

TESIS de MAESTRÍA EN QUÍMICA
Facultad de Química - PEDECIBA Química

**I. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS
PARA DENITROSAR Y ETIQUETAR
S-NITROSOTIOLES BIOLÓGICOS**

**II. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS
URUGUAYOS**

Lic. Verónica Silva

**Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias - UdelaR**

Agosto 2010

**Director: Ana Denicola
Co-Director: Matías Möller**

Parte I

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA DENITROSAR Y ETIQUETAR S-NITROSOTIOLES BIOLÓGICOS

ÍNDICE

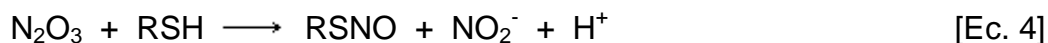
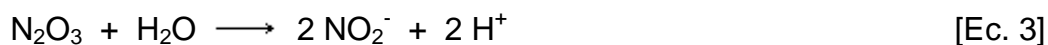
	Página
Resumen	3
1. Introducción	4
2. Objetivos	16
3. Materiales y Métodos	17
4. Resultados	23
4.1. Denitrosación catalítica de GSNO por halogenuros y pseudohalogenuros	23
4.2. Denitrosación de GSNO y SNOBSA mediada por pCMB	27
4.3. Denitrosación de GSNO mediada por EtHg	30
4.4. Denitrosación de RSNO por mercuriales cromóforos	33
5. Discusión	47
6. Bibliografía	57

RESUMEN

El óxido nítrico (*NO) es un mensajero biológico sumamente importante y versátil, involucrado en la neurotransmisión, el mantenimiento de la homeostasis vascular y en los mecanismos primarios de la defensa inmune. Es un radical libre producido *in vivo* por un grupo de enzimas llamada Óxido Nítrico Sintetas (NOS). Los efectos del *NO están mediados por reacciones directas con hemoproteínas o mediante especies reactivas derivadas de reacciones del *NO con oxígeno, superóxido y metales. La nitrosación de tioles proteicos es una modificación dependiente de *NO que ha tomado un gran protagonismo últimamente, ya que estaría implicada en mecanismos de señalización celular. A pesar de haberse encontrado más de 100 proteínas con cisteínas modificadas por S-nitrosación, aún es necesario establecer cuáles son los mecanismos por los que se forman y descomponen estos compuestos *in vivo*. Para esto es necesario contar con una técnica de identificación y caracterización de S-nitrosotioles (RSNO) eficiente. Se han desarrollado varios métodos para la cuantificación y determinación de RSNO de bajo peso molecular y proteicos, entre ellos encontramos el método de Saville, la quimioluminiscencia y el biotin switch. El biotin switch es el método de referencia para la identificación de proteínas S-nitrosadas, pero sufre de baja reproducibilidad en los resultados. Esta técnica se basa en la reducción del RSNO con ascorbato, dejando los tioles libres para la unión con un reactivo biotinilado, marcando específicamente los tioles que se encontraban nitrosados. La eficiencia del ascorbato como agente reductor ha mostrado ser variable y dependiente de la muestra biológica a analizar, y se ha identificado como el punto débil de la técnica de biotin switch. Por esta razón nos planteamos estudiar metodologías alternativas para la denitrosación de RSNO. En este trabajo se ensayó en primer lugar la capacidad de halogenuros, pseudohalogenuros, y una variedad de organomercuriales, de denitrosar RSNO de bajo peso molecular (S-nitrosoglutatión) y proteicos (S-nitrosoalbúmina y S-nitrosotiorredoxina). Demostramos que el yoduro tiene una capacidad denitrosante significativa, destacándose dentro de los halogenuros ensayados. Por otro lado se vio que los organomercuriales efectivamente reaccionan con RSNO, provocando la denitrosación y uniéndose a los tioles. En función de los resultados obtenidos se evalúa la utilidad de estos organomercuriales como potenciales herramientas para el desarrollo de una nueva técnica de descomposición e identificación específica de S-nitrosotioles.

1. INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) es un radical libre, producto de la reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de arginina, O_2 y NADPH. El $\bullet\text{NO}$ media una variedad de funciones en los sistemas biológicos, entre ellos la vasodilatación, la transmisión sináptica y la respuesta inmune. Si bien el $\bullet\text{NO}$ es un radical libre, no es altamente reactivo, reaccionando exclusivamente con centros metálicos y con otros radicales. A su vez, el $\bullet\text{NO}$ puede dar lugar a especies reactivas secundarias como el dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3 , Ec. 1 y 2), capaces de reaccionar con tioles de diferentes moléculas como cisteína, glutatión, albúmina, etc., formando sus derivados nitrosados llamados S-nitrosotioles (RSNO) (Ec. 4, ref.[3]).



En los sistemas biológicos, los tioles (RSH) constituyen la especie nucleofílica más importante, con concentraciones intracelulares mayores a 1 mM, capaces de reaccionar con estas especies electrofílicas derivadas del $\bullet\text{NO}$. La nitrosación de tioles en los sistemas biológicos es un tema de gran interés, ya que se han identificado varias proteínas y moléculas de bajo peso molecular con esta modificación y se ha sugerido que las mismas estarían implicadas en la señalización celular y serían una forma de reservorio y transporte de $\bullet\text{NO}$. Estos nitrosotioles han sido identificados en cantidades significativas *in vivo* en condiciones fisiológicas (Tabla 1). Los primeros estudios en RSNO indicaron concentraciones de los mismos de hasta 7 μM en plasma [4], sin embargo esto ha sido corregido al orden de nanomolar en organismos sanos y micromolar en estados patológicos [5-6], lo que es elevado en comparación con la concentración de $\bullet\text{NO}$ libre en plasma de aproximadamente 4 nM [7].

Tabla 1. Niveles de productos del $\cdot\text{NO}$ en plasma humano [8].

	Concentración plasmática (nM)
Nitrito	290 \pm 50
Nitrato	5700 \pm 600
S-nitrosotioles	1.35 \pm 0.5
S-nitrosoproteínas	95 \pm 14

La formación de RSNO es dependiente de la síntesis enzimática de $\cdot\text{NO}$, y su distribución varía de acuerdo al tejido [8] e incluso se observa nitrosación diferencial de proteínas según el tipo celular [2]. La S-nitrosación es una modificación postraduccional, y así como la fosforilación, se ha propuesto que estaría selectivamente dirigida a ciertos residuos, en este caso cisteínas en el contexto de un motivo estructural específico en la proteína [9-11]. Muchas proteínas que contienen cisteína, entre las que se incluyen enzimas, canales iónicos y factores de transcripción han sido encontradas en su forma nitrosada *in vivo*. Estas proteínas S-nitrosadas pueden activarse o inactivarse e influir en las funciones celulares como consecuencia de esta modificación [12-13]; por ejemplo modulando la respuesta inflamatoria [14], inhibiendo la degranulación y la agregación plaquetaria [15], regulando la apoptosis mediante la nitrosación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [16] y las caspasas 3 y 9 [17], regulando el estado redox celular a través de la nitrosación de proteínas del transporte electrónico mitocondrial [18], peroxirredoxina I [19] y tioredoxina [20]. Incluso se ha descrito una posible asociación con la enfermedad de Parkinson mediante la alteración de la actividad de la ubiquitín-ligasa E3 [21] y con el desarrollo de otras patologías neurológicas [21-22]. Es de destacar que aún la depleción celular de S-nitrosotioles puede llevar a alteraciones celulares que se han relacionado con algunos tipos de esclerosis lateral amiotrófica y problemas respiratorios [23]. Aunque el número de proteínas encontradas en su estado nitrosado sigue creciendo, habiéndose identificado más de 100 proteínas diferentes, no todas han sido caracterizadas a nivel estructural y funcional.

Además de estas funciones celulares, los S-nitrosotioles constituyen un reservorio de $\cdot\text{NO}$ en plasma, y es una de las formas mediante la cual el $\cdot\text{NO}$ aplicado por inhalación puede llegar a la circulación periférica [24]. Otro aspecto interesante de los S-nitrosotioles

en la circulación es su capacidad de atenuar el desarrollo de la arteriosclerosis en modelos animales de la enfermedad [25]. Por su lado el nitrosoglutatión (GSNO) del plasma (aunque presente a muy baja concentración) también posee una acción similar a la del $\cdot\text{NO}$ promoviendo la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria, debido a la lenta liberación del $\cdot\text{NO}$ desde el mismo [26]. Se ha demostrado que el GSNO es además un potente neuroprotector en modelos animales [27].

Si bien estos compuestos han cobrado importancia por sus posibles roles en señalización celular, transporte y reservorio de $\cdot\text{NO}$, y como marcadores del estado oxidativo celular, aún no se comprenden bien los mecanismos de formación de los S-nitrosotioles *in vivo*. Convencionalmente se considera que la principal ruta de formación de S-nitrosotioles es por la formación de N_2O_3 derivado de la autoxidación del $\cdot\text{NO}$ [28]. La reacción ocurre vía la donación de un equivalente de ión nitrosonio (NO^+) desde el N_2O_3 a un residuo nucleofílico, RSH (Ec. 4). Sin embargo, esta reacción es muy lenta a las concentraciones de $\cdot\text{NO}$ y O_2 encontradas *in vivo* y a pesar de que las membranas pueden acelerar esta reacción [29] y la misma S-nitrosación [30], ésta sigue siendo demasiado lenta como para competir con otras reacciones del $\cdot\text{NO}$ factibles en un medio biológico complejo. De hecho, de acuerdo con Lancaster, para que esta vía de nitrosación predomine sobre otras, la concentración de $\cdot\text{NO}$ disponible debería ser mayor a $23 \mu\text{M}$ [31].

Considerando entonces estas limitaciones cinéticas, se han propuesto nuevas vías para la formación de S-nitrosotioles, tal como la nitrosación radicalar [32-33]. En el sentido más amplio, la vía radicalar incluye la oxidación por un electrón del tiol para generar el radical tíolo ($\text{RS}\cdot$, Ec. 5), con el cual reacciona el $\cdot\text{NO}$ para dar el producto de terminación S-nitrosotiol (Ec. 6).

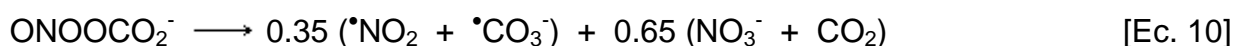
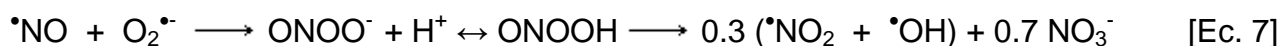


La constante de reacción entre el $\text{RS}\cdot$ y el $\cdot\text{NO}$, para distintos tioles de bajo peso molecular, se encuentra en el rango de $(2-3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [34]. Este valor indica que la reacción ocurriría a velocidades controladas por difusión, lo que sugiere que la formación

de RSNO por combinación radicalar es mucho más probable que por otros mecanismos [34].

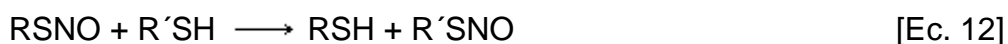
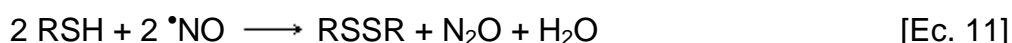
Desde la perspectiva de la S-nitrosación, esta hipótesis ampliada flexibiliza considerablemente los requerimientos convencionales de una gran concentración de $\cdot\text{NO}$ para conseguir la S-nitrosación. Ahora es necesario poco $\cdot\text{NO}$ y una fuente adicional de radicales oxidantes ($X\cdot$). Estos radicales oxidantes podrían provenir de diferentes fuentes *in vivo*, como ser a partir del peroxinitrito, de la actividad catalítica de diferentes enzimas redox, etc.

El $\cdot\text{NO}$ reacciona con el anión radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) a velocidades limitadas por difusión para formar peroxinitrito (Ec. 7), un potente agente oxidante y nitrante, el cual puede reaccionar con diferentes blancos tanto directa como indirectamente. El peroxinitrito produce radicales secundarios luego de protonarse, reaccionar con CO_2 o con metales, dando entre otros los radicales dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y anión carbonato ($\cdot\text{CO}_3^-$, Ec. 10) [35-36]. Tanto el $\cdot\text{NO}_2$ como el $\cdot\text{CO}_3^-$ pueden reaccionar con el grupo tiol para formar el radical tílo [37], (Ec. 5), necesario para la formación del S-nitrosotiol por reacción con $\cdot\text{NO}$ (Ec. 6). El peroxinitrito puede también oxidar a los tioles directamente según se indica en la Ec. 8.



Otra fuente importante de radicales *in vivo* son las peroxidasas [38]. La mieloperoxidasa en especial, está involucrada en la respuesta a patógenos por los neutrófilos. Esta enzima utiliza el H_2O_2 para oxidar cloruro (Cl^-) a hipoclorito (ClO^-), pero también puede usar como segundos sustratos a la tirosina, para generar radical tirosilo, y al nitrito para generar $\cdot\text{NO}_2$ [39]. Tanto el tirosilo como el $\cdot\text{NO}_2$ pueden reaccionar con tioles para generar el radical tílo, que en presencia de $\cdot\text{NO}$ podría producir el correspondiente S-nitrosotiol.

Otros mecanismos demostrados, principalmente a nivel intracelular, incluyen la transnitrosación entre diferentes tioles (Ec. 12) [40] y desde especies hierro nitrosiladas a un tiol libre (Ec. 13) [41]. La transnitrosación entre tioles ocurre por ataque nucleofílico sobre el átomo de nitrógeno del RSNO, donde se produce la transferencia del grupo nitrosonio desde un S-nitrosotiol ya formado, a otro tiol libre de la misma molécula o de una diferente. Por otro lado, Bosworth y *col.* [41], demostraron que el repertorio de hierro quelable (CIP) en las células está directamente relacionado con la formación de RSNO a nivel intracelular. El mecanismo implica la reacción directa del $\bullet\text{NO}$ con el CIP para formar complejos hierro dinitrosilo (DNICs) que subsecuentemente transfieren el grupo NO, como HNO^+ , a un tiol, principalmente proteico.



Otro mecanismo que involucra complejos con hierro, fue recientemente propuesto por Basu y *col.* [42]. A partir de resultados obtenidos *in vitro*, ellos demuestran que el citocromo c (citC), en presencia de GSH y $\bullet\text{NO}$, es capaz de sintetizar GSNO, tanto en presencia como ausencia de oxígeno. El mecanismo propuesto sugiere que el GSH se une al citC (Fe III), que en presencia de $\bullet\text{NO}$ forma un complejo citC (Fe III)-GS-N \bullet -OH, que termina dando citC (Fe II) y GSNO. Además observaron en estas condiciones la formación de S-nitrosoproteínas en partículas submitocondriales.

En general las vías de formación de RSNO difieren en el contexto de la velocidad relativa de formación de $\bullet\text{NO}$ y la presencia de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), lo que determinará la preponderancia de los diferentes mecanismos de reacción y los resultados funcionales de la actividad de la NOS. En este sentido se puede predecir que la vía de nitrosación por autoxidación del $\bullet\text{NO}$ será dominante en ambientes hidrofóbicos, cuando existan grandes cantidades de $\bullet\text{NO}$, bajo condiciones aeróbicas y en sitios espacialmente o temporalmente disociados de las fuentes de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Por otro lado la nitrosación radicalar u oxidativa prevalecerá en condiciones donde el $\text{O}_2^{\bullet-}$ esté presente y la concentración de $\bullet\text{NO}$ sea baja. La formación basal de compuestos nitrosados ocurrirá mayormente a baja

escala, en zonas discretas que favorezcan la equivalencia entre niveles nanomolares de $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$ en virtud del balance entre la reactividad entre ellos y el consumo de los mismos por sus scavengers específicos y reacciones de competencia. Bajo condiciones patológicas la formación de aductos del $\bullet NO$ por medio de cualquiera de los mecanismos mencionados puede servir como medio de contrarrestar y resolver las acciones deletéreas de la formación de peroxinitrito, como ser la oxidación [33].

Si bien no nos detendremos en ellas, es necesario contextualizar la S-nitrosación frente a otras reacciones oxidativas. De acuerdo a un modelo cinético planteado por Lancaster, considerando las posibles reacciones relevantes en un sistema biológico (Figura 1), la S-nitrosación es una modificación minoritaria frente a otras modificaciones oxidativas posibles de los tioles, como ser formación de disulfuros, sulfénico y sulfónico, glutatiónilación, etc. [1]. Recientemente, han surgido resultados experimentales [43] que apoyan este modelo teórico. Aún siendo una modificación minoritaria, si la S-nitrosación cumple roles de señalización, poco sería suficiente.

Todos los S-nitrosotioles, tanto proteicos como de bajo peso molecular, son moléculas lábiles, sensibles a la luz, al pH [44] y poseen una alta reactividad con agentes reductores intracelulares como ser el ascorbato o glutatión, así como con iones metálicos, especialmente el Cu^+ [26] y Fe^{2+} [44]. La vida media de estos compuestos varía de segundos a algunos minutos [2]. Se ha visto que algunas enzimas con funciones en el metabolismo de especies redox tienen la capacidad de consumir RSNO, entre ellas está la tiorredoxina (Trx) [20, 45] y la SOD [46]. Liu y *col.* propusieron que la enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión funciona como una reductasa específica (GSNOR), consumiendo el GSNO en las células [47]. Otras especies capaces de consumir RSNO de bajo peso molecular y proteicos son, el ácido lipoico [48] y las enzimas proteína isomerasa de disulfuros (PDI) [49], alcohol deshidrogenasa (ADH) [48] y xantina oxidasa [50].

A nivel experimental se han desarrollado varias técnicas de identificación y cuantificación de S-nitrosotioles, la mayoría de éstas son aplicables y reproducibles cuando se ensayan muestras con RSNO aislados. Sin embargo el desafío más importante se presenta al momento de identificar una proteína S-nitrosada en una muestra celular, ya

que la complejidad de la misma hace difícil uniformizar una técnica. Sería de gran utilidad contar con un método efectivo y específico para la identificación y cuantificación de S-nitrosotioles para así entender que factores influyen en su formación, cuales son las especies reactivas involucradas, y cuál es el rol biológico de la nitrosación. Generalmente no se puede identificar las proteínas nitrosadas y determinar la importancia (cantidad) de esa modificación simultáneamente, y por lo tanto se utilizan metodologías diferentes para cuantificar y para identificar las proteínas nitrosadas. Como se discute a continuación, ambos acercamientos son indirectos, en el sentido que requieren la descomposición del nitrosotiol para dar nitrito o un tiol libre, que puede ser utilizado entonces para la cuantificación, o como grupo reactivo para captura y estudios proteómicos.

