Jun 15;6(6):201-9.
3. Wilkins MHF, Stokes AR, Wilson HR. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature*. 1953 1953/04/01;171(4356):738-40.
4. Franklin RE, Gosling RG. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*. 1953 1953/04/01;171(4356):740-1.
5. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953 1953/04/01;171(4356):737-8.
6. Watson JD, Crick FHC. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*. 1953 1953/05/01;171(4361):964-7.
7. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*. 2012 Dec 31;327(1-2):26-47.
8. Alberts B, Johnson AD, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell: Sixth International Student Edition*: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2014.
9. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Eur J Biochem*. 1985;150(1):1-5.
10. Sokoloski JE, Godfrey SA, Dombrowski SE, Bevilacqua PC. Prevalence of syn nucleobases in the active sites of functional RNAs. *RNA*. 2011 Oct;17(10):1775-87.
11. Foloppe N, Hartmann B, Nilsson L, MacKerell AD, Jr. Intrinsic conformational energetics associated with the glycosyl torsion in DNA: a quantum mechanical study. *Biophys J*. 2002 Mar;82(3):1554-69.
12. Hamm ML, Rajguru S, Downs AM, Cholera R. Base pair stability of 8-chloro- and 8-iodo-2'-deoxyguanosine opposite 2'-deoxycytidine: implications regarding the bioactivity of 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *J Am Chem Soc*. 2005 Sep 7;127(35):12220-1.

13. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*: W. H. Freeman; 2008.
14. Hoogsteen K. The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallographica*. 1959;12(10):822-3.
15. Reynafarje B, Brand MD, Alexandre A, Lehninger AL. Determination of the H<sup>+</sup>/site and Ca<sup>2+</sup>/site ratios of mitochondrial electron transport. *Methods Enzymol*. 1979;55:640-56.
16. Reynafarje B, Brand MD, Lehninger AL. Evaluation of the H<sup>+</sup>/site ratio of mitochondrial electron transport from rate measurements. *J Biol Chem*. 1976 Dec 10;251(23):7442-51.
17. Martinez A, Prolo C, Estrada D, Rios N, Alvarez MN, Pineyro MD, et al. Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(18):8879-88.
18. Edelman GM, Gally JA. Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11651-2.
19. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):9265-9.
20. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.
21. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992 Sep;6(12):3051-64.
22. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res*. 1999 Mar 08;424(1-2):37-49.
23. Frederick JM, Rayborn ME, Hollyfield JG. Serotonergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: selective staining, identification, development, and content. *J Comp Neurol*. 1989 Mar 22;281(4):516-31.
24. Soares J, Santos S, Silveira F, Nunes E. Calcium hydroxide barrier over the apical root-end of a type III dens invaginatus after endodontic and surgical treatment. *Int Endod J*. 2007 Feb;40(2):146-55.

25. Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*. 2006 Mar;14(2):109-21.
26. Thomas DD. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biol*. 2015 Aug;5:225-33.
27. Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal S, Romero N, et al. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev*. 2018 Feb 14;118(3):1338-408.
28. Lee JA, Frederick JE, Haywood EK, Stevens RG. Skin cancers and ultraviolet radiation. *Med J Aust*. 1989 May 1;150(9):540.
29. Radi R, Denicola A, Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H. The biological chemistry of peroxynitrite. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric oxide*. Los Angeles, CA: Academic Press; 2000. p. 57– 82.
30. Moller MN, Rios N, Trujillo M, Radi R, Denicola A, Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem*. 2019 Oct 4;294(40):14776-802.
31. Carballal S, Bartesaghi S, Radi R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(2):10.1016/j.bbagen.2013.07.005.
32. Thomas G. *Medicinal Chemistry: An Introduction*. 2 ed: John Wiley & Sons; 2011.
33. Rotilio G, Bray RC, Fielden EM. A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta*. 1972 May 12;268(2):605-9.
34. Klug D, Rabani J, Fridovich I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem*. 1972 Aug 10;247(15):4839-42.
35. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Sep 1;333(1):49-58.
36. Augusto O, Goldstein S, Hurst JK, Lind J, Lymar SV, Merenyi G, et al. Carbon dioxide-catalyzed peroxynitrite reactivity - The resilience of the radical mechanism after two decades of research. *Free Radic Biol Med*. 2019 May 1;135:210-5.
37. Uppu RM, Squadrito GL, Pryor WA. Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Mar 15;327(2):335-43.