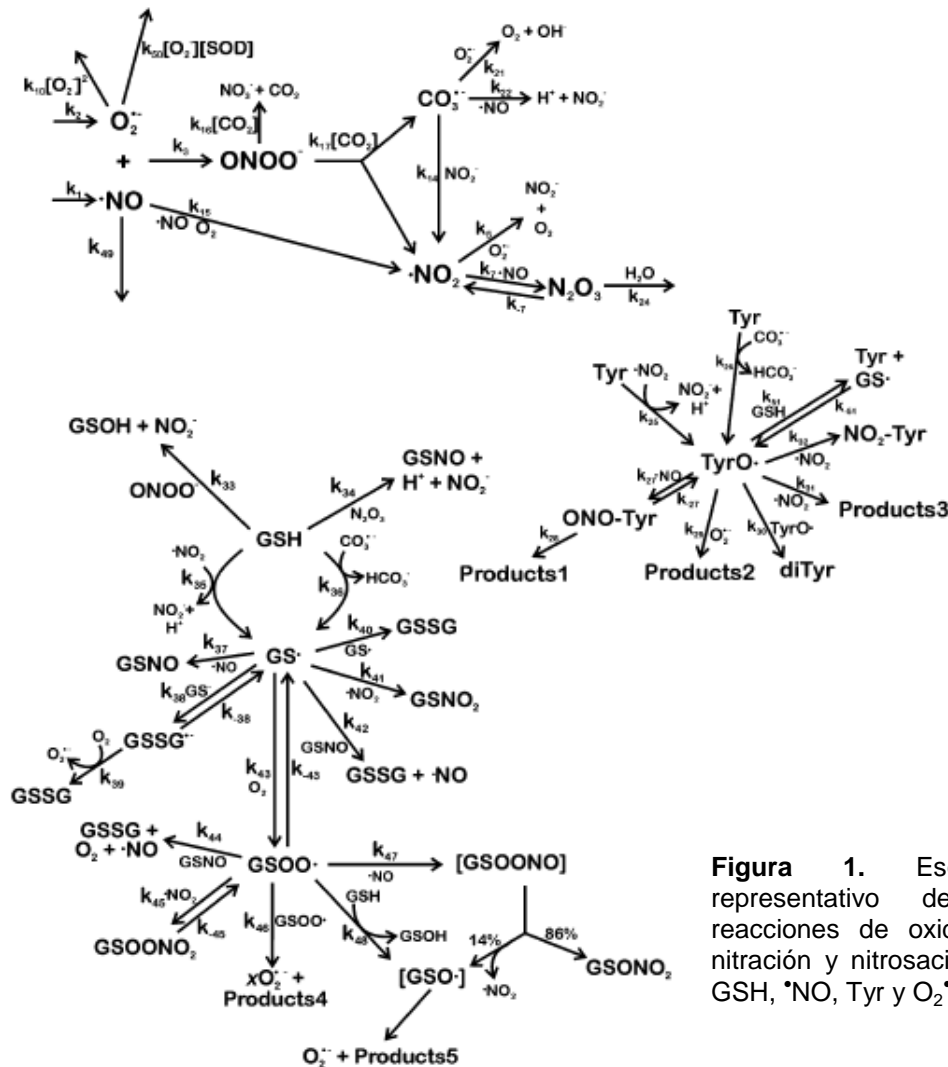


Figura 1. Esquema representativo de las reacciones de oxidación, nitración y nitrosación del GSH, *NO, Tyr y O₂⁻ [1].

Los RSNO pueden ser cuantificados directamente por espectrofotometría, pero con una muy baja sensibilidad. En ausencia de otras especies interferentes estos compuestos presentan dos máximos de absorción característicos entre 320 y 360 nm ($\epsilon = 500\text{-}800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y aproximadamente a 540 nm ($\epsilon = 8\text{-}15 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En conjunto con la cromatografía, estas absorbancias características se pueden utilizar para identificar y cuantificar RSNO de bajo peso molecular. Sin embargo, como los coeficientes de extinción son relativamente bajos la sensibilidad de esta técnica está en el rango de 0.1-10 mM, lo que impide el uso de este método para el análisis de muestras biológicas [51].

Para la determinación indirecta de RSNO existen varios métodos basados en la detección de nitrito (NO_2^-), entre ellos se encuentra el ensayo colorimétrico de Saville [52], el ensayo fluorimétrico con DAN (diamino naftaleno) [53] y el uso de diferentes cromatografías para el análisis de nitrito y nitrato. El método de Saville no es lo suficientemente sensible como para detectar RSNO proteicos en muestras celulares, ya que detecta concentraciones del orden micromolar. El método fluorimétrico por reacción con DAN es más sensible, determinando concentraciones del orden nanomolar. Ambas metodologías se basan en el desplazamiento del grupo NO^+ por Hg^{2+} , para formar NO_2^- , el que luego reacciona con los reactivos de Griess o con el DAN para dar un producto que puede cuantificarse por espectrofotometría o fluorescencia respectivamente.

Un método aún más sensible basado en la detección de $\bullet\text{NO}$ derivado de la descomposición del RSNO es la quimioluminiscencia reductiva [53]. Este método es lo suficientemente sensible y específico como para detectar niveles bajos de proteínas nitrosadas. En este ensayo el RSNO es descompuesto ya sea con Hg^{2+} o Cu^+ , desplazando el grupo NO^+ del nitrosotiol en forma de nitrito, el cual en presencia de una mezcla de yoduro/triioduro (I^-/I_3^-) es reducido nuevamente para formar $\bullet\text{NO}$. El $\bullet\text{NO}$ formado es detectado por quimioluminiscencia en un analizador de $\bullet\text{NO}$, donde reacciona con ozono formando $\bullet\text{NO}_2$ en estado excitado que emite luz en su decaimiento al estado basal. Si bien este método permite determinar concentraciones tan bajas como 10^{-12} M , tiene la desventaja de que necesita equipamiento especializado, no disponible en cualquier laboratorio. En general, estos métodos son útiles para cuantificar la nitrosación en el pool de proteínas, aunque no son lo suficientemente sensibles como para identificar proteínas individuales nitrosadas en una mezcla biológica.

Todos los métodos disponibles poseen desventajas, y por lo tanto es recomendable que las medidas de S-nitrosotioles sean confirmadas por al menos dos métodos diferentes. En cada caso se debe tener especial cuidado en la preparación de las muestras, ya que como se mencionó anteriormente, los RSNO son sensibles a muchos factores ambientales, como ser pH, luz y agentes reductores.

El método más usado en la literatura para la identificación de proteínas S-nitrosadas es el “biotin switch”. Este método se basa en la unión covalente de un reactivo biotinilado a los residuos S-nitrosados, para luego capturar e identificar la proteína biotinilada por métodos proteomicos (Figura 2). Para asegurar una identificación específica de los tioles nitrosados, es necesario bloquear químicamente los tioles libres en la proteína, ya sea con MMTS (metil-metanotiosulfonato) o NEM (N-etilmaleimida). Para desplazar los grupos NO^+ de los tioles S-nitrosados se utiliza ascorbato (HA^-) como agente reductor, el paso de bloqueo seguido de la reacción con ascorbato asegura que la biotina se una únicamente a aquellos tioles libres producidos por el paso previo de reducción de nitrosotioles con ascorbato. Luego de unida la biotina, la proteína identificada puede purificarse por cromatografía de afinidad o detectarse por inmunoblotting con un anticuerpo anti-biotina. A pesar de ser un método poderoso, se observa baja reproducibilidad en los resultados, principalmente debido al paso de reducción de los S-nitrosotioles proteicos por el ascorbato [40, 54-55]. La sensibilidad de este método es variada según la literatura, se ha observado que el contenido total de proteínas celulares S-nitrosadas identificadas por el método del biotin switch, está en el rango de nmol/mg de proteína y para una única proteína aislada el rango de sensibilidad es de 100 pmol/mg de proteína [54].

También se han desarrollado métodos de identificación basados en la unión específica a los residuos nitrosados de compuestos con propiedades fluorescentes [56-58], o que le proporcionan un cambio de masa significativo que permita su posterior identificación por espectrometría de masa (MS) [59-60]. Por ejemplo Tello, y *col.* [58] han desarrollado una técnica denominada “fluorescence switch”, la cual se basa en el mismo principio que el “biotin switch” pero utiliza un fluoróforo en lugar de biotina. Análogamente Forrester, y *col.* [60] utilizan también al “biotin switch” como base, pero marcando los tioles modificados con sondas de masa isotópicas o isobáricas.

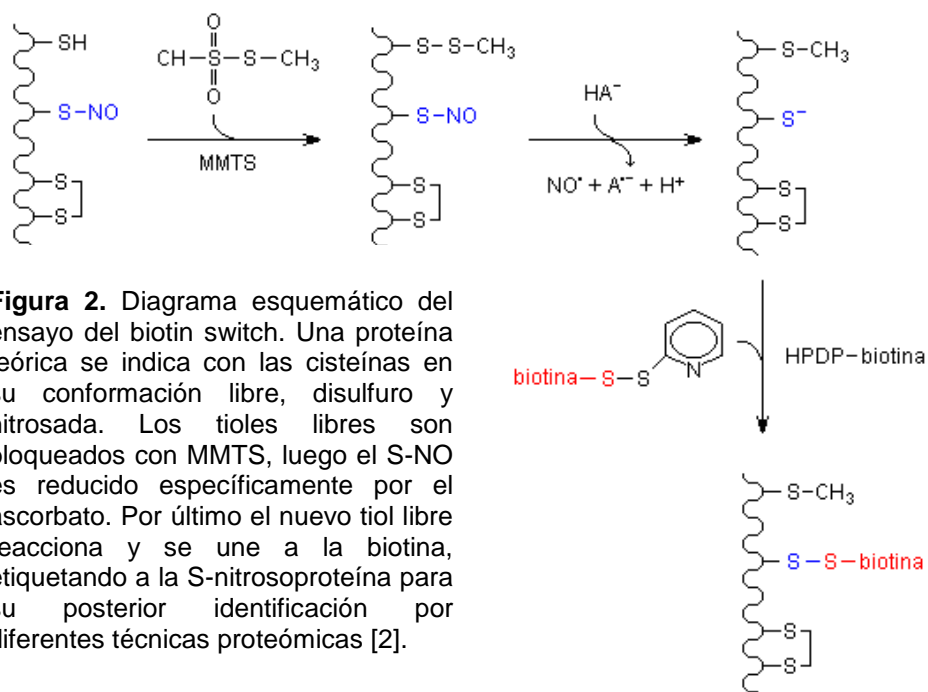


Figura 2. Diagrama esquemático del ensayo del biotin switch. Una proteína teórica se indica con las cisteínas en su conformación libre, disulfuro y nitrosada. Los tioles libres son bloqueados con MMTS, luego el S-NO es reducido específicamente por el ácido ascórbico. Por último el nuevo tiol libre reacciona y se une a la biotina, etiquetando a la S-nitrosoproteína para su posterior identificación por diferentes técnicas proteómicas [2].

Sin embargo, todos estos métodos de identificación de proteínas se basan en reducir el RSNO a tiol usando ácido ascórbico, el paso que genera mayor variabilidad en los resultados. Esto se debe a que el ácido ascórbico no reacciona rápidamente con el RSNO, sino que necesita de metales en solución (Cu^{2+} o Fe^{3+}) que una vez reducidos reaccionan rápidamente con los RSNO reduciéndolos [61]. En la mayoría de los trabajos reportados no se agregan metales en la etapa de reducción, por lo que la velocidad y eficiencia de reducción de los RSNO va a ser variable y dependiente de la calidad del agua y buffer utilizado en cada experimento, explicando la variabilidad observada en los resultados del biotin switch [61].

Como alternativa, se nos ocurrió que se podría evitar la variabilidad en los experimentos de captura de RSNO si se usara un método más directo o con una química más establecida. Fue así que decidimos estudiar la interacción del mercurio y organomercuriales con RSNO.

El mercurio, al igual que otros metales pesados, tiene una alta afinidad por el azufre de los grupos tioles de bajo peso molecular y proteicos [62], con constantes de formación de complejos de entre $10^{16} - 10^{22} \text{ M}^{-1}$ [63]. De hecho, la alta afinidad del

mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y orgánico (Hg^+) por tioles críticos de enzimas y proteínas es la base del mecanismo de toxicidad del mismo. El mercurio ha sido utilizado desde hace mucho tiempo para propósitos analíticos y de diagnóstico, en la cuantificación e identificación de tioles por métodos amperométricos [64] y conductimétricos [65]. Existen diferentes mercuriales orgánicos (R-Hg) disponibles comercialmente y que son utilizados como sondas específicas de tioles, ya que por la alta afinidad existente, el mercurial permanece unido fuertemente al tiol. Dado estos antecedentes y teniendo en consideración la utilidad del método de Saville, los organomercuriales constituyen herramientas potencialmente útiles para la identificación específica de sitios de nitrosación. Considerando la estructura de estos compuestos, puede decirse que el átomo de mercurio constituye un agente denitrosante específico, desplazando el grupo NO^+ del RSNO para unirse al tiol, y por otro lado el grupo R ofrece una etiqueta específica que dependiendo de su naturaleza puede tener propiedades colorimétricas o fluorimétricas que favorezcan su identificación.

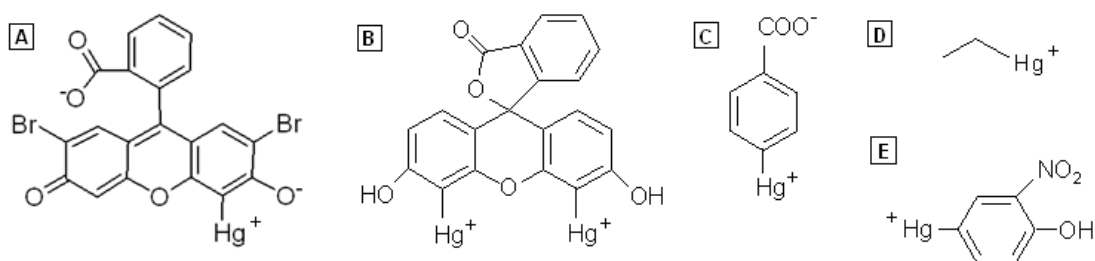


Figura 3. Estructura de organomercuriales ensayados.

A. Merbromina o Mercuriocromo **B.** Mercurifluoresceína **C.** p-Cloromercuribenzoato **D.** Etilmercurio **E.** 4-Hidroxi-3-nitrofenilmercurio. Los compuestos A, B y E son las correspondientes sales de acetato y los compuestos C y D son cloruros.

Considerando las limitaciones del ascorbato como reductor de RSNO, nos hemos propuesto desarrollar métodos alternativos al mismo para denitrosar S-nitrosotioles, o capturar directamente residuos S-nitrosados, que eventualmente podrían ser usados en conjunto con el “biotin switch” para identificar proteínas S-nitrosadas más eficientemente. En este trabajo se ensayaron diferentes organomercuriales (Figura 3) como agentes denitrosantes, se caracterizó la reacción de éstos con RSNO y se analizó la utilidad de los mismos para el desarrollo de una nueva técnica de identificación y cuantificación de RSNO. Por otro lado se evaluó también el uso de otros reactivos con potencial capacidad

denitrosante, como ser halogenuros, azida y tiocianato. Se utilizó como modelo de tiol de bajo peso molecular al S-nitrosoglutatión (GSNO) y como modelos de tioles proteicos a la S-nitrosoalbúmina bovina (SNOBSA) y a la S-nitrosotiorredoxina 1 humana (SNOTrx).

En definitiva, el desarrollo de un método efectivo y específico para la identificación y cuantificación de S-nitrosotioles sería de gran utilidad para entender el mecanismo e identificar las especies reactivas involucradas en la nitrosación biológica. Se espera que luego de conocer las proteínas blanco de esta modificación, se pueda entender las propiedades y mecanismos que llevan a su S-nitrosación *in vivo*, así como las consecuencias a nivel del metabolismo y respuestas celulares.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollar herramientas que ayuden a identificar tioles nitrosados

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudio de la denitrosación de GSNO mediada por halogenuros y seudohalogenuros

2.2.2. Estudio de la denitrosación de GSNO mediada por mercuriales orgánicos: estequiometría y cinética.

2.2.3. Estudio de la denitrosación de SNOBSA Y SNOTrx mediada por mercuriales orgánicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales. El glutatión (GSH), albúmina bovina (BSA), carbón activado (C4386), ácido dietilentriaminopentaacético (dtpa), β -mercaptoetanol, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), *N*-etilmaleimida (NEM), cloruro de mercurio (HgCl_2), nitrito de sodio (NaNO_2), *N*-(1-naftil)-etilendiamina, sulfanilamida, *p*-cloro-mercurio-benzoato (*p*-CMB), mercurio dibromofluoresceína sal disódica (Mer), etilmercurio (EtHg), acetato de 4-hidroxi-3-nitrofenilmercurio (NitroHg), acetato de mercurifluoresceína (FMA) y filtros de nitrocelulosa de 0.22 y 0.8 μm fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo. U.S.A.). Las columnas PD-10 (Sephadex G-25) utilizadas fueron obtenidas de GE Healthcare, las columnas cromatográficas macro spin (biospin) fueron obtenidas de Harvard Apparatus y los filtros amicon ultra (corte 10kDa, centricon) se obtuvieron de Millipore. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico. La tiorredoxina humana (Trx) recombinante fue cedida por el MSc. Bruno Manta (Institut Pasteur de Montevideo), la enzima alquil hydroperóxido reductasa E de *Mycobacterium tuberculosis* (AhpE) recombinante, fue cedida por el Lic. Martín Hugo (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR).

3.2. Síntesis de *S*-nitrosoglutatión (GSNO). El GSNO se prepara mediante la reacción de glutatión reducido (GSH) y una cantidad equimolar de NaNO_2 en 0.2 M HCl, a temperatura ambiente en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4. La concentración final de GSNO se cuantifica espectrofotométricamente a 334 nm ($\epsilon_{334} = 820 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [3] en un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible.

3.3. Preparación de BSA. La BSA comercial contiene muchos lípidos unidos y se encuentra en su mayoría con el tiol oxidado, por ello antes de usarla se debe delipidar y reducir los tioles. La BSA se delipida con carbón activado según el protocolo de Chen [66]. Brevemente, se prepara una solución de BSA 10% en agua destilada y se lleva a pH 3 con HCl. Se agrega carbón activado y se mantiene en agitación en un baño de hielo durante 1 hora. Se centrifuga a 11000 rpm y luego a 17000 rpm durante 30 minutos cada vez. Se filtra en forma simultánea con dos filtros de 0.2 μ y 0.8 μ , tantas veces como sea necesario, se lleva a pH 7.4 con NaOH y se conserva a -20°C . Para cuantificar la concentración de BSA final se mide su absorbancia a 279 nm ($\epsilon_{279} = 0.667 \text{ ml/mg}\cdot\text{cm}^{-1}$) [67]. El tiol de la BSA se reduce con β -Mercaptoetanol. La BSA se incuba con un exceso

de reductor de 7 veces durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de reductor se remueve por gel filtración en una PD-10 (GE Healthcare) equilibrada con buffer fosfato 10 mM, pH 7.4. Para corroborar la reducción efectiva del tiol de la BSA, se cuantifican éstos según el método de Ellman [68] usando DTNB. El producto de reacción se cuantifica espectrofotométricamente a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.3. Síntesis de S-nitrosoalbúmina (SNOBSA). La SNOBSA se obtiene de la reacción de la BSA reducida con nitrito en medio ácido. La BSA delipidada y reducida se incubó con NaNO_2 de concentración equivalente al 95% de la concentración de tioles de BSA utilizada y HCl 0.3 M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agrega *N*-etilmaleimida (NEM) 50 mM para bloquear aquellos tioles que no se hayan nitrosado y se elimina su exceso por diálisis con buffer fosfato 100 mM, dtpa, 0.1 mM pH 7.4. La formación de SNOBSA puede evidenciarse en un espectro de absorción entre 200 – 400 nm como un pico aproximadamente a 334 nm.

3.4. Tiorredoxina. La tiorredoxina 1 humana, la cual contiene 5 cisteínas libres, se obtuvo recombinante de *E.coli* y se conservó liofilizada a -20°C [69]. Para su uso, esta Trx se resuspendió en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, NaCl 150 mM, DTT 10 mM, pH 7.4, se alícuotó y conservó a -20°C . Para obtener la Trx no reactiva se bloquearon los tioles de la misma con NEM, para esto se descongeló una de las alícuotas en DTT y se la incubó con NEM 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla se gel filtró en un biospin para eliminar el exceso de reductor y NEM. Se colectó la fracción de alto peso molecular y se cuantificaron las concentraciones de proteína y tioles por el método de Ellman (ver Materiales y Métodos 3.3). Una vez que se constató que la Trx tratada con NEM no poseía tioles libres se la conservó como Trx-NEM a -20°C . Para la síntesis de S-nitrosotiorredoxina (SNOTrx) nos basamos en el procedimiento descrito anteriormente por Weichsel y *col.* [55]. Para esto se descongeló una alícuota de Trx en buffer suplementado con DTT, se realizó una gel filtración en biospin y se cuantificó proteína en la fracción colectada. Luego se incubó a la Trx reducida (4 mg/ml) con 12 mM GSNO durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez concluido el tiempo de incubación se agregó NEM 50 mM para bloquear aquellos tioles que no fueron nitrosados por el GSNO y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. La mezcla se pasó por un biospin nuevamente para eliminar el exceso de los reactivos de bajo peso molecular y se cuantificó proteína en la fracción colectada. Finalmente se

verificó que la SNOTrx colectada no tuviera tioles libres (método de Ellman) y se determinó el rendimiento de nitrosación por el método de Saville (ver Materiales y Métodos 3.4), siendo el resultado obtenido de 4SNO/Trx. La concentración de proteína se determinó en todos los casos utilizando el método del ácido bicinconínico (kit de BCA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. U.S.A.).