38. Salgo MG, Cueto R, Pryor WA. Effect of lipid ozonation products on liposomal membranes detected by Laurdan fluorescence. *Free Radic Biol Med.* 1995 Nov;19(5):609-16.
39. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide.* 1997 Oct;1(5):373-85.
40. Ramachandran J, Peluffo RD. Threshold levels of extracellular L-arginine that trigger NOS-mediated ROS/RNS production in cardiac ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017 Feb 01;312(2):C144-C54.
41. Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis.* 1995 Sep;16(9):2045-50.
42. Tew WP, Malis CD, Howard JE, Lehninger AL. Phosphocitrate inhibits mitochondrial and cytosolic accumulation of calcium in kidney cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Sep;78(9):5528-32.
43. Fiskum G, Craig SW, Decker GL, Lehninger AL. The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Jun;77(6):3430-4.
44. Keszenman DJ, Kolodiuk L, Baulch JE. DNA damage in cells exhibiting radiation-induced genomic instability. *Mutagenesis.* 2015 May;30(3):451-8.
45. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1195-214.
46. Steenken S, Jovanovic SV. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J Am Chem Soc.* 1997;119:617-8.
47. Thapa B, Schlegel HB. Calculations of pKa's and redox potentials of nucleobases with explicit waters and polarizable continuum solvation. *J Phys Chem A.* 2015 May 28;119(21):5134-44.
48. Delaney S, Jarem DA, Volle CB, Yennie CJ. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free Radic Res.* 2012 Apr;46(4):420-41.
49. Morikawa M, Kino K, Oyoshi T, Suzuki M, Kobayashi T, Miyazawa H. Analysis of guanine oxidation products in double-stranded DNA and proposed guanine oxidation pathways in single-stranded, double-stranded or quadruplex DNA. *Biomolecules.* 2014 Feb 10;4(1):140-59.

50. Shafirovich V, Geacintov NE. Removal of oxidatively generated DNA damage by overlapping repair pathways. *Free Radic Biol Med*. 2016 Nov 04.
51. Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci*. 2012 Jul;37(3):503-17.
52. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 2012 Apr;46(4):382-419.
53. Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res*. 2008 Aug;41(8):1075-83.
54. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene*: Pearson; 2013.
55. Yu H, Venkatarangan L, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Quantitation of four guanine oxidation products from reaction of DNA with varying doses of peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 2005 Dec;18(12):1849-57.
56. Ohshima H, Sawa T, Akaike T. 8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2006 May-Jun;8(5-6):1033-45.
57. Suzuki M, Kino K, Morikawa M, Watanabe T, Asada E, Kobayashi T, et al., editors. *The Calculated Stability of DNA Duplexes Containing an Oxidized Guanine Lesion Pairing with Guanine*. Proceedings of the 17th Int Electron Conf Synth Org Chem; 2013: .
58. Yun BH, Geacintov NE, Shafirovich V. Generation of guanine-thymidine cross-links in DNA by peroxynitrite/carbon dioxide. *Chem Res Toxicol*. 2011 Jul 18;24(7):1144-52.
59. Sodom RS, Fiala ES. Analysis of peroxynitrite reactions with guanine, xanthine, and adenine nucleosides by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection: C8-nitration and -oxidation. *Chem Res Toxicol*. 2001 Apr;14(4):438-50.
60. Bhamra I, Compagnone-Post P, O'Neil IA, Iwanejko LA, Bates AD, Cosstick R. Base-pairing preferences, physicochemical properties and mutational behaviour of the DNA lesion 8-nitroguanine. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov;40(21):11126-38.
61. Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:623019.