3.4. Cuantificación de S-nitrosotioles por Saville. El NO^+ del nitrosotiol es desplazado por el Hg^{2+} y luego reacciona con la sulfanilamida (solución S del reactivo de Griess) en condiciones ácidas para formar la sal de diazonio. Esta luego reacciona con el *N*-(1-naftil)-etilendiamina (solución N del reactivo de Griess) para formar un compuesto coloreado que absorbe a 540 nm (Figura 4). Se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de GSNO y se preparan las muestras de RSNO a ensayar. Luego tanto las muestras como los estándares de calibración se tratan con 1 mM Hg^{2+} por unos minutos y se agrega una mezcla de los reactivos S y N. Se mide la absorbancia del producto coloreado resultante a 540 nm. Los resultados se corrigen con respecto a un control negativo conteniendo únicamente el nitrosotiol y los reactivos de Griess.

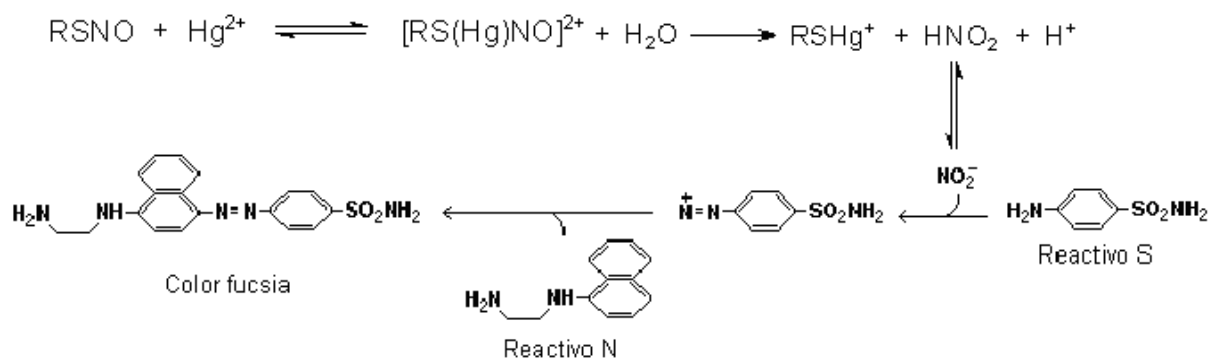


Figura 4. Esquema representativo del ensayo de Saville.

3.5 Denitrosación catalítica de GSNO. Los experimentos de denitrosación catalítica del GSNO se basan en el esquema reactivo siguiente [37]:



Como catalizadores se utilizaron halogenuros (KI, KBr), tiocianato (KSCN) y azida (N_3^-) en medio ácido [37]. Como trampa del ácido nitroso libre se utilizó sulfamato de amonio. Se incubó 1 mM GSNO con 10 mM sulfamato, 1 mM KI, KBr, KSCN y azida en cada caso, en

2 M HCl para KI, KBr y KSCN y 0.5 M HCl para la azida. Las soluciones fueron preparadas en buffer fosfato 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4. Se preparó como control una solución conteniendo 1 mM GSNO, 10 mM sulfamato, HCl y buffer. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos. Se realizaron espectros de absorción entre 200–400 nm para seguir espectrofotométricamente la descomposición del GSNO. Para determinar la capacidad denitrosante del KI en particular, se incubó 1 mM GSNO con 1 y 2 mM KI en 1 M HCl y 10 mM sulfamato a 37°C durante 30 minutos. Por otro lado se estudió la capacidad denitrosante del HCl, para lo que se incubó en las mismas condiciones 1 mM GSNO, 10 mM sulfamato y concentraciones de 0.5, 1, 1.5, y 2 M HCl. Todas las soluciones fueron preparadas en buffer fosfato 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4. La denitrosación fue cuantificada como la disminución de la absorbancia a 334 nm.

3.6. Denitrosación de GSNO por organomercuriales. Dado que el pCMB y el EtHg son mercuriales incoloros y no interfieren con la absorción del GSNO a 334 nm, se estudió la denitrosación mediada por los mismos por espectrofotometría directa. Se incubó GSNO con el mercurial correspondiente en condiciones de concentración, tiempo y temperatura según se indica en cada caso. Se realizaron espectros de absorción UV-Vis y/o se registró la absorbancia a 334 nm, a partir de la cual se cuantificó el GSNO remanente (máximo de absorbancia del GSNO). La denitrosación mediada por estos mercuriales y por los demás (NitroHg, Merc y FMA) se estudió por el método de Saville. Se incubó a las muestras de GSNO con el organomercurial correspondiente y luego se cuantificó el nitrito liberado por esta reacción con los reactivos de Griess (ver Materiales y Métodos 3.4). La concentración de nitrito se calculó a partir de una curva de calibración con GSNO y exceso de Hg^{2+} . Todos los ensayos se realizaron en buffer fosfato 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4. Por otro lado se realizaron espectros UV-visible para los mercuriales coloreados luego de su incubación con GSNO y se lo comparó con los obtenidos para los mercuriales solos. Para el FMA se realizaron además espectros de emisión de fluorescencia entre 500-600 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 490$), en un espectrofluorímetro AMINCO-Bowman Series 2.

3.7. Ensayos cinéticos de la reacción entre GSNO y pCMB/EtHg. La cinética de reacción del GSNO con pCMB a 37°C se estudió por el método de las velocidades iniciales, en un dispositivo de mezclado rápido (stopped flow). Para ello se siguió la desaparición de GSNO a 334 nm en presencia de concentraciones variables de pCMB en

buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, y viceversa. Para la cinética entre GSNO y EtHg se incubó GSNO con un exceso de 10 veces de EtHg para estudiar la reacción en condiciones de pseudo primer orden. Se registró la desaparición de GSNO a 334 nm cada 30 segundos durante 90 minutos y los registros obtenidos se ajustaron a una exponencial de primer orden. A partir de los resultados obtenidos en ambos casos se determinó la constante de reacción de segundo orden, k ($M^{-1} s^{-1}$).

3.8. Denitrosación de SNOBSA por pCMB. Para estudiar la denitrosación de la SNOBSA, se ensayó el efecto de 1 mM pCMB sobre 100 μ M SNOBSA en buffer fosfato 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4, por 30 minutos a 37°C, y se la comparó con un control de SNOBSA sin pCMB. Las muestras fueron analizadas con el fin de determinar la unión del pCMB a los tioles que se encontraban nitrosados. Para ello se realizó un espectro de absorción entre 220 y 350 nm para analizar el cambio espectral a 255 nm con respecto al control, debido a la absorbancia del pCMB unido a la proteína. El rendimiento de unión puede determinarse por la absorbancia a 255 nm, donde el ϵ_{255} del aducto es igual a $9.3 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ [70]. La cantidad de pCMB unido a BSA fue determinado por este método y además por Saville, como la diferencia entre la SNOBSA total y la tratada con pCMB.

3.9. Tiorredoxina (SNOTrx y Trx-NEM) y FMA:. Para evaluar el efecto denitrosante del FMA sobre la SNOTrx se trató a la misma con un exceso de mercurial, considerando que cada mol de Trx posee 4 moles de nitrosotiol. Se incubó SNOTrx 69 μ M (276 μ M SNO) con 1 mM FMA, durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Luego la mezcla se filtró por un lado en biospin para colectar la fracción de alto peso molecular y por otro lado en centricon (límite de corte 10 kDa), para obtener la fracción de bajo peso molecular. Se realizaron espectros de absorción y emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 490$ y 280 nm) sobre la fracción de alto peso molecular y se cuantificó proteínas por BCA. Por otro lado se cuantificó la concentración de nitrito en la fracción de bajo peso molecular por el método de Griess. Se utilizó Trx-NEM para determinar si la reacción del FMA con la Trx ocurre exclusivamente a través de las cisteínas reactivas. Para ello se trató Trx-NEM 68 μ M con FMA 1 mM durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad, luego se procedió de la misma manera descrita anteriormente para la SNOTrx. La solución de FMA stock se preparó en NaOH 0.1 M y la concentración se determinó espectrofotométricamente a 499 nm en 1 M NaOH ($\epsilon_{499} = 7.8 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) [71].

3.10. Mercuriocromo y proteínas. Se evaluó la capacidad del mercuriocromo (Merc) de interaccionar con tioles libres de diferentes proteínas, BSA, Trx y alquil hydroperóxido reductasa E de *Mycobacterium tuberculosis* (AhpE). La BSA con su Cys 34 reducida se preparó como se describe en Materiales y Métodos 3.3 y dicha fracción se denominó BSA-SH. Posteriormente se obtuvo una BSA con el tiol bloqueado con NEM (BSA-NEM), para lo que se incubó a la proteína con 10 veces exceso de NEM durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego la mezcla se dializó contra buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4. Los tratamientos de BSA-SH y BSA-NEM con cantidades equimolares de Merc en relación a la concentración de tioles determinados por el método de Ellman, se realizaron a 37°C durante 1 hora y 30 minutos respectivamente. La Trx reducida y bloqueada se obtuvo según se describe en Materiales y Métodos 3.4. La Trx-SH y Trx-NEM se trató con un exceso de Merc durante toda la noche a 4°C. La AhpE reducida y bloqueada se obtuvo según se describe en Hugo y *col.* [72]. La AhpE-SH y AhpE-NEM se trató con Merc en las mismas condiciones que para la Trx. La formación del aducto proteína-mercurial se analizó espectrofotométricamente, por aparición de un pico característico a aproximadamente 520 nm. Para eliminar el mercurial que no haya reaccionado con la proteína, todas las mezclas de incubación fueron sometidas a un paso de separación previo al análisis espectral, las cuales incluyeron gel filtración en columnas PD-10 o biospin (cuando los volúmenes fueron pequeños), filtración en centricones con corte para 10 kDa o ciclos de precipitado y resuspensión con acetona fría. La concentración de proteína en cada fracción de proteína obtenida luego del paso de separación se cuantificó por absorbancia a 280 nm, para la BSA ($\epsilon_{280} = 0.667 \text{ ml/mg}$), o con el método del ácido bicinónico, para la Trx y AhpE. La solución de mercuriocromo se preparó en buffer fosfato 100 mM NaPi, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, y la concentración se determinó espectrofotométricamente a 506 nm ($\epsilon_{506} = 45500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [73].

4. RESULTADOS

4.1. Denitrosación catalítica de GSNO por halogenuros y pseudohalogenuros

Para la denitrosación catalítica de GSNO se estudió el efecto de cuatro agentes: azida de sodio, ioduro de potasio, bromuro de potasio y tiocianato de potasio, en todos los casos se utilizó ácido clorhídrico para acidificar el medio y sulfamato de amonio como trampa para el ácido nitroso formado de la descomposición del GSNO. Estos reactivos reaccionan fácilmente con el ácido nitroso y el producto de la misma es utilizado como agente nitrosante de diferentes moléculas. Estos compuestos (N_3^- , Br^- , I^- y SCN^-) son potentes aceptores del grupo NO^+ y por ello se los eligió para analizar la capacidad denitrosante sobre el GSNO, en donde se espera que ocurra una transnitrosación desde el GSNO al catalizador (Ec. 14), y luego del catalizador al sulfamato para dar el catalizador libre nuevamente (Ec. 15).

4.1.1. Efecto de la azida

El ión N_3^- es un compuesto fácilmente “nitrosable” ya que reacciona rápidamente con el ácido nitroso dando los productos N_2O y N_2 . En los ensayos con azida el GSNO sintetizado se expuso a concentraciones de 1 y 10 mM azida, 10 mM sulfamato y concentraciones de 0.1 y 0.5 M HCl, para cada concentración de azida. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37°C , luego de este tiempo se siguió y cuantificó espectrofotométricamente a 334 nm la denitrosación mediada por este reactivo. Cada preparación con azida y sulfamato fue comparada con un control con la misma concentración de GSNO y HCl. Como puede observarse en la Figura 5, la azida no provocó niveles significativos de denitrosación en ninguna de las condiciones ensayadas.

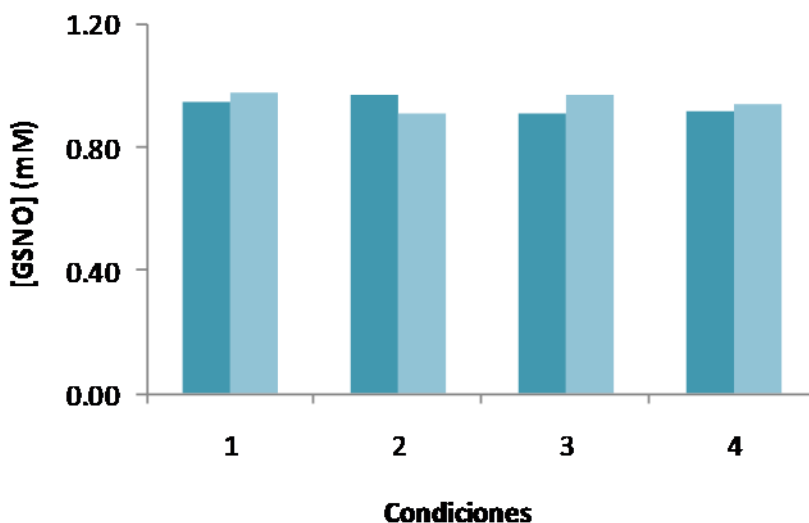


Figura 5. Concentración de GSNO en presencia (barras claras) y ausencia (barras oscuras) de azida. Se trató GSNO 1 mM, sulfamato 100 mM con: **(1)** 1 mM azida y 0.1 M HCl, **(2)** 10 mM azida y 0.1 M HCl, **(3)** 1 mM azida y 0.5 M HCl, **(4)** 10 mM azida y 0.5 M HCl.

4.1.2. Efecto de halogenuros y tiocianato

Los compuestos nitrosil-halogenuros y nitrosil-tiocianato (XNO) han sido identificados cinéticamente como las especies reactivas (generadas *in situ*) de las reacciones de nitrosación que usan ácido nitroso (HNO_2) en presencia de un ión halogenuro o un ión tiocianato. En estas condiciones se producen concentraciones de equilibrio de XNO, el que luego actuará como el reactivo nitrosante.

Para ensayar la capacidad denitrosante del Br^- , I^- y SCN^- , se incubó GSNO con 1 mM de cada reactivo en 10 mM sulfamato y buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, durante 30 minutos a 37 °C. Para acidificar el medio se utilizaron concentraciones de HCl entre 0.1 y 2 M. Se realizaron espectros de absorción para cada caso y la denitrosación fue cuantificada como la disminución de la absorción del GSNO a 334 nm. Cada muestra fue comparada contra un control conteniendo únicamente GSNO, sulfamato y la concentración de HCl correspondiente en cada caso.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de GSNO determinadas en cada muestra a 2 M HCl. A concentraciones menores de 2 M HCl no se observó denitrosación alguna. La concentración inicial de GSNO determinada fue de 0.98 mM, la cual disminuyó

en un 2 % en presencia de Br^- , 78% en presencia de I^- y 5 % en presencia de SCN^- . Como se muestra en la figura 6, el agente más eficiente en la denitrosación fue el I^- , muy por encima de los demás reactivos. Sorprendentemente el SCN^- no probó ser el mejor catalizador como era de esperarse.

Tabla 2. Concentración de GSNO en ausencia y presencia de agente denitrosante.

Muestra	[GSNO] mM
GSNO	0.98
GSNO + KBr	0.96
GSNO + KI	0.22
GSNO + KSCN	0.95

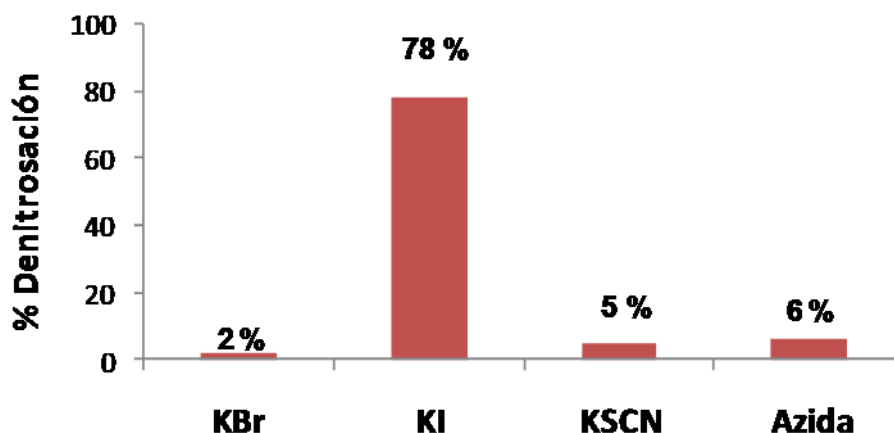


Figura 6. Cuadro comparativo de porcentajes de denitrosación mediada por diferentes agentes denitrosantes. Se incubó GSNO 1mM durante 30 minutos a 37 °C con 1 mM KBr, KI, KSCN en 2 M HCl o 10 mM azida en 0.1 M HCl en 10 mM sulfamato. Los porcentajes se calcularon con respecto a las muestras control en cada caso.

Por otro lado se ensayó también la capacidad denitrosante del HCl sobre el GSNO, en ausencia y en presencia de KI. En estos ensayos se incubó en las mismas condiciones de tiempo y temperatura 1 mM GSNO, 10 mM sulfamato y 0.5, 1, 1.5 y 2 M HCl. Al mismo tiempo se prepararon muestras iguales pero en este caso en presencia de 1 mM KI. En la Figura 7 se muestran los resultados de estos ensayos, en donde se observa que en

ambos casos la concentración de GSNO disminuye. Sin embargo, la denitrosación es mayor cuando actúan al mismo tiempo Cl^- y I^- . Estos resultados demuestran que el Cl^- es capaz de provocar una denitrosación de GSNO dependiente de su concentración e independiente de la acción de los otros halogenuros y pseudohalogenuros utilizados.

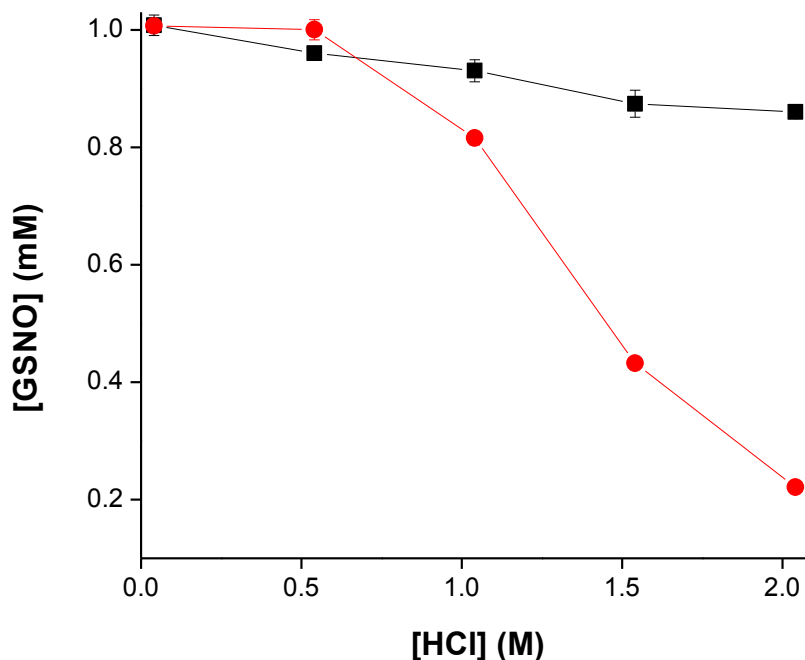


Figura 7. Denitrosación mediada por diferentes concentraciones de HCl en ausencia (negro) y presencia de 1 mM KI (rojo). La concentración de GSNO fue determinada espectrofotométricamente a partir de las absorbancias de cada muestra a 334 nm, luego de 30 minutos de incubación a 37 °C en 10 mM sulfamato y buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4.

Para observar una denitrosación considerable de GSNO fueron necesarias condiciones de acidez extremas, lo cual hace inapropiado trasladar estos ensayos a nivel celular. Bajo estas condiciones es muy probable que las proteínas se desnaturalicen y precipiten, impidiendo analizar la denitrosación de la misma. Es entonces por esta razón que no se ensayó la capacidad denitrosante de estos agentes sobre los modelos de S-nitrosoproteínas utilizados en este trabajo.

4.2. Denitrosación de GSNO y SNOBSA mediada por pCMB.

Para evaluar la capacidad denitrosante del *p*-cloromercuriobenzoato (*p*CMB, Figura 3) se incubó GSNO con concentraciones crecientes de *p*CMB durante 1 hora a 37°C, en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4 y luego se cuantificó el GSNO remanente por disminución de la absorbancia a 334 nm ($\epsilon_{334}^{\text{GSNO}} = 820 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En la Figura 8, se muestra como disminuye la concentración de GSNO dependiendo de la concentración de *p*CMB utilizado. Se puede concluir que el *p*CMB es un agente efectivo en la denitrosación de GSNO. De la Figura 8 se concluye también que la estequiometría de reacción entre el GSNO y el *p*CMB es de 1:1 en estas condiciones.

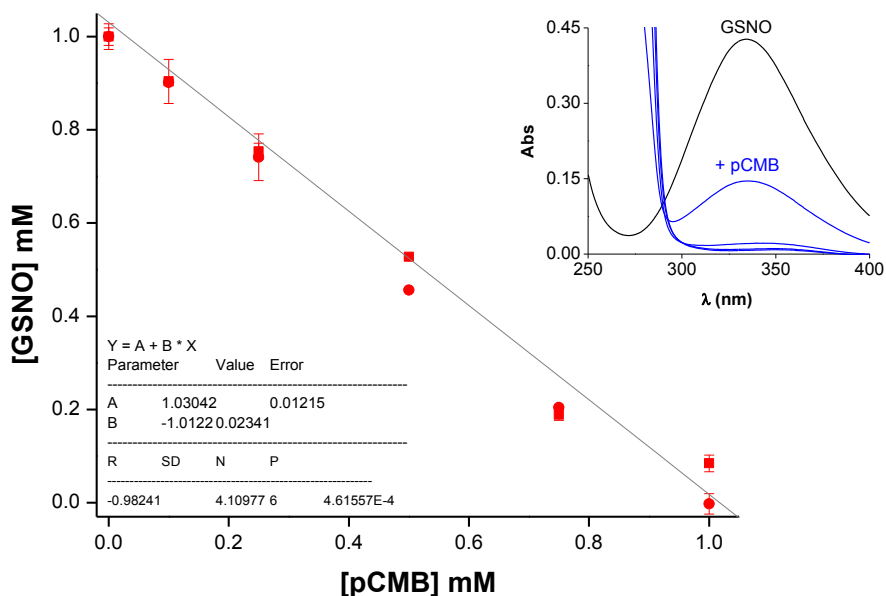


Figura 8. Estequiometría de la reacción entre el GSNO y el *p*CMB. La denitrosación de 1 mM GSNO a diferentes concentraciones de *p*CMB se determinó a 334 nm luego de 1h de incubación a 37°C. **Inserto**, espectro de absorción del GSNO en ausencia (negro) y presencia de concentraciones crecientes de *p*CMB (azul).

Por otro lado se estudió la cinética de la reacción del GSNO con el *p*CMB (Ec. 14) a 37°C utilizando el método de las velocidades iniciales. La reacción entre GSNO y concentraciones variables de *p*CMB en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, y viceversa, se siguió a 334 nm. En la Figura 9 se muestra una gráfica representativa de estos resultados. La constante de reacción de segundo orden, *k*, determinada utilizando

las ecuaciones 17 y 18 en cada caso, fue de $1.33 \pm 0.11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esto indica que aunque la reacción es lenta comparada con la reacción espontánea entre el GSNO y Hg^{2+} , la misma ocurre en un tiempo adecuado para la utilización del pCMB como herramienta potencial para denitrosar, identificar y cuantificar GSNO.



$$v_o = k[\text{GSNO}][\text{pCMB}] \quad [\text{Ec. 17}]$$

$$k_{\text{obs}} = k[\text{GSNO}] \quad \text{o} \quad k_{\text{obs}} = k[\text{pCMB}] \quad [\text{Ec. 18}]$$

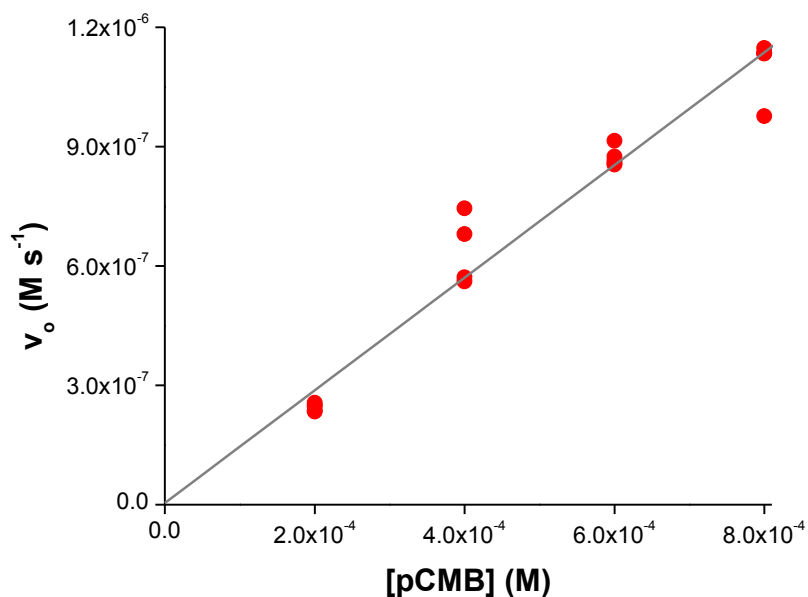


Figura 9. Cinética de la reacción entre GSNO y pCMB. Se registró la desaparición de GSNO debido al pCMB a 334 nm. La pendiente de la recta corresponde a k_{obs} .

Dado que los ensayos de denitrosación de GSNO con pCMB fueron satisfactorios, se decidió ensayar este mercurial sobre un nitrosotiol proteico. Para esto se sintetizó S-nitroso albúmina bovina (SNOBSA). La formación de SNOBSA se evidencia en un espectro de absorción entre 200 – 400 nm como un pico aproximadamente a 334 nm (Inserto Figura 10). La SNOBSA sintetizada se incubó con un exceso de pCMB durante

30 minutos a 37°C, luego se eliminó el *p*CMB que no reaccionó por gel filtración, y se estudió espectrofotométricamente la formación del aducto *p*CMB-BSA.

Como se mencionó anteriormente, los mercuriales orgánicos reaccionan de forma muy específica con grupos tioles, y la reacción del *p*CMB con éstos va acompañada de un cambio espectral a 250 nm aproximadamente ($\epsilon_{250}^{pCMB} = 9.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La formación del mercuritiol produce un aumento en la absorbancia a esa longitud de onda, haciendo fácilmente identificable la SNOBSA unida a *p*CMB de la SNOBSA control, los resultados espectrales se muestran en la Figura 10. A partir del espectro se puede observar cómo la absorbancia a 250 nm aumenta en la muestra tratada con *p*CMB, confirmando que el tiol nitrosado de la BSA interacciona directamente con este mercurial. A partir de la diferencia de absorbancias a 250 nm de las muestras con y sin *p*CMB, se determinó que el porcentaje de *p*CMB unido a la SNOBSA fue de **70 ± 18 %**.

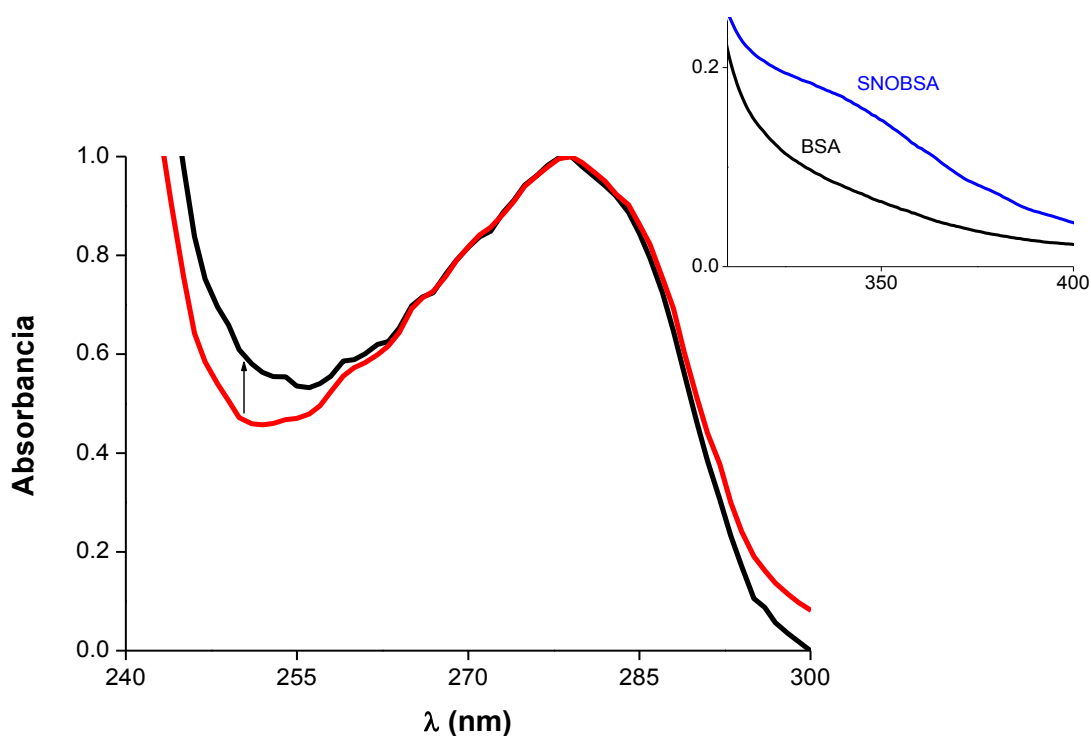


Figura 10. Espectros de absorción de SNOBSA en ausencia (rojo) y presencia (negro) de 1 mM *p*CMB. La flecha indica el sentido del cambio espectral provocado por la interacción del *p*CMB con la SNOBSA a 250 nm. **Inserto**, espectro de absorción de la BSA y la SNOBSA sintetizada.

Por otro lado se sometieron las muestras a un análisis por Saville, de forma tal de determinar cuánto nitrito puede ser desplazado desde la SNOBSA sin *p*CMB (control) y la SNOBSA con *p*CMB unido. Para esto, 30 μ M BSA, previamente incubada con y sin *p*CMB se mezcló con 1 mM HgCl_2 , para desplazar el nitrito de los tioles nitrosados en la muestra control, y los tioles nitrosados de la muestra con *p*CMB que no reaccionaron con el mismo. Luego de una breve incubación se cuantificó por Griess. Se determinó que el porcentaje de *p*CMB unido a la SNOBSA fue del 40 ± 17 %. Como se puede ver existe una diferencia en los resultados obtenidos por un método y otro, siendo el porcentaje de denitrosación y unión a BSA por análisis espectral, mayor al obtenido por el método de Saville. Esto puede deberse a que el *p*CMB interacciona con la proteína de manera inespecífica y no solo a través de la cisteína. De manera que este *p*CMB unido inespecíficamente también aumenta la absorbancia a 250 nm, provocando una sobreestimación de la cantidad de *p*CMB unido a la cisteína de la SNOBSA. Además, el bajo rendimiento observado puede deberse a que el tiempo de incubación con el *p*CMB y la proteína no fue suficiente y se deberían optimizar estas condiciones. De todas formas a partir del espectro y del resultado de Saville se puede concluir que el *p*CMB no solo provoca la denitrosación de la SNOBSA, sino que también es capaz de unirse a la misma con una buena eficiencia, permitiendo identificar selectivamente los tioles nitrosados en la proteína.

4.3. Denitrosación de GSNO mediada por EtHg.

Se ensayó la capacidad denitrosante del etilmercurio (EtHg, Figura 3) sobre el GSNO de forma similar a lo realizado con el *p*CMB. En este caso se intentó caracterizar la reacción en términos de estequiometría y cinética. Se incubó GSNO con concentraciones crecientes de EtHg durante tiempos variables a temperatura ambiente y oscuridad y se cuantificó la denitrosación por el método de Saville. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11, donde puede observarse que el EtHg es efectivamente un agente denitrosante y que la eficiencia de esta reacción depende del tiempo de incubación.

Para determinar la estequiometría de reacción entre el GSNO y el EtHg se mezcló GSNO con concentraciones crecientes de mercurial y se los incubó por un período de tiempo suficiente para que la reacción fuera completa. La denitrosación se cuantificó por

el método de Griess y se calculó la concentración de GSNO remanente en cada punto. En la Figura 12 se muestran los resultados de este ensayo, donde puede observarse que existe una correlación directa ($R^2 > 0.9$) entre la concentración de los reactivos, dando una estequiometría de reacción de 1:1. La denitrosación de GSNO debida al etilmercurio se evidencia también por desaparición del pico de absorbancia máxima en el UV del GSNO. La Figura 14 muestra un espectro de absorción de GSNO tratado con diferentes concentraciones de EtHg, donde puede observarse que la desaparición de GSNO es proporcional a la cantidad de mercurial utilizado.

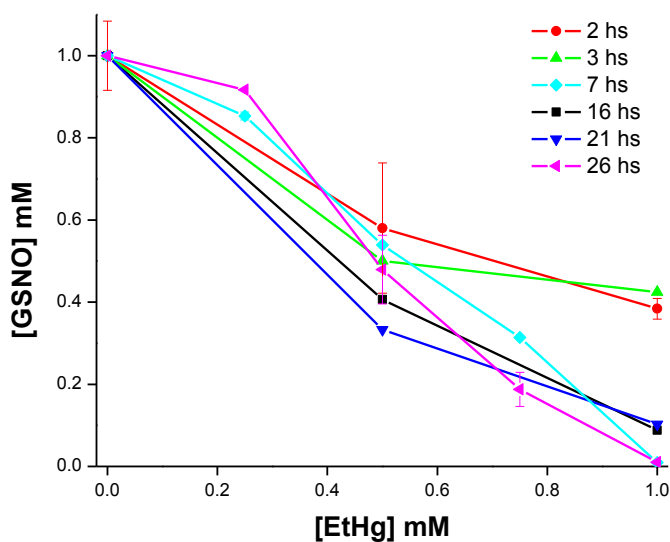


Figura 11. Denitrosación de GSNO mediada por EtHg a diferentes tiempos de incubación. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente y oscuridad.

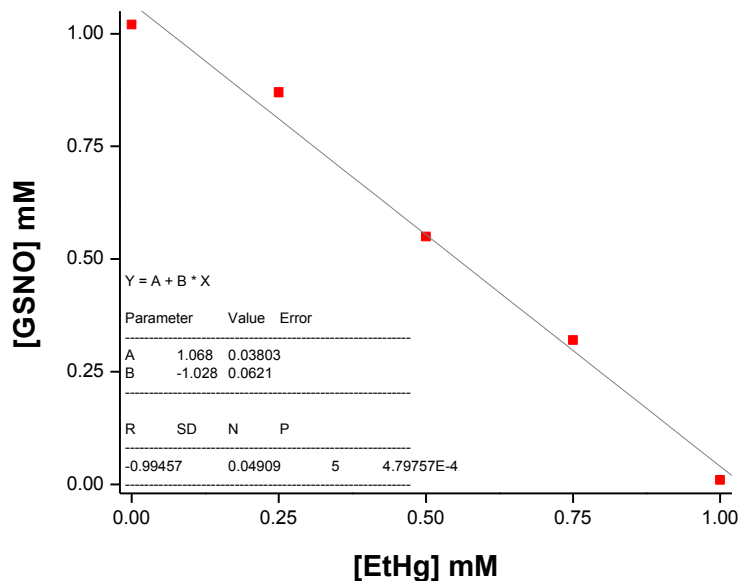


Figura 12. Denitrosación de GSNO mediada por EtHg. Las muestras se incubaron 7 hs a temperatura ambiente y oscuridad, en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4.

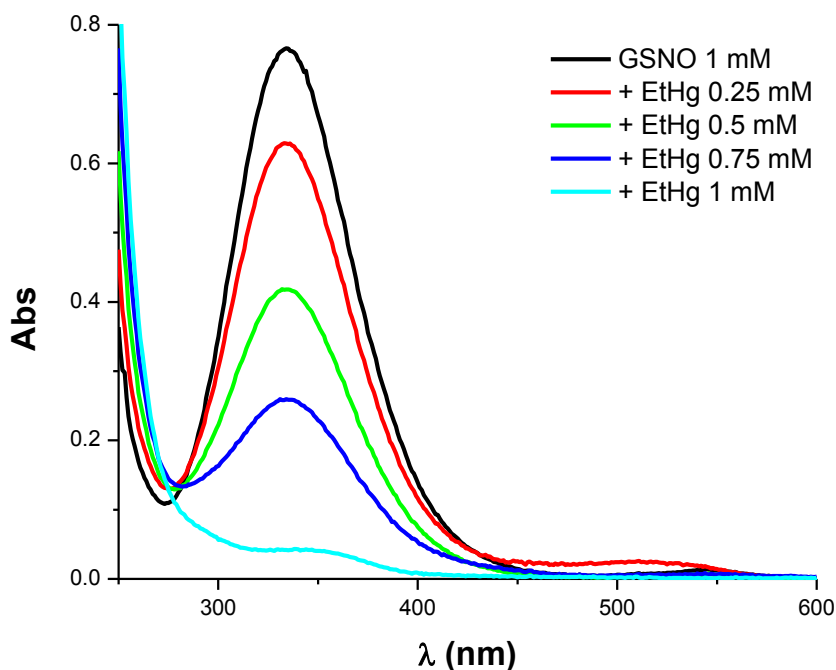


Figura 13. Espectro de absorción de GSNO en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de EtHg. Las muestras se incubaron durante 26 hs a temperatura ambiente y oscuridad.

Por otro lado se estudió la cinética de reacción entre GSNO y EtHg (Ec. 17), para lo que se utilizaron condiciones de pseudo primer orden ($[EtHg] \gg [GSNO]$). La reacción se siguió espectrofotométricamente por desaparición de GSNO a 334 nm por un período de 90 minutos a 22°C (temperatura ambiente). La Figura 14 muestra el ajuste exponencial

de la cinética de reacción a la Ec. 20, a partir de la cual se determinó la constante de pseudo primer orden, k' . Con estos datos y utilizando la Ec. 21, se determinó que la constante bimolecular de la reacción es, $0.267 \pm 0.006 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.



$$[\text{GSNO}] = [\text{GSNO}]_0 e^{-k't} \quad [\text{Ec. 20}]$$

$$k' = k [\text{EtHg}] \quad [\text{Ec. 21}]$$

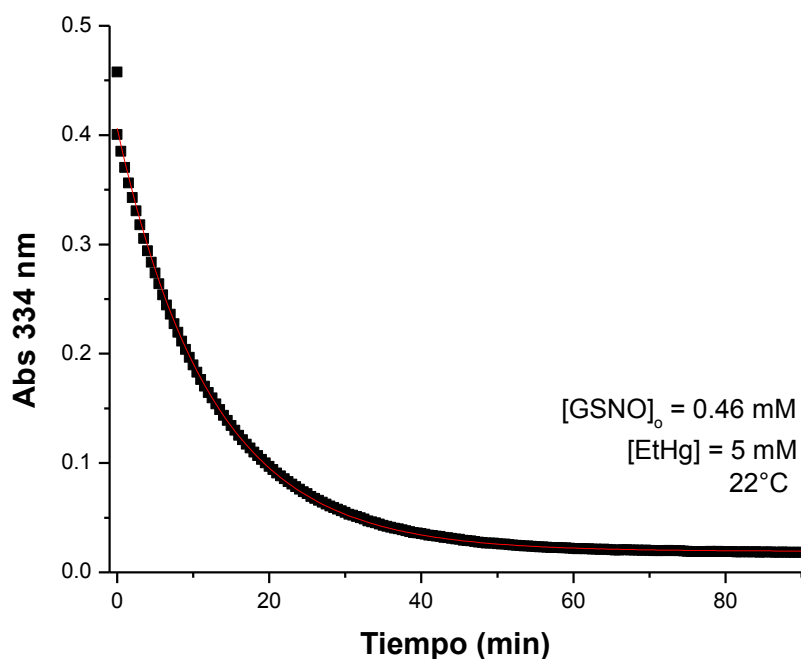


Figura 14. Cinética de la reacción entre GSNO y EtHg a 22°C . Se registró la desaparición de GSNO a 334 nm en condiciones de pseudo primer orden y la curva se ajustó a la exponencial correspondiente.