62. Fletcher H, Frederick J, Barned H, Lizarraga V. Spontaneous rupture of the spleen in pregnancy with splenic conservation. *West Indian Med J.* 1989 Jun;38(2):114-5.
63. Hu CW, Chang YJ, Hsu YW, Chen JL, Wang TS, Chao MR. Comprehensive analysis of the formation and stability of peroxyxynitrite-derived 8-nitroguanine by LC-MS/MS: strategy for the quantitative analysis of cellular 8-nitroguanine. *Free Radic Biol Med.* 2016 Oct 29.
64. Suzuki N, Yasui M, Geacintov NE, Shafirovich V, Shibutani S. Miscoding events during DNA synthesis past the nitration-damaged base 8-nitroguanine. *Biochemistry.* 2005 Jun 28;44(25):9238-45.
65. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica.* 2000;25(1):3-9.
66. Lehninger AL, Reynafarje B, Alexandre A, Villalobo A. Respiration-coupled H<sup>+</sup> ejection by mitochondria. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;341:585-92.
67. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxyxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 2018 Apr;14:618-25.
68. Vélez-Marín M, Uribe-Velásquez LF, Lenz Souza MI. PAPEL DEL RESVERATROL DE UVA COMO ANTIOXIDANTE. *Revista Luna Azul.* 2012(34):240-56.
69. Nikolova T, Zivadinovic R, Evtimovska N, Klisarovska V, Stanojevic M, Georgievska J, et al. Diagnostic performance of human epididymis protein 4 compared to a combination of biophysical and biochemical markers to differentiate ovarian endometriosis from epithelial ovarian cancer in premenopausal women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017 Dec;43(12):1870-9.
70. Rangaswamy S, Pandey A, Mitra S, Hegde ML. Pre-Replicative Repair of Oxidized Bases Maintains Fidelity in Mammalian Genomes: The Cowcatcher Role of NEIL1 DNA Glycosylase. *Genes (Basel).* 2017;8(7):175.
71. Tchou J, Bodepudi V, Shibutani S, Antoshechkin I, Miller J, Grollman AP, et al. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J Biol Chem.* 1994 May 27;269(21):15318-24.
72. Youn CK, Song PI, Kim MH, Kim JS, Hyun JW, Choi SJ, et al. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase suppresses the oxidative stress induced apoptosis through a p53-mediated signaling pathway in human fibroblasts. *Mol Cancer Res.* 2007 Oct;5(10):1083-98.
73. Villalobo A, Lehninger AL. The proton stoichiometry of electron transport in Ehrlich ascites tumor mitochondria. *J Biol Chem.* 1979 Jun 10;254(11):4352-8.

74. Hiraku Y. Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance. *Environ Health Prev Med.* 2010 Mar;15(2):63-72.
75. Hu CW, Chang YJ, Chen JL, Hsu YW, Chao MR. Sensitive Detection of 8-Nitroguanine in DNA by Chemical Derivatization Coupled with Online Solid-Phase Extraction LC-MS/MS. *Molecules.* 2018 Mar 8;23(3).
76. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991 Mar 5;266(7):4244-50.
77. Radi R, Denicola A, Freeman BA. Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol.* 1999;301:353-67.
78. Hughes MN, Nicklin HG. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical.* [10.1039/J19680000450]. 1968(0):450-2.
79. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948;175(1):315-32.
80. Robins RK, Dille KJ, Willits CH, Christensen BE. Purines. II. The Synthesis of Certain Purines and the Cyclization of Several Substituted 4,5-Diaminopyrimidines<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society.* 1953 1953/01/01;75(2):263-6.
81. Cadet J, Davies KJA. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jun;107:2-12.
82. Gadelha FR, Thomson L, Fagian MM, Costa AD, Radi R, Vercesi AE. Ca<sup>2+</sup>-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1997 Sep 15;345(2):243-50.
83. Molina C, Kissner R, Koppenol WH. Decomposition kinetics of peroxynitrite: influence of pH and buffer. *Dalton Trans.* 2013 Jul 21;42(27):9898-905.
84. Hirayama S, Nagasaka H, Nakagawa S, Takuwa M, Nakacho M, Yorifuji T, et al. Growth hormone activates hepatic and cerebral cholesterol metabolism in small-for-gestational age children without catch-up growth. *J Clin Lipidol.* 2017 Jul - Aug;11(4):1032-42.
85. Koppenol WH, Bounds PL, Nauser T, Kissner R, Ruegger H. Peroxynitrous acid: controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. *Dalton Trans.* 2012 Dec 7;41(45):13779-87.