La conclusión que se desprende de estos resultados es similar a la obtenida para el pCMB, ya que si bien la reacción es lenta comparada con la del Hg^{2+} , la misma ocurre en un tiempo razonable.

4.4. Denitrosación de RSNO por mercuriales cromóforos

4.4.1. Denitrosación de GSNO por Merc

Los mercuriales con propiedades colorimétricas y/o fluorimétricas podrían ser utilizados como herramientas denitrosantes y además como etiqueta específica de tioles nitrosados, lo que sería ventajoso sobre otros mercuriales, como el pCMB o el EtHg. En

este sentido se decidió ensayar la eficiencia denitrosante del mercuriocromo (Merc, Figura 3), el cual además de ser coloreado, es fluorescente. El mercuriocromo presenta un pico de absorción máxima a 506 nm (Figura 15), y un pico de emisión de fluorescencia a 535 nm ($\lambda_{exc}=480nm$), a pH 7.

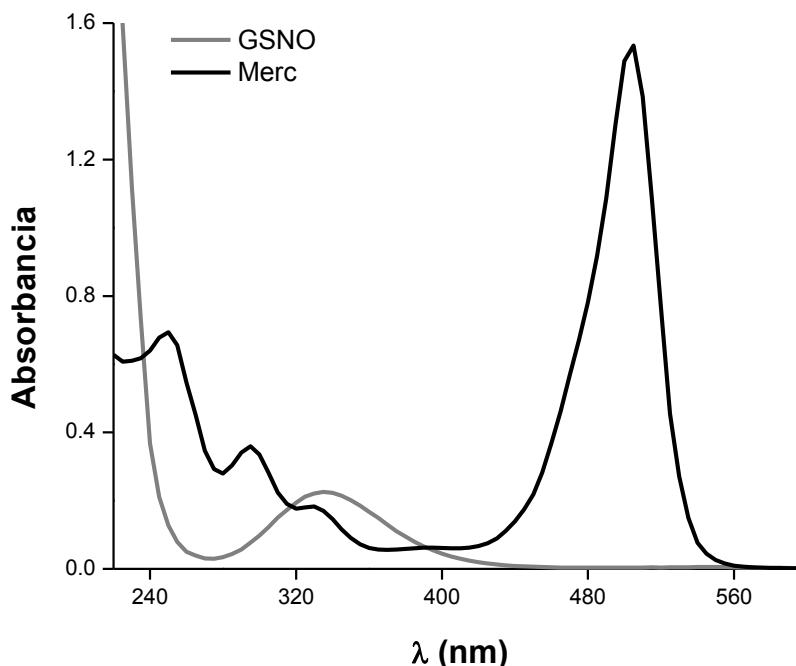


Figura 15. Espectro de absorción del mercuriocromo (Merc) y del GSNO en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4.

Para evaluar la capacidad denitrosante del Merc sobre el GSNO, se incubó al nitrosotiol con concentraciones crecientes de mercurial a temperatura ambiente y oscuridad. La denitrosación se cuantificó por reacción con los reactivos de Griess, y en función de esto se calculó la concentración de GSNO remanente. En la Figura 16 puede observarse que la denitrosación del GSNO debida al Merc a temperatura ambiente es significativamente lenta, ya que tiempos prolongados de incubación (18 h) no son suficientes para ver una denitrosación aparente. A tiempos de incubación menores no se había obtenido suficiente producto para cuantificar la denitrosación (datos no mostrados). Para evaluar si un aumento en la temperatura de reacción mejora el rendimiento de la reacción, se realizaron ensayos similares a 37°C. Si bien, el aumento de temperatura mejoró el rendimiento de denitrosación (Tabla 3), la reacción sigue siendo notablemente lenta, incluso en condiciones donde el mercurial se encuentra en exceso.

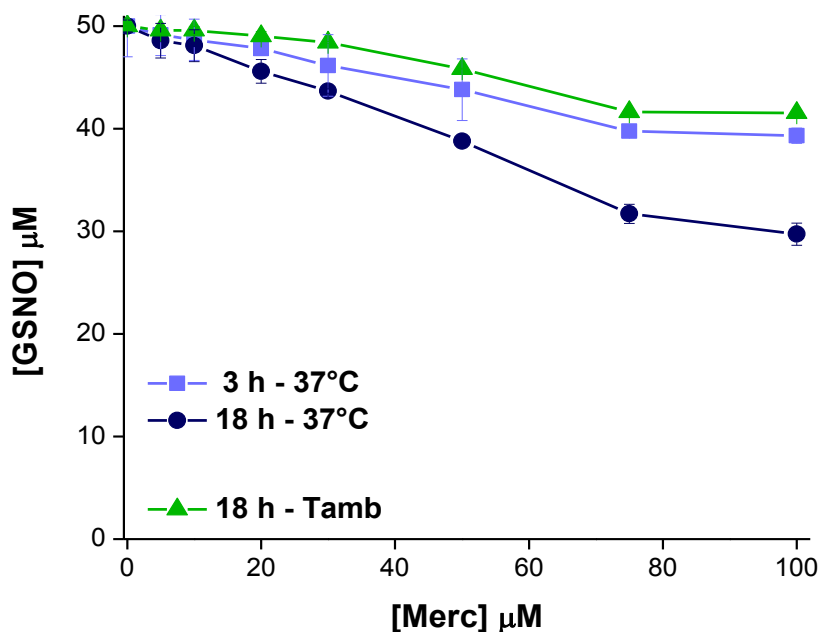


Figura 16. Denitrosación de GSNO mediada por Merc, efecto de la concentración y temperatura. GSNO 50 μM en ausencia y presencia de Merc se incubó durante 18 h a temperatura ambiente (verde) o 3 y 18 h a 37°C (azul).

Tabla 3. Rendimiento de denitrosación de GSNO a diferentes condiciones de tiempo y temperatura determinados a $[GSNO]/[Merc] = 1$

Condición de incubación		Rendimiento de denitrosación
Tiempo (h)	Temperatura	
18	Ambiente	8.4 %
3	37°C	13%
18	37°C	22%

A pesar de haber observado que la reacción entre el GSNO y el Merc es sorprendentemente lenta, decidimos evaluar la capacidad de este mercurial de interaccionar con el tiol de la BSA, para investigar la potencialidad de este reactivo como etiqueta específica de tioles y eventualmente de nitrosotioles. Para ello se trató BSA con

su Cys 34 previamente reducida (BSA-SH), en una relación 1:1 de concentración de tioles libres y Merc. Al mismo tiempo se realizó otro ensayo pero utilizando BSA con su tiol bloqueado con NEM (BSA-NEM), en la misma relación de concentración de proteína: mercurial utilizado en el experimento anterior. La muestra con BSA-SH se incubó a 37°C y se registraron espectros cada 10 minutos durante 1 hora, notándose la formación del aducto inmediatamente y sin cambios significativos en el perfil espectral durante toda la incubación, lo que se diferencia de lo observado para el GSNO. La mezcla con BSA-NEM se incubó 30 minutos a 37°C, y luego se filtró en una PD-10 y se registró el espectro de la fracción colectada. La interacción entre el tiol de la proteína y el mercuriocromo se observa por la aparición de un pico entre 515-520 nm (Figura 17). Era de esperar que la interacción entre la BSA y el Merc fuese a través del tiol de la proteína, sin embargo se observa que el mercurial se une también a la proteína bloqueada (Figura 18). Estos resultados indican que el Merc interacciona inespecíficamente con la BSA, y no solamente a través del tiol de la cisteína. Esta interacción inespecífica mostró ser resistente a diferentes métodos de separación como ser gel filtración en columnas PD-10 o biospin, filtración en centricon y a la precipitación de proteína con acetona.

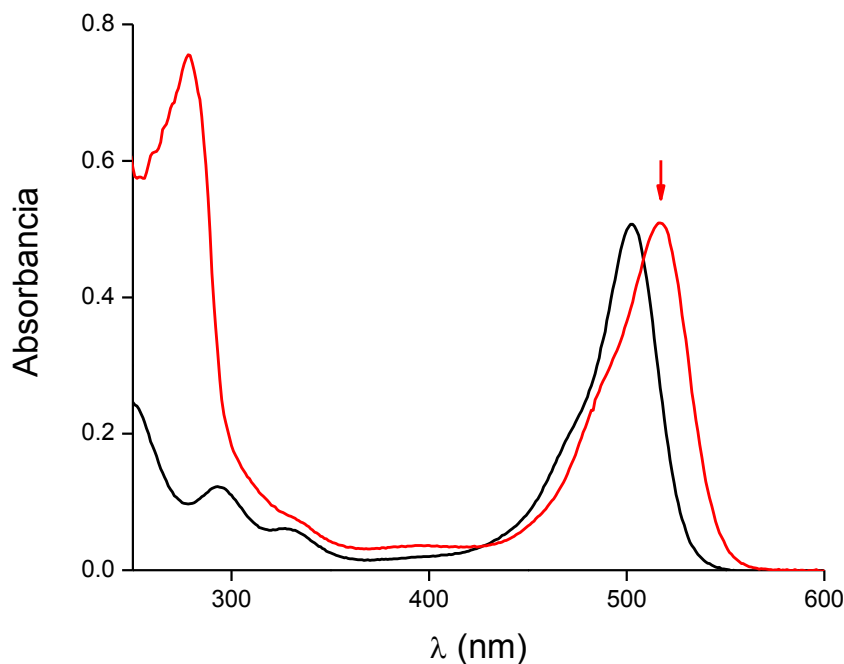


Figura 17. Espectro de absorción del mercuriocromo en ausencia (negro) y presencia de BSA-SH (rojo) en buffer PPI pH 9. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. La flecha indica el pico característico del aducto proteína-mercurial.

Dado que la BSA es una proteína con tendencia a unir ciertos ligandos inespecíficamente, se intentó evitar estas interacciones inespecíficas suplementando el buffer de trabajo (Pirofosfato 0.1 M, pH 9) con SDS. Este tratamiento sobre el sistema BSA-NEM – Merc no evitó la aparición del pico a 517 nm (Figura 19). Por lo tanto el mercuriocromo sigue uniéndose inespecíficamente a la proteína, aún en presencia de SDS. De todos modos la proporción de unión resultó ser menor que en ausencia de SDS.

Mediante un análisis de la absorbancia de los picos correspondientes al sistema proteína-Merc se cuantificó la proporción del mercurial unido a la BSA-SH y a la BSA-NEM. Para esta cuantificación se consideró un $\epsilon_{520} = 33500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, reportada para un aducto proteína-mercuriocromo [74]. De la comparación entre proporción unida inespecíficamente a la BSA-NEM y la unida a la BSA-SH se determinó que el rendimiento de unión específica del mercuriocromo a la BSA fue de aproximadamente un 13%. La proporción de unión se calculó en función de la concentración de proteína determinada por absorbancia a 280 nm, en las fracciones filtradas o resuspendidas luego de la precipitación.

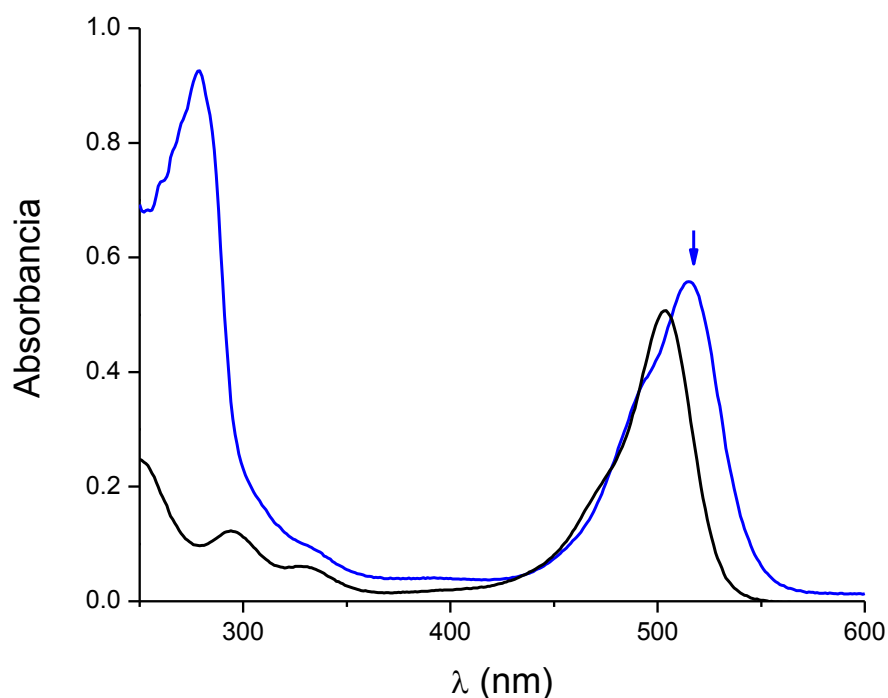


Figura 18. Espectro de absorción del mercuriocromo en ausencia (negro) y presencia de BSA-NEM (azul) en buffer pirofosfato pH 9. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. La flecha indica el pico característico del aducto proteína-mercurial.

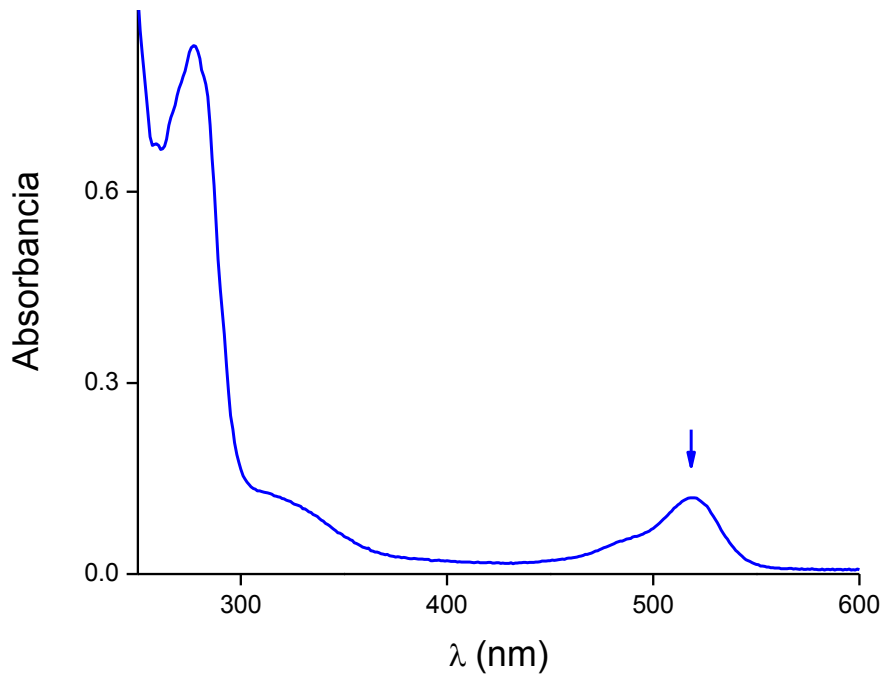


Figura 19. Espectro de absorción de la BSA-NEM incubada con mercuriocromo en buffer pirofosfato pH 9, suplementado con SDS 0.1%.

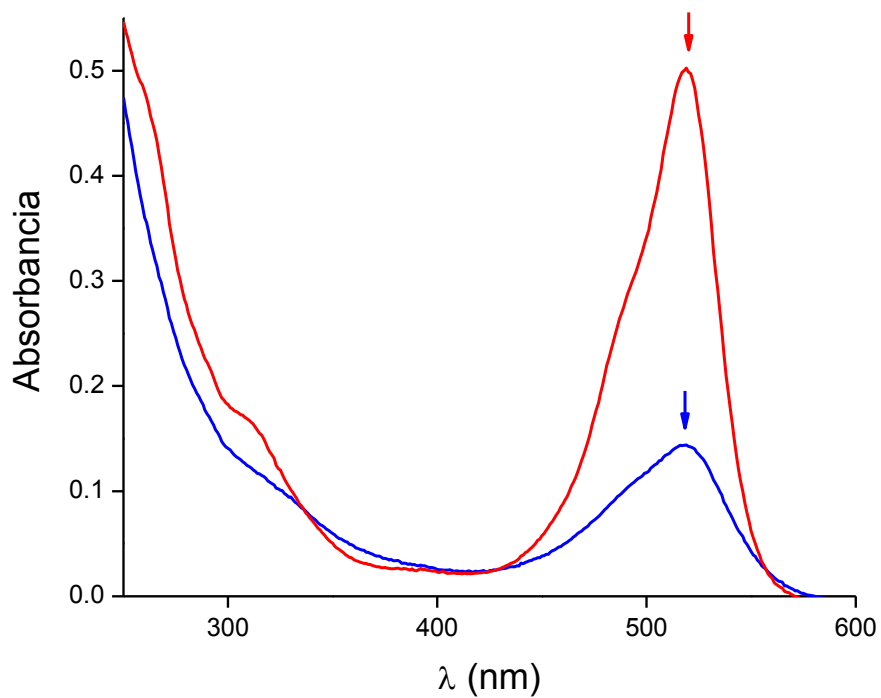


Figura 20. Espectro de absorción de la Trx-SH y Trx-NEM tratadas con mercuriocromo en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4. Las mezclas se incubaron ON, a 4°C.

Para determinar si la unión inespecífica del mercuriocromo era consecuencia del mercurial mismo o un efecto de la BSA, se estudio la interacción de este con otras proteínas con superficie menos hidrofóbica, como ser la tiorredoxina humana (Trx) y la alquil hydroperóxido reductasa E de *Mycobacterium tuberculosis* (AhpE). Estas proteínas poseen 5 y 1 cisteína libre respectivamente. Para los ensayos con Trx, se utilizó Trx previamente reducida (Trx-SH) y por otro lado bloqueada con NEM (Trx-NEM). En la Figura 20 se muestran los espectros de absorción de la Trx-SH y la Trx-NEM incubadas con un exceso de mercuriocromo, durante toda la noche a 4°C. Se observa la aparición del pico característico a aproximadamente 519 nm, debido a la unión del Merc a la proteína. Esto indica que el Merc se une tanto a la Trx reducida como bloqueada, indicando nuevamente la existencia de una interacción inespecífica entre el Merc y la proteína. Utilizando la absorptividad molar a 520 nm reportada para el sistema Merc-proteína se cuantificó la proporción de Merc unido a la hTrx-SH y hTrx-NEM. De la comparación entre ambos se determinó que el rendimiento de unión específica del Merc a la hTrx fue de un 46%. Este rendimiento de unión se determino en relación a la concentración de Trx determinada por el método de ácido bicinconínico en ambos casos. Resultados similares se obtuvieron para la enzima AhpE en su forma reducida y bloqueada (datos no mostrados), con lo que se concluye que el Merc se une a otros residuos aminoacídicos diferentes a cisteína, aunque en menor proporción. Estos inconvenientes hacen inapropiada la utilización de este mercurial como agente denitrosante y etiqueta específica de tioles modificados.

4.4.2. Denitrosación de GSNO y SNOTrx por FMA

Otra molécula con propiedades colorimétricas y fluorimétricas es la mercurifluoresceína (FMA, Figura 3), este mercurial presenta un máximo de absorbancia a 499 nm (Figura 21) y un máximo de emisión de fluorescencia a 530 nm cuando se lo excita a 490 nm. Para estudiar la capacidad denitrosante del FMA, se trató GSNO con una cantidad equimolar de mercurial en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Luego se realizó un espectro de absorción de la mezcla y se la comparó con el espectro del FMA (Figura 22). El cambio en el perfil del espectro es significativo, observándose una disminución de la absorbancia a 499 nm por efecto del GSNO.

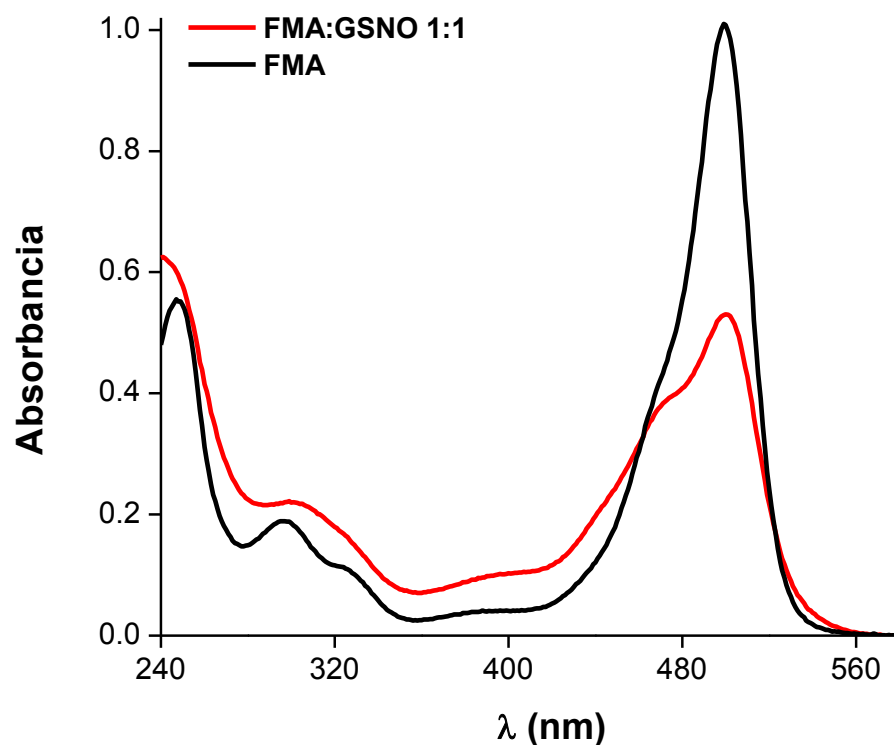


Figura 21. Espectro de absorción de FMA en ausencia y presencia de la misma concentración de GSNO. La mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Por otro lado se evaluó la denitrosación de GSNO debido a concentraciones crecientes de FMA y el efecto del tiempo de incubación. La denitrosación se cuantificó por el método de Griess, determinando el nitrito liberado por acción del FMA y calculando a partir de esto la concentración de GSNO remanente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, donde puede verse que la denitrosación aumenta con la concentración de FMA, y la misma parece ocurrir a una velocidad mayor que para el Merc. El FMA fue capaz de denitrosar casi por completo al GSNO en condiciones equimolares, lo que indicaría que la estequiometría de esta reacción es de 1:1.

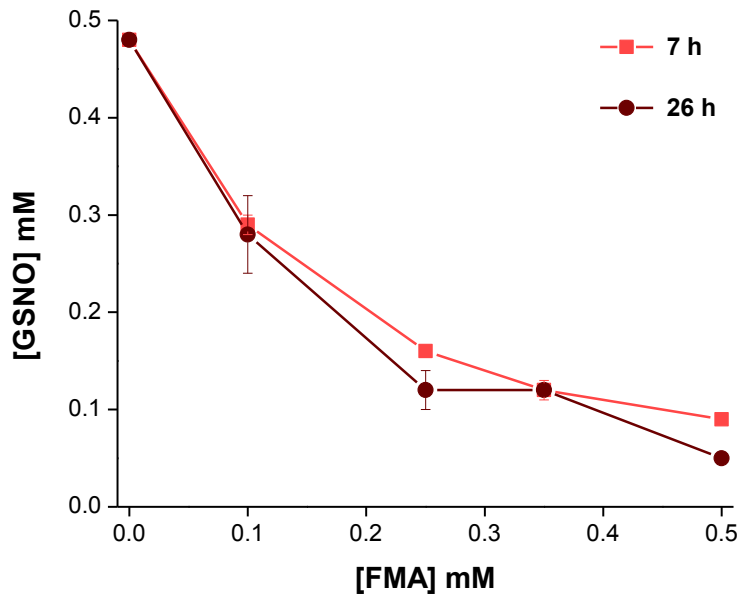


Figura 22. Denitrosación de GSNO a diferentes concentraciones de FMA. Las mezclas se incubaron durante 7 y 26 h, a temperatura ambiente y oscuridad.

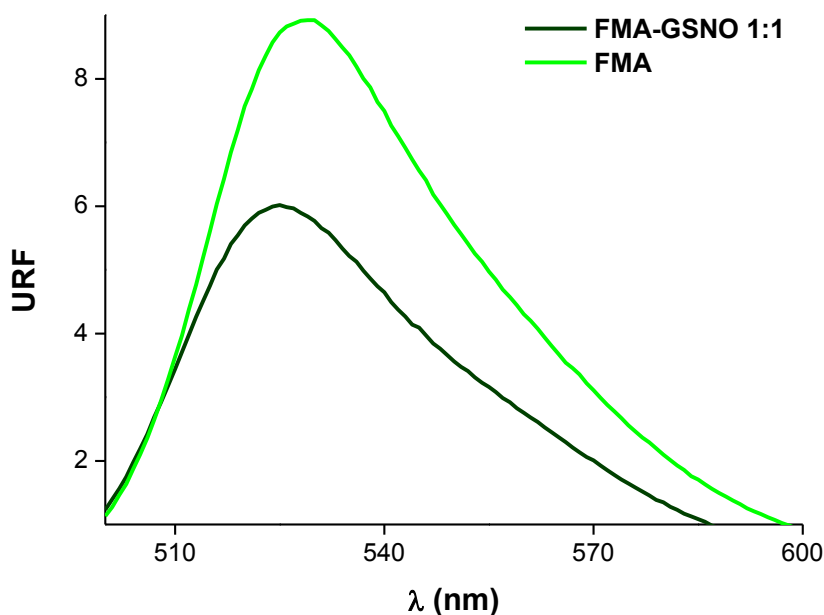


Figura 23. Espectro de emisión de fluorescencia del FMA en ausencia y presencia de la misma concentración de GSNO. La mezcla fue incubada por 6 h a temperatura ambiente y oscuridad.

La idea de denitrosar el S-nitrosotiol con un mercurial fluorescente, planteaba la ventaja de dejar etiquetada la biomolécula (anteriormente nitrosada) con la sonda fluorescente, lo cual le confiere ciertas ventajas, entre ellas la sensibilidad de detección. En este sentido se decidió evaluar el efecto del GSNO en la emisión de fluorescencia del FMA. Para ello se incubó la misma concentración de FMA y GSNO en buffer fosfato 100

mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, durante 6 horas a temperatura ambiente y oscuridad y se procedió a realizar un espectro de emisión de fluorescencia entre 500-600 nm. En la Figura 23 se muestran los espectros obtenidos para la mezcla GSNO-FMA y se la compara con un espectro de FMA solo. Se observa que la intensidad de fluorescencia decrece significativamente cuando el GSNO se encuentra presente. Este efecto de apagamiento de la fluorescencia se describió anteriormente en varios trabajos, y se utilizó como herramienta para el estudio de tioles proteicos y de bajo peso molecular [71, 75].

Dado que los resultados obtenidos para el GSNO fueron prometedores, se decidió ensayar la capacidad del FMA de denitrosar tioles proteicos. Como nitrosotiol proteico se utilizó *S*-nitrosotiorredoxina y como control se utilizó tiorredoxina con sus tioles alquilados con NEM. La SNOTrx se incubó con un exceso de FMA durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad, luego la mitad de la mezcla se pasó por un biospin y se recuperó la fracción de alto peso molecular, mientras que la otra mitad se pasó por un filtro amicon a partir del cual se recuperó la fracción de bajo peso molecular. En la fracción de alto peso molecular se espera recuperar a la proteína unida al FMA (Trx-FMA) y en la de bajo peso molecular el exceso de mercurial y el nitrito liberado en la denitrosación. Se cuantificó la concentración de proteína en la fracción de alto peso molecular y se realizaron espectros de absorción y emisión de fluorescencia de la misma (Figuras 24 y 25). Se cuantificó la concentración de nitrito en la fracción de bajo peso molecular por el método de Griess, siendo el resultado obtenido equivalente a 178 μM . Si consideramos que este nitrito deriva de la denitrosación de la SNOTrx debida al FMA, y sabiendo que en la mezcla inicial había una concentración de proteína igual a 69 μM , se puede decir que la relación de NO_2^- liberado por mol de Trx es igual a 2.6, además si consideramos que la nitrosación dió un rendimiento de 4 grupos S-NO por mol de Trx se concluye que el FMA causó la denitrosación del 65% de los tioles modificados.

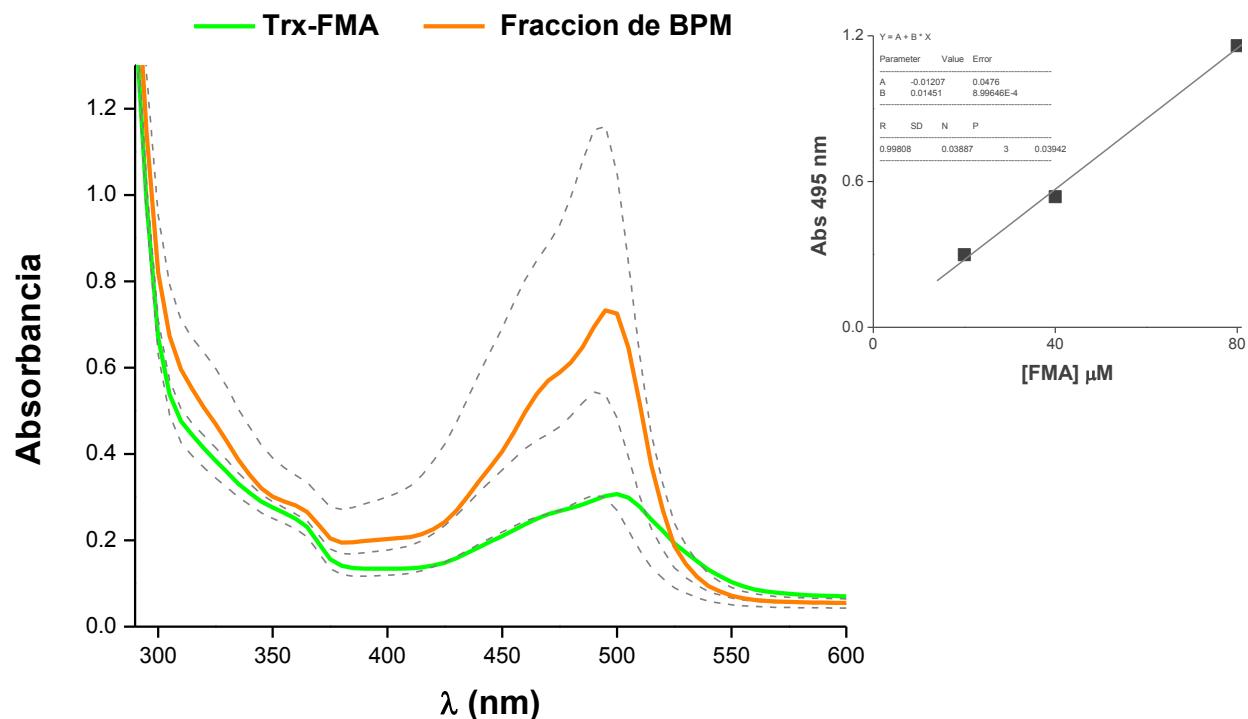


Figura 24. Espectro de absorción de la fracción de alto peso molecular (Trx-FMA) y bajo peso molecular (BPM). Ambas muestras se diluyeron en buffer, siendo los factores de dilución: 10 (Trx-NEM) y 6 (BPM), respectivamente. Las líneas punteadas corresponden a concentraciones crecientes de FMA (20, 40 y 80 μM). **Inserto.** Correlación entre el máximo de absorbancia del FMA y la concentración micromolar del mismo.

En la Figura 24 puede verse que la absorbancia del aducto Trx-FMA es comparable a la del FMA 20 μM , lo que podría utilizarse para calcular la concentración relativa de FMA unido a la proteína. Si se considera la absorbancia a 495 nm para determinar la fracción Trx-FMA y utilizando la ecuación de la recta obtenida para la correlación entre la Abs 495 nm y la concentración de FMA, obtenemos que la concentración de FMA unido a la proteína equivale a 217 μM . Este valor es comparable con la cantidad de nitrito medido (178 μM), sin embargo, la diferencia existente puede deberse a que no todo el FMA está unido específicamente a los tioles, sino que puede estar interactuando en otros sitios de la proteína como se vio para el Merc. De todos modos asumir que la absorbancia del aducto es directamente proporcional a la cantidad de FMA no es del todo acertada, ya que si se toma en cuenta lo observado para el GSNO, la absorción del FMA se ve significativamente disminuida en presencia del nitrosotiol.

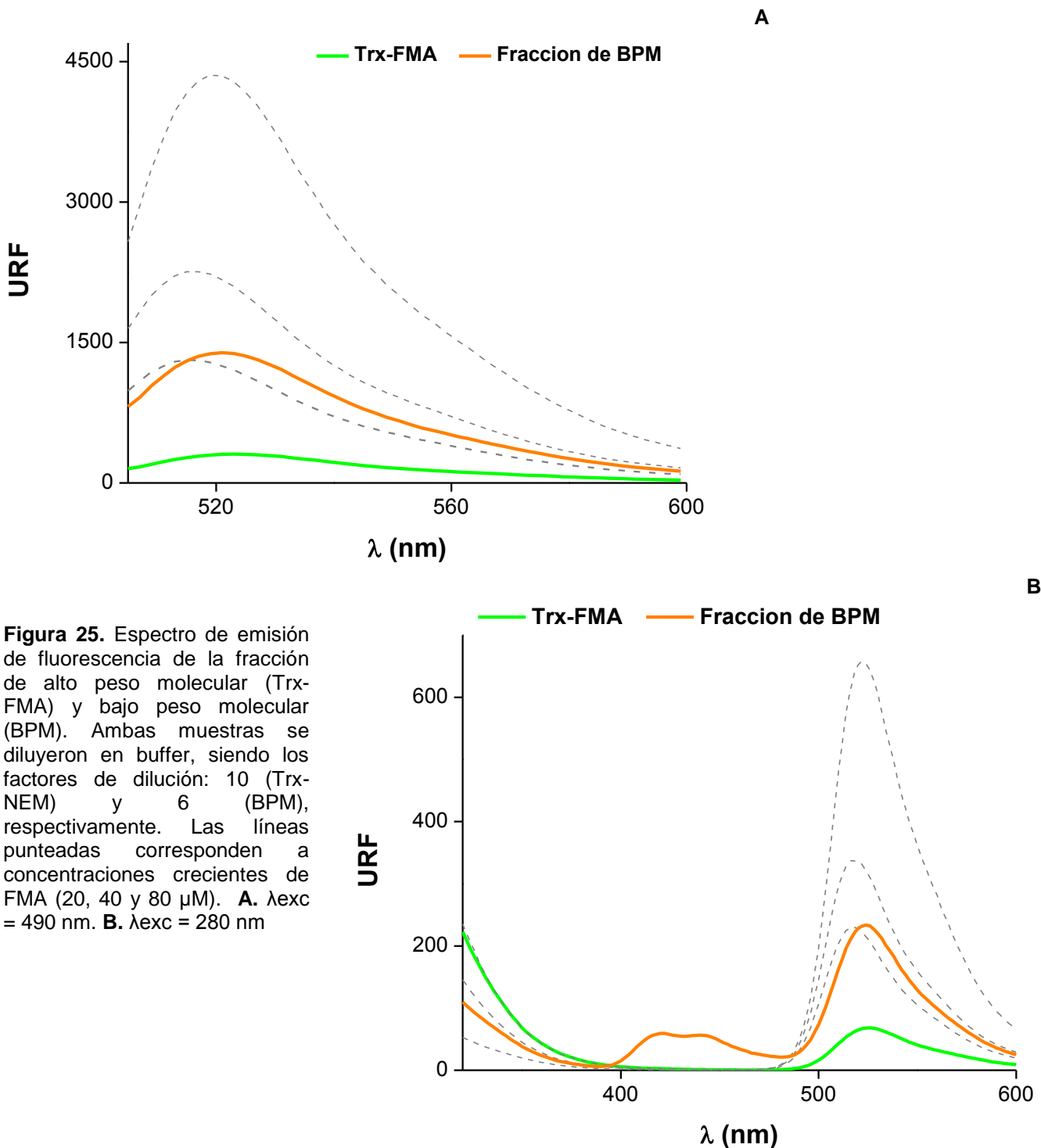


Figura 25. Espectro de emisión de fluorescencia de la fracción de alto peso molecular (Trx-FMA) y bajo peso molecular (BPM). Ambas muestras se diluyeron en buffer, siendo los factores de dilución: 10 (Trx-NEM) y 6 (BPM), respectivamente. Las líneas punteadas corresponden a concentraciones crecientes de FMA (20, 40 y 80 μ M). **A.** λ_{exc} = 490 nm. **B.** λ_{exc} = 280 nm

En los espectros de fluorescencia también se observa una correlación entre la intensidad y la concentración de FMA, de todos modos esto no es suficiente para estimar la cantidad de FMA unido a la proteína. Para poder realizar estos cálculos sería necesario corroborar que exista una relación entre la disminución de fluorescencia con respecto al control y la concentración de alguno de los reactivos. En la Figura 25B se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de las fracciones cuando se las excita a 280 nm. Estos espectros se realizaron para visualizar el efecto de transferencia de energía que pueda existir entre triptofanos de la proteína y el FMA. La Trx presenta un único triptofano localizado muy cerca de las cisteínas involucradas en la actividad catalítica de la enzima. Si bien en condiciones normales estas cisteínas no son blanco de nitrosación, en nuestro caso se consiguió nitrosar 4 de las 5 cisteínas, dentro de las cuales puede encontrarse alguna o ambas cisteínas del sitio activo. De todos modos, estos resultados no son concluyentes ya que el FMA absorbe a 280 nm, y como se observa en la Figura 25B, también emite fluorescencia cuando lo excitamos en el UV.

Por último, para corroborar que la interacción entre el FMA y la Trx fuese únicamente a través de los tioles de la proteína se realizaron los mismos experimentos utilizando una Trx bloqueada con NEM. El tratamiento de las muestras, en cuanto a concentración y condiciones de incubación fue igual que el realizado para la SNOTrx. La presencia de FMA en la fracción de alto peso molecular (Trx-NEM) se evidenció fácilmente por el color de la solución y además por el perfil espectral de la muestra (Figura 26). Esto indica que el FMA se unió de forma inespecífica a la proteína bloqueada, tal como había sucedido con el Merc. La forma del espectro de la Trx-NEM es diferente al observado para el FMA solo y para la Trx-FMA, ya que la absorbancia máxima no parece corresponder a un máximo sino que el pico es bastante ancho y no definido. Si consideramos que la absorbancia y la fluorescencia del FMA disminuyen por efecto del RSNO, al comparar la muestra reducida con la bloqueada, vemos que ese efecto es menor en la segunda (figuras 26 y 27). Esto podría sugerir que si bien el FMA interacciona de alguna manera con la proteína bloqueada, lo hace en menor proporción que cuando los tioles se encuentran nitrosados y disponibles.

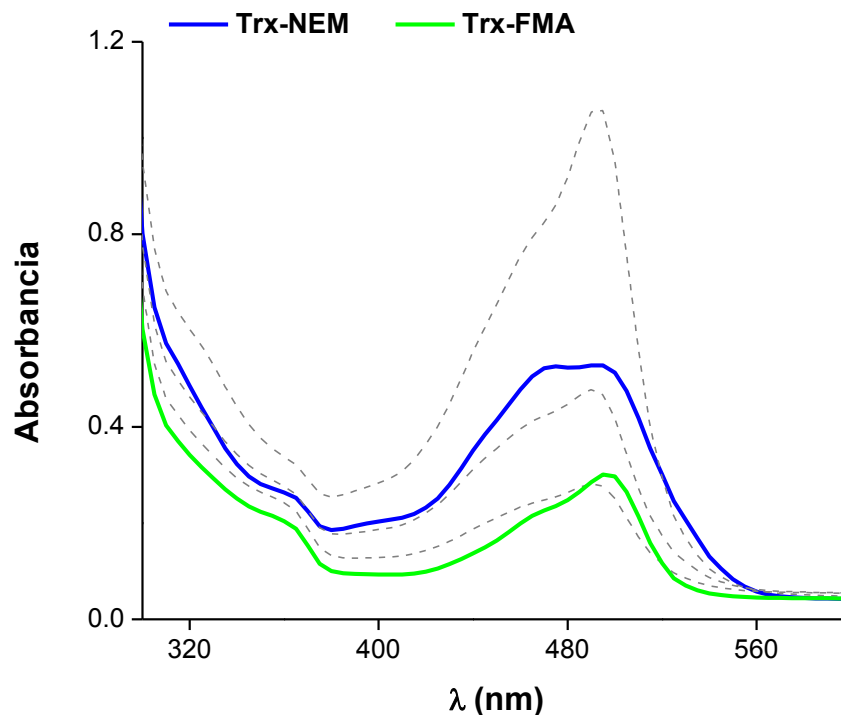


Figura 26. Espectro de absorción de la fracción de alto peso molecular (Trx-NEM) y Trx-FMA. Ambas muestras se diluyeron 10 veces en buffer. Las líneas punteadas corresponden a concentraciones crecientes de FMA (20, 40 y 80 μM).