86. Chen HJ, Chen YM, Wang TF, Wang KS, Shiea J. 8-Nitroxanthine, an adduct derived from 2'-deoxyguanosine or DNA reaction with nitryl chloride. *Chem Res Toxicol*. 2001 May;14(5):536-46.
87. Shafirovich V, Mock S, Kolbanovskiy A, Geacintov NE. Photochemically catalyzed generation of site-specific 8-nitroguanine adducts in DNA by the reaction of long-lived neutral guanine radicals with nitrogen dioxide. *Chem Res Toxicol*. 2002 Apr;15(4):591-7.
88. Baldo V, Liang J, Wang G, Zhou H. Preserving Yeast Genetic Heritage through DNA Damage Checkpoint Regulation and Telomere Maintenance. *Biomolecules*. 2012 Oct 30;2(4):505-23.
89. Bansal M. DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix. *Current Science*. [Review]. 2003;85(11):8.
90. Fujioaka A, Terai K, Itoh RE, Aoki K, Nakamura T, Kuroda S, et al. Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J Biol Chem*. 2006 Mar 31;281(13):8917-26.
91. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3566-71.
92. Islam BU, Habib S, Ahmad P, Allarakha S, Moinuddin, Ali A. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). *Indian J Clin Biochem*. 2015 Oct;30(4):368-85.
93. Romero N, Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Aug 1;368(1):23-30.
94. Handbook of Chemistry and Physics. 48th Edition. *Physics Bulletin*. 1968 1968/03;19(3):93-.
95. Brown NA, Bron AJ. An estimate of the human lens epithelial cell size in vivo. *Exp Eye Res*. 1987;44(6):899-906.
96. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):5839-48.
97. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*. 1992 Nov-Dec;5(6):834-42.

98. Padmaja S, Kissner R, Bounds PL, Koppenol WH. Hydrogen Isotope Effect on the Isomerization of Peroxynitrous Acid. *Helvetica Chimica Acta*. 1998;81(5-8):1201-6.
99. Schohn H, Gueant JL, Girr M, Nexo E, Baricault L, Zweibaum A, et al. Synthesis and secretion of a cobalamin-binding protein by HT 29 cell line. *Biochem J*. 1991 Dec 1;280 ( Pt 2):427-30.
100. Singh P, Velasco M, Given R, Wargovich M, Varro A, Wang TC. Mice overexpressing progastrin are predisposed for developing aberrant colonic crypt foci in response to AOM. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 2000//;278.
101. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25804-8.
102. Radi R, Denicola A, Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H. The Biological Chemistry of Peroxynitrite. 2000. p. 57-82.
103. Wang HJ, Zhang RH, Cole J, Chavez F. El Nino and the related phenomenon Southern Oscillation (ENSO): the largest signal in interannual climate variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11071-2.
104. Oikawa S, Yamada T, Minohata T, Kobayashi H, Furukawa A, Tada-Oikawa S, et al. Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jun 1;46(11):1472-7.
105. de Mattos MA, Toledo DG, de Martos CE, da Rocha AS, Hadlich M, Kohn L, et al. Angina pectoris in a young athlete with anomalous coronary artery. *Rev Port Cardiol*. 2007 Oct;26(10):1073-6.
106. Geacintov NE, Broyde S. *The Chemical Biology of DNA Damage*: Wiley; 2011.
107. Liu N, Ban F, Boyd RJ. Modeling competitive reaction mechanisms of peroxynitrite oxidation of guanine. *J Phys Chem A*. 2006 Aug 17;110(32):9908-14.
108. May SB, Barroso PF, Nunes EP, Barcaui HS, Almeida MM, Costa MD, et al. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy using non-brand name drugs in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Apr;40(4):551-5.
109. Hu CW, Chang YJ, Hsu YW, Chen JL, Wang TS, Chao MR. Comprehensive analysis of the formation and stability of peroxynitrite-derived 8-nitroguanine by LC-MS/MS: Strategy for the quantitative analysis of cellular 8-nitroguanine. *Free Radic Biol Med*. 2016 Dec;101:348-55.