Finalmente, se debe mencionar que se llevaron a cabo experimentos de denitrosación de GSNO con otro mercurial coloreado, el nitrofenilmercurio (NitroHg). Se preparó una solución stock de este mercurial en NaOH 0.1 M y se la conservó a 4°C durante el período que se realizaron los experimentos. Con el tiempo esta solución comenzó a formar un precipitado oscuro y el perfil espectral de la misma cambió, indicando posiblemente la descomposición del mismo. Si bien el NitroHg parecía ser uno de los compuestos con mayores posibilidades, debido a su estructura relativamente pequeña (tamaño similar al del pCMB) y propiedades colorimétricas, no resultó ser útil. Al mezclar este mercurial con GSNO se formó un precipitado de color amarillo, que le aportó una turbidez importante a la mezcla, haciendo dificultosa la realización de espectros. Se comprobó que la formación de este precipitado no se relacionaba con la disminución del pH al agregar el GSNO, ya que el GSNO previamente neutralizado con NaOH produjo el mismo efecto. Por estas razones, se decidió que este compuesto no es adecuado para cumplir los objetivos que busca este trabajo.

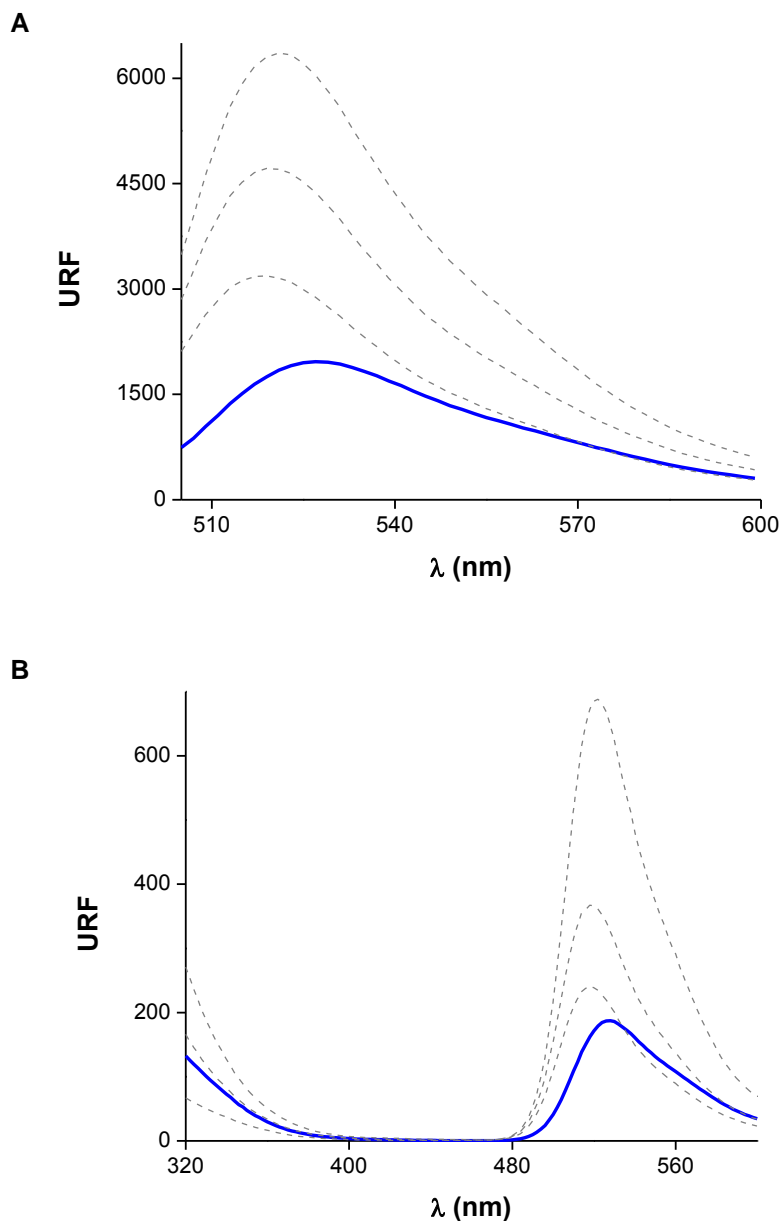


Figura 27. Espectro de emisión de fluorescencia de la fracción de alto peso molecular (Trx-NEM) diluida 10 veces en buffer. Las líneas punteadas representan concentraciones crecientes de FMA (20, 40 y 80 μ M). **A.** $\lambda_{exc} = 490$ nm. **B.** $\lambda_{exc} = 280$ nm

Como conclusión general puede decirse que los mercuriales orgánicos representan una herramienta con gran potencialidad para la denitrosación y etiquetado de tioles. Sin embargo la reactividad de los mercuriales con diferentes RSNO depende directamente de su estructura química. Aquellos mercuriales con mejores características, por ser coloreados o fluorescentes, reaccionan muy lentamente con los nitrosotioles, poniendo en duda la utilidad de estos reactivos a la hora de evaluar nitrosotioles proteicos, que son incluso más sensibles a factores ambientales que el GSNO ensayado.

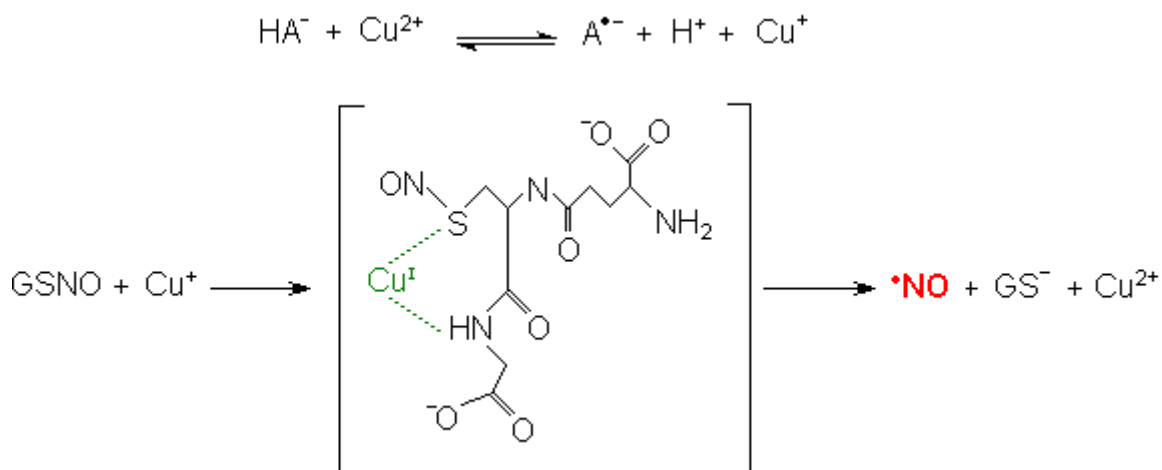
5. DISCUSIÓN

La nitrosación de tioles proteicos es una modificación dependiente de $\bullet\text{NO}$ que ha tomado un gran protagonismo últimamente, ya que estaría implicada en mecanismos de señalización celular. A pesar de haberse encontrado más de 100 proteínas con cisteínas modificadas por S-nitrosación, aún es necesario establecer cuáles son los mecanismos por los que se forman y descomponen estos compuestos *in vivo*. El GSNO es uno de los S-nitrosotioles endógenos más abundantes y posee actividad biológica similar a la del $\bullet\text{NO}$. La vida media tan prolongada de este RSNO sugiere que el mismo estaría implicado en el almacenamiento y/o el transporte de $\bullet\text{NO}$ *in vivo*. Los oxidantes derivados de la autoxidación del $\bullet\text{NO}$ reaccionan rápidamente con el GSH, haciéndolo un scavenger efectivo de especies reactivas derivadas del óxido nítrico (RNS), previniendo la toxicidad causada por el $\bullet\text{NO}$ en condiciones aeróbicas [17]. Los mecanismos de formación biológica de GSNO así como nitroso proteínas, están siendo investigados con interés y ayudarían a comprender la participación de estas especies en vías de transducción de señales redox.

Las técnicas utilizadas para identificar proteínas nitrosadas se describieron anteriormente e incluyen métodos de identificación muy variados, aunque la mayoría de ellos requieren de un paso previo de descomposición. Tal es el caso del método del biotin switch, entre otros [39]. Este método utiliza ascorbato para reducir los tioles S-nitrosados, dejándolos libres para unirse a la biotina, que luego puede ser identificada con un anticuerpo específico (Figura 1). Este método depende de la habilidad del ascorbato para reducir los RSNO, por lo tanto, será la eficiencia de la reducción con ascorbato la que determinará la sensibilidad total y real del ensayo. A pesar de ser un método muy poderoso, la eficiencia y reproducibilidad del biotin-switch ha sido muy cuestionada, y se ha identificado esta etapa de reducción de RSNO proteicos como la sujeta a mayor variabilidad. Es por ello que nos propusimos estudiar agentes denitrosantes alternativos al ascorbato, que puedan ser utilizados de forma genérica y ser capaces de descomponer y marcar específicamente estos tioles nitrosados en un único paso.

Se ha reportado que la reacción del ascorbato con GSNO es lenta, siendo las constantes de velocidad determinadas, $0.05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C [29] o $0.014 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C [40],

según dos estudios diferentes. Por lo tanto el bajo rendimiento en el biotin switch depende directamente del tiempo de incubación del reductor con los tioles nitrosados, por ejemplo, el tiempo de vida media del GSNO expuesto a 2 mM ascorbato, utilizando la constante de velocidad mayor, sería 115 min ($t_{1/2} = \ln 2/k[\text{Asc}]$). Por otro lado existe también la evidencia de que la estabilidad del GSNO en presencia de ascorbato es dependiente del pH del medio, siendo el límite inferior a pH 5.5. A pHs entre 6-8 la liberación de $\cdot\text{NO}$ mediada por ascorbato aumenta rápidamente, por lo que esperaríamos que en estos ensayos la denitrosación del GSNO fuera óptima. Sin embargo en las condiciones utilizadas la mayoría del ascorbato se encuentra en su forma desprotonada HA^- (99%, pK_1 4.25, pK_2 11.8), la cual reacciona lentamente con el GSNO [40], según la Ec. 22.



Esquema 1. Mecanismo de denitrosación de GSNO mediado por ascorbato y cobre [40]

Por otro lado, se ha comprobado que los RSNO con mayor estabilidad en solución acuosa se descomponen y liberan $\cdot\text{NO}$ en presencia de metales traza. Se ha visto que el ión cuproso (Cu^+) [40] y el ión cúprico (Cu^{2+}) provocan la descomposición de GSNO y del dador sintético de $\cdot\text{NO}$ S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) y que el efecto de este ión se ve potenciado por la presencia de reductores como el ascorbato, GSH y cisteína [17].

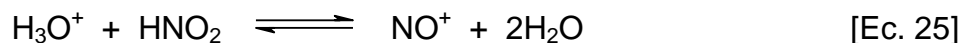
Smith y *col.* determinaron que la constante de velocidad de la reacción entre GSNO y Cu^{2+} es $14.8 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [40], lo que es bastante rápida en comparación con la constante de velocidad de reacción con ascorbato. En el mismo trabajo se propone un mecanismo para la denitrosación de GSNO mediada por ascorbato y cobre (Esquema 1). En éste se establece que es el Cu^+ , y no el Cu^{2+} , la especie responsable de la descomposición del GSNO, ya que el Cu^{2+} es capaz de coordinarse con átomos de N y O, y no con átomos de S. El ascorbato sería responsable de la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ , el cual puede coordinarse con los átomos de S, N u O del GSNO que luego daría lugar a los productos de descomposición. En este sentido Wang y *col.* [61], han rediseñado el método original del biotin switch, incluyendo el agregado de cobre al paso de reducción, lo que mejoró dramáticamente la sensibilidad de la técnica, sin perder especificidad.

La primera alternativa explorada en este trabajo, fueron los halogenuros y pseudohalogenuros. Estos compuestos pueden reaccionar con el ácido nitroso (HNO_2) para formar nitrosil-halogenuros y nitrosil-seudohalogenuros (XNO) (Ec. 23).



$$K_{\text{XNO}} = \frac{[\text{XNO}]}{[\text{HNO}_2][\text{H}^+][\text{X}^-]} \quad [\text{Ec. 24}]$$

Las constantes de equilibrio determinadas a 25°C para el nitrosil-cloruro (ClNO), nitrosil-bromuro (BrNO) y nitrosil-tiocianato (NOSCN) son 1.1×10^{-3} , 5.1×10^{-2} y 30 M^{-2} respectivamente. El valor relativamente alto de la constante de equilibrio del SCN^- sugiere que se comportaría como un catalizador más efectivo que los halogenuros en medio ácido, a pesar de su menor nucleofilicidad. Por lo tanto la secuencia de efectividad esperada de los diferentes agentes denitrosantes sería tiocianato > bromuro > cloruro. Sin embargo, esta reactividad teórica no se vio reflejada en nuestros resultados.





Dadas las condiciones de acidez tan altas utilizadas en estos experimentos, se propone un mecanismo de nitrosación diferente al indicado en las Ec. 2 y 4 (que es vía N_2O_3). A pH más ácidos, el mecanismo principal que operaría en la nitrosación es a través de la Ec. 26, donde la especie nitrosante sería el catión nitrosonio (NO^+), y no el N_2O_3 . El NO^+ reacciona luego con el sustrato S para dar el producto de nitrosación (Ec. 26). Este mecanismo de nitrosación sigue la ley de velocidad de la Ec. 27, a partir de la cual se determinaron las constantes de velocidad (k) para cada uno de los sustratos [41] (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de la constante de velocidad del mecanismo de nitrosación descrito en las ecuaciones 22 y 23.

S	k ($\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Cl^-	975 #
Br^-	1170 #
I^-	1370 #
SCN^-	1460 #
	11700 *
N_3^-	1340 #

* Determinada a 25 °C, # Determinada a 0°C.

Sin embargo, estas constantes corresponden a mecanismo de formación de XNO a partir de HNO_2 y no de un RSNO, como es nuestro caso (Ec. 14). La reacción entre halogenuros y nitrosotioles es aparentemente más lenta que con HNO_2 , lo que explicaría los bajos rendimientos observados para los ensayos de denitrosación del GSNO. El yoduro (I^-), sin embargo, mostró un comportamiento diferente, por lo que en la búsqueda de agentes denitrosantes alternativos, se propone al mismo como el más eficiente dentro de los halogenuros y pseudohalogenuros estudiados (con un 78 % de rendimiento de denitrosación). Nuestros resultados muestran que el cloruro (Cl^-) por sí mismo no es un buen catalizador de la denitrosación de GSNO, sino que su acción se ve

significativamente potenciada por la presencia de ioduro (Figura 7). Basándonos en esta observación se propone que el mecanismo por el que el I^- es tan efectivo en la denitrosación, es a través de la formación de triioduro (I_3^-), la cual se puede ver favorecida por las condiciones ácidas del ensayo. De hecho, la mezcla de I^-/I_3^- , es la utilizada como reductor en el método de quimioluminiscencia para la cuantificación de RSNO a partir del nitrito desplazado del mismo. De todas formas las condiciones de acidez tan altas necesarias para promover la denitrosación (2 M HCl), hacen difícil la utilización de este reactivo en proteínas nitrosadas, ya que sería de esperar que la proteína se desnaturalice y precipite de manera irreversible en estas condiciones. Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a que el ioduro no podría ser una alternativa al uso de ascorbato en un ensayo del tipo biotin switch.

Los mercuriales orgánicos han sido utilizados desde la década del 50, como reactivos específicos de tioles, tanto de bajo peso molecular como proteicos [76-80]. Si bien son menos populares hoy en día, estos compuestos representan una herramienta con gran potencial para ser utilizados como agentes denitrosantes de RSNO. El mercurio en este tipo de compuestos sería responsable de la denitrosación, y valiéndonos de la capacidad del mismo de permanecer unido al tiol, se podría utilizar el resto de la molécula como etiqueta específica del mismo. En este trabajo se analiza por primera vez la reactividad de estos mercuriales con *S*-nitrosotioles de relevancia biológica y se evalúa su utilidad como herramienta de identificación de los mismos. Se decidió ensayar una variedad de mercuriales, que difieran en su estructura y propiedades químicas. Así se investigó la capacidad denitrosante de moléculas pequeñas como el etilmercurio, de mayor complejidad como ser el pCMB y el nitrofenil mercurio, y compuestos de mayor tamaño y con propiedades colorimétricas y fluorimétricas como el mercuriocromo y la merurifluoresceína. En este trabajo se mostró que el pCMB provocó la denitrosación del GSNO, con rendimientos comparables a los obtenidos con ascorbato en presencia de metales (datos no mostrados) y con ioduro, postulándose como un reactivo eficiente en la descomposición de RSNO. Además, el pCMB no solo fue capaz de denitrosar tioles proteicos, como la SNOBSA, sino que efectivamente permanece unido a la misma en un porcentaje importante, aunque no completamente. Si bien la constante de reacción

obtenida para la reacción del GSNO y *p*CMB es muy chica, la denitrosación ocurre en un período de tiempo apropiado para ser utilizada en condiciones normales de laboratorio. Resultados similares se obtuvieron con el etilmercurio. Este reactivo mostró ser eficiente en la denitrosación de GSNO, reaccionado también con una estequiometría 1:1. Aunque las constantes cinéticas para el *p*CMB y EtHg se determinaron a diferentes temperaturas y no pueden compararse entre sí, ambas reacciones transcurren en tiempos apropiados para su uso. La efectividad del etilmercurio sugiere la posibilidad de diseñar alquilmercuriales con grupos funcionales que ayuden a la captura de nitrosotioles proteicos con fines proteómicos.

Si bien el *p*CMB parece ser un reactivo prometedor, el mercuriocromo y la mercurifluoresceína poseen la ventaja de ser coloreados y fluorescentes. La estructura química de estos dos compuestos es muy similar, pero la velocidad con la que reaccionan con GSNO mostró ser muy diferente. El Merc no fue capaz de causar la denitrosación completa del nitrosotiol, incluso cuando la mezcla fue calentada e incubada por períodos largos de tiempo. En cambio el FMA mostró ser más eficiente en la denitrosación de GSNO, aunque comparado con el *p*CMB o el EtHg sigue siendo una reacción muy lenta. Si bien el GSNO es un compuesto relativamente estable en solución, esto no es una característica común a todos los RSNO, que como se mencionó anteriormente, son moléculas sensibles a muchos factores ambientales, como la luz, temperatura, pH, etc. En este sentido el tiempo de reacción entre el nitrosotiol y el mercurial se vuelve un paso crítico en el desarrollo de una técnica de identificación directa de RSNO. La cinética lenta observada para el FMA y el GSNO es llamativa, ya que en un trabajo anterior donde se estudió el uso de FMA como marcador de tioles se menciona que la reacción entre este mercurial y diferentes tioles es muy rápida [75] (Tabla 5). Si bien en nuestro caso la constante de velocidad para la reacción FMA-GSNO no fue determinada, es claro que el grupo NO en el tiol estaría afectando la cinética de la reacción, comparada con la del tiol libre. En este artículo, se utilizó el efecto de apagamiento de fluorescencia causado por los tioles al reaccionar con el FMA. Este mismo efecto fue confirmado en este trabajo, ya que la presencia tanto de GSNO como de SNOTrx provocó una importante disminución en la intensidad de fluorescencia del FMA. La Figura 29 fue tomada del artículo de Takeuchi y *col.* [75], donde se observa el efecto mencionado en los espectros de

absorción y fluorescencia del FMA con otros tioles. Parece evidente que el efecto sobre la absorción o fluorescencia del FMA, es dependiente de la naturaleza del compuesto que contiene al tiol, de hecho se ha sugerido que el FMA es muy sensible al microentorno del tiol [71].

Tabla 5. Constantes de velocidad para la reacción entre FMA y diferentes tioles.

Tiol	k ($M^{-1}s^{-1}$) en buffer fosfato
N-acetil cisteína	1.1×10^7
Oxyhemoglobina	1.8×10^7
Deoxyhemoglobina	3.1×10^5
BSA	1.5×10^7

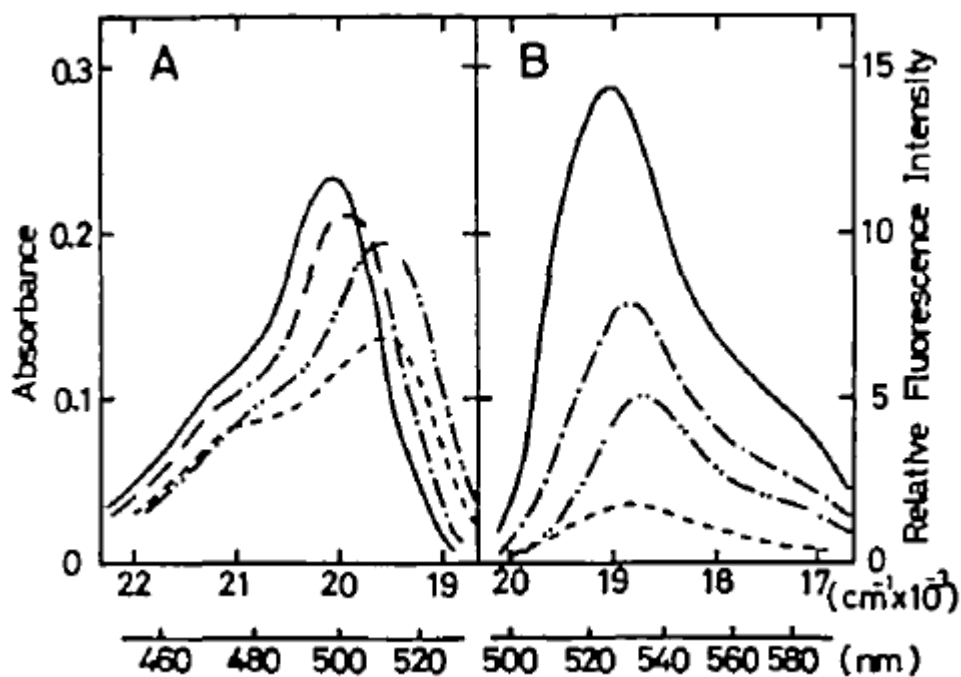


Figura 29. Espectros de absorción y fluorescencia del FMA y sus productos de reacción con tioles en buffer Tris [75].

El FMA y el Merc han sido utilizados anteriormente como marcadores específicos de tioles, con gran éxito y se han utilizado, incluso para la titulación de tioles proteicos. Sin embargo, no siempre se ha tenido en cuenta que ambos mercuriales interaccionan con las proteínas no solo a través de grupos tiol (residuos de cisteína). Hemos comprobado que tanto el Merc, como el FMA se unen a proteínas previamente tratadas con NEM, o sea con sus tioles alquilados, aunque aparentemente en menor proporción que la unión a la proteína nativa. Este fenómeno también fue observado por Nohammer y *col.* en 1981 [81]. En este trabajo se menciona que en ensayos histológicos, el mercuriocromo forma aductos proteína-mercurial inespecíficos en cantidades comparables a los específicos. Sin embargo, se proponen dos métodos para eliminar el Merc unido inespecíficamente, que se basan en la mayor afinidad de unión del Merc a los tioles, en comparación con otros residuos proteicos. Nohammer y *col.* utilizan reacciones de competencia con tioles de bajo peso molecular con baja nucleofilia (ácido tioglicólico), o con CN^- para formar un complejo con Merc que es soluble en agua. Los resultados de este trabajo indican que ambos tratamientos fueron efectivos, ya que luego de los mismos la cantidad de tioles cuantificados por Merc fue igual al determinado por el método de Ellman. Cabe mencionar, que nosotros realizamos lavados con CN^- en los ciclos de precipitado y resuspensión, con el objetivo de remover el Merc de la BSA bloqueada con NEM, sin éxito alguno (datos no mostrados). Por otro lado Schauenstein y *col.* [82], utilizaron gel filtración en G-25 para eliminar el Merc que no reaccionó en una mezcla con BSA. Nuestros resultados indican que esta técnica de separación, tampoco fue eficiente en la eliminación del Merc libre y del Merc unido inespecíficamente a la proteína.

La estequiometría entre los mercuriales y los tioles también ha sido muy estudiada en la literatura, y varios trabajos establecen que la reacción de los organomercuriales con tioles, sobre todo los proteicos, es de 1 a 1 [76, 78]. Nosotros hemos observado lo mismo para el pCMB y EtHg, haciéndose más difícil su elucidación en los experimentos con FMA y Merc. De todos modos, dado el tamaño de estos mercuriales, es factible pensar que los impedimentos estéricos harían difícil que más de un mol de mercurial o tiol pueda interaccionar con el otro. En cambio, el cloruro de mercurio sí es capaz de formar complejos del tipo $(\text{RS})_2\text{Hg}$, sobre todo con tioles de bajo peso molecular.

Si bien los organomercuriales han sido muy utilizados y caracterizados en sus reacciones con tioles libres, no se había evaluado su utilidad como herramientas de identificación de S-nitrosotioles hasta el momento. En este trabajo hemos demostrado que la reactividad de estos compuestos hacia RSNO es diferente a la documentada para RSH. La diferencia principal radica en la cinética de reacción, a lo que se suma la inespecificidad de la unión a proteínas. Evidentemente, la reacción inicial de denitrosación es mucho más lenta para los organomercuriales que para el ion mercurico (Hg^{2+}). Una posible manera de acelerar la reacción sería agregar cantidades catalíticas de Hg^{2+} , siempre y cuando el Hg^{2+} puede ser desplazado del tiol por un exceso de organomercurial. Además, se podrían ensayar condiciones adicionales para desplazar el organomercurial unido no covalentemente, como ser la utilización de imidazol u otro agente quelante. Si se encontrase solución para esos dos problemas de baja velocidad de reacción con RSNO e inespecificidad de unión a proteínas se contaría con una herramienta poderosa para la detección y captura de nitrosotioles biológicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Lancaster, J.R.J., *Nitroxidative, Nitrosative, and Nitrative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry Under Biological Conditions*. Chem. Res. Toxicol., 2006. **19**: p. 1160-1174.
2. Jaffrey, S.R., et al., *Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide*. Nature Cell Biol., 2001. **3**: p. 193-197.
3. Goldstein, S. and G. Czapski, *Mechanism of the Nitrosation of Thiols and Amines by Oxygenated NO Solutions: the Nature of the Nitrosating Intermediates*. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**(14): p. 3419-3425.
4. Stamler, J.S., et al., *Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin*. PNAS, 1992. **89**: p. 7674-7677.
5. Jour'dheuil, D., et al., *Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood*. Free Radical Biol. Med., 2000. **28**(3): p. 409-417.
6. Orie, N.N., et al., *S-nitroso-albumin carries a thiol-labile pool of nitric oxide, which causes venodilation in the rat*. Am. J. Physiol. Heart and circulatory physiology, 2005. **289**: p. H916-H923.
7. Ignarro, L., *Introduction and overview*, in *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*, L. Ignarro, Editor. 2000, Academic Press: Los Angeles.
8. Bryan, N.S., et al., *Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo*. PNAS, 2004. **101**(12): p. 4308-4313.
9. Tuteja, N., et al., *Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology*. J. Biomed. Biotechnol., 2004. **4**: p. 227-237.
10. Marino, S.M. and V.N. Gladyshev, *Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation*. J Mol Biol, 2010. **395**(4): p. 844-59.
11. Greco, T.M., et al., *Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7420-5.
12. Stamler, J., S. Lamas, and F. Fang, *Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism*. Cell, 2001. **106**: p. 675-683.
13. Coles, S., et al., *S-Nitrosoglutathione Inactivation of the Mitochondrial and Cytosolic BCAT Proteins: S-Nitrosation and S-Thiolation*. Biochemistry, 2009. **48**(3): p. 645-656.
14. Goyette, J. and C. Geczy, *Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function*. Amino Acids, 2010. **En prensa**.
15. Morrell, C., et al., *Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation*. Proc Natl Acad Sci, 2005. **102**: p. 3782-3787.
16. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 665-74.
17. Handy, D.E. and J. Loscalzo, *Nitric oxide and posttranslational modification of the vascular proteome*. Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology, 2006. **26**: p. 1207-1214.
18. Burwell, L.S., et al., *Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I*. Biochem. J, 2006. **394**: p. 627-634.
19. Martínez-Ruiz, A. and S. Lamas, *Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells*. Arch. Biochem. Biophys., 2004. **423**: p. 192-199.
20. Sengupta, R., et al., *Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols*. Biochemistry, 2007. **46**(28): p. 8472-8483.
21. Yao, D., et al., *Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity*. PNAS, 2004. **101**(29): p. 10810-10814.
22. Gu, Z., T. Nakamura, and S.A. Lipton, *Redox Reactions Induced by Nitrosative Stress Mediate Protein Misfolding and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases*. Mol. Neurobiol, 2010. **En prensa**.
23. Schonhoff, C., et al., *S-Nitrosothiol Depletion in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Proc Natl Acad Sci, 2006. **103**(7): p. 2404-2409.
24. Ng, E. and P. Kubes, *The physiology of S-nitrosothiols: carrier molecules for nitric oxide*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2003. **81**(8): p. 759-764.
25. Krieger, M., et al., *Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice*. Nitric oxide, 2006. **14**: p. 12-20.

26. Gorren, A.C.F., et al., *Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione*. Arch. Biochem. Biophys., 1996. **330**(2): p. 219-228.
27. Nath, N., O. Morinaga, and I. Singh, *S-nitrosoglutathione a Physiologic Nitric Oxide Carrier Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* J. Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(2): p. 240-251.
28. Hogg, N., *The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2002. **42**: p. 585-600.
29. Liu, X., et al., *Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes*. Nat. Acad. Sci. USA, 1998. **95**: p. 2175-2179.
30. Möller, M., et al., *Membrane "lens" effect: Focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the NO/O₂ reaction*. Chem. Res. Toxicol., 2007. **20**(4): p. 709-714.
31. Lancaster, J., *Protein cysteine thiol nitrosation: Maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling? Nitric oxide*, 2008. **19**: p. 68-72.
32. Jourdain, D., F. Jourdain, and M. Feelisch, *Oxidation and nitrosation of thiols at low molecular exposure to nitric oxide*. J. Biol. Chem., 2003. **278**: p. 15720-15726.
33. Espey, M.G., et al., *Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide*. PNAS, 2002. **99**(17): p. 11127-11132.
34. Madej, E., et al., *Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit*. Free Rad. Biol. Med., 2008. **44**: p. 2013-2018.
35. Radi, R., A. Denicola, and B. Freeman, *Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate*. Methods Enzymol, 1999. **301**: p. 353-367.
36. Bonini, M., et al., *Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide*. J Biol Chem, 1999. **109**: p. 1311-1319.
37. Ford, E., M. Hughes, and P. Wardman, *Kinetics of the reactions of nitrofen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH*. Free Rad. Biol. Med., 2002. **32**(12): p. 1314-1323.
38. Gaut, J.P., et al., *Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo*. J. Clin. Inv., 2002. **109**: p. 1311-1319.
39. Van der Vliet, A., et al., *Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7617-25.
40. Zhang, Y., et al., *Characterization and application of the biotin-switch assay for the identification of S-nitrosated proteins*. Free Rad. Biol. Med., 2005. **38**: p. 874-881.
41. Bosworth, C., et al., *Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci, 2009. **106**(12): p. 4671-4676.
42. Basu, S., et al., *A novel role for cytochrome c: Efficient catalysis of S-nitrosothiol formation*. Free Rad. Biol. Med., 2010. **48**: p. 255.
43. Keszler, A., Y. Zhang, and N. Hogg, *Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed?* Free Rad. Biol. Med., 2010. **48**: p. 55-64.
44. Gu, J. and R. Lewis, *Effect of pH and Metal Ions on the Decomposition Rate of S-nitrosocysteine*. Ann Biomed Eng, 2007. **35**(9): p. 1554-1560.
45. Benhar, M., et al., *Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins*. Science, 2008. **320**(5879): p. 1050-4.
46. Hess, D.T., et al., *Protein S-nitrosylation: Purview and parameters*. Nature reviews. Mol. Cell Biol., 2005. **6**: p. 150-166.
47. Liu, L., *A metabolic enzyme for s-nitrosothiols conserved from bacteria to humans*. Nature, 2001. **410**: p. 490-494.
48. Stoyanovsky, D., et al., *Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols*. J. Am. Chem. Soc., 2005. **127**: p. 15815-15823.
49. Zhang, L., et al., *Cell-surface protein disulfide isomerase is required for transnitrosation of metallothionein by S-nitroso-albumin in intact rat pulmonary vascular endothelial cells*. Exp Biol Med, 2006. **23**(19): p. 1507-1515.
50. Trujillo, M., et al., *Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7828-34.
51. Williams, D.L.H., *Synthesis, Properties and Reactions of S-nitrosothiols*, in *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide*. 2004, Elsevier B.V. p. 137-159.

52. Saville, B., *A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols*. *Analyst*, 1958. **83**: p. 670-672.
53. Mannick, J. and C. Schonhoff, *Post-translational modifications: specialized applications*, in *Current protocols in protein science*. 2004, John Wiley & Sons. Inc. p. 14.6.1-14.6.19.
54. Huang, B. and C. Chen, *An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin switch assay*. *Free Rad. Biol. Med.*, 2006. **41**: p. 562-567.
55. Weichsel, A., J. Brailey, and W. Montfort, *Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin*. *Biochemistry*, 2001. **46**: p. 1219-1227.
56. Santhanam, L., et al., *Selective fluorescent labeling of S-nitrosothiols (S-FLOS): A novel method for studying S-nitrosation*. *Nitric oxide*, 2008. **19**: p. 295-302.
57. Pan, J., et al., *A fluorogenic dye activated by S-nitrosothiols*. *Mol. BioSyst.*, 2009. **5**: p. 918-920.
58. Tello, D., et al., *A "fluorescence switch" technique increases the sensitivity of proteomic detection and identification of S-nitrosylated proteins*. *Proteomics*, 2009. **9**: p. 5359-5370.
59. Krupp, E., et al., *Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS*. *Anal Bioanal Chem*, 2008. **390**: p. 1753-1764.
60. Forrester, M., et al., *Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture*. *Nature Biotechnology*, 2009. **27**(6): p. 557-559.
61. Wang, X., et al., *Copper dependence of the biotin switch assay: Modified assay for measuring cellular and blood nitrosated proteins*. *Free Rad. Biol. Med.*, 2008. **44**(7): p. 1362-1372.
62. Reid, R. and D. Rabenstein, *Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. XVII. Formation constants for the complexation of methylmercury by sulfhydrylcontaining amino acids and related molecules*. *Can. J. Chem.*, 1981. **59**: p. 1505-1514.
63. Kaim, W. and B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. *Inorganic Chemistry*, ed. G. Meyer and A. Nakamura. 1994, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 338-343.
64. Kolthoff, I., W. Stricks, and L. Morren, *Amperometric Mercurimetric Titration of Sulfhydryl Groups in Biologically Important Substances*. *Anal Chem*, 1954. **26**(2): p. 366-372.
65. Doane, L. and J. Stock, *Determination of thiols by conductometric titration with mercury(II) chloride in water and in N,N-dimethylformamide*. *Anal Chem*, 1978. **50**(13): p. 1891-1895.
66. Chen, R., *Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment*. *J Biol Chem*, 1967. **242**: p. 173-181.
67. Meucci, E., A. Mordente, and G.E. Martorana, *Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(8): p. 4692-9.
68. Ellman, G.L., H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem*, 1979. **93**(1): p. 98-102.
69. Manta, B., et al., *The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2*. *Arch Biochem Biophys*, 2009. **484**(2): p. 146-54.
70. Boyer, P., *Spectrophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954. **76**(17): p. 4331-4337.
71. Mihashi, K., et al., *Absorption, fluorescence, and linear dichroism spectra of fluorescein mercuric acetate (FMA) bound to F-actin. Two kinds of effects of divalent cations*. *J Biochem*, 1979. **85**(2): p. 359-66.
72. Hugo, M., et al., *Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics*. *Biochemistry*, 2009. **48**(40): p. 9416-26.
73. Martínez, G., et al., *A Kinetic Study in the Photodynamic Properties of the Xanthene Dye Merbromin (Mercurochrome) and its Aggregates with Amino Acids in Aqueous solution*. *Quimica Nova*, 1993. **16**(4): p. 294-300.
74. Schauenstein, E. and J. Scheuringer, *[Quantitative determination of sulfhydryl groups with "mercurochrome" (author's transl)]*. *Histochemistry*, 1980. **67**(2): p. 205-19.
75. Takeuchi, S. and A. Maeda, *Use of fluorescein mercuric acetate as a probe in studies of thiol-containing proteins*. *J Biochem*, 1977. **81**(4): p. 971-6.
76. Allison, A.C. and R. Cecil, *The thiol groups of normal adult human haemoglobin*. *Biochem J*, 1958. **69**(1): p. 27-34.

77. Arnold, A. and A. Canty, *Methylmercury(II) sulfhydryl interactions. Potentiometric determination of the formation constants for complexation of methylmercury(II) by sulfhydryl containing amino acids and related molecules, including glutathione.* Can. J. Chem., 1983. **61**: p. 1428-1434.
78. Baines, B.S. and K. Brocklehurst, *A thiol-labelling reagent and reactivity probe containing electrophilic mercury and a chromophoric leaving group.* Biochem J, 1979. **179**(3): p. 701-4.
79. Bednar, R.A., et al., *Chemical modification of chalcone isomerase by mercurials and tetrathionate. Evidence for a single cysteine residue in the active site.* J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 14272-6.
80. Colotti, G., et al., *The homodimeric hemoglobin from Scapharca can be locked into new cooperative structures upon reaction of Cys92, located at the subunit interface, with organomercurials.* FEBS Lett, 1992. **314**(3): p. 481-5.
81. Nohammer, G., G. Desoye, and G. Khoschsorur, *Quantitative cytospectrophotometrical determination of the total protein thiols with "mercurochrom": optimization and calibration of the histochemical reaction.* Histochemistry, 1981. **71**(2): p. 291-300.
82. Schauenstein, E., G. Desoye, and G. Nohammer, *[Quantitative determination of proteins in single cells with amidoblack (author's transl)].* Histochemistry, 1980. **68**(1): p. 75-90.

Parte II

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS
URUGUAYOS**

Fisicoquímica y Efectos Biológicos

ÍNDICE

	Página
Resumen	3
1. Introducción	4
2. Objetivos	14
3. Materiales y Métodos	15
4. Resultados	19
4.1. Propiedades fisicoquímicas	20
4.2. Capacidad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos	26
4.2.1. Ensayo ORAC	26
4.2.2. Inhibición de la oxidación de LDL	28
4.2.3. Inhibición de la oxidación de tirosina	31
4.3. Efectos celulares de extractos etanólicos de propóleos	33
5. Conclusiones y Discusión	37
6. Bibliografía	44

RESUMEN

El propóleo es un producto natural elaborado por las abejas con importantes actividades biológicas demostradas, entre las que se incluyen antiinflamatoria, antitumoral, antimicrobiana y antioxidante. Dichas propiedades están íntimamente ligadas a su composición química y varían en los distintos propóleos en función de varios factores, principalmente de la distribución geográfica y botánica. Esta variabilidad determina diferencias significativas en su calidad y potenciales aplicaciones. Es por eso que ha surgido un reciente interés en investigar más en detalle la composición y propiedades de los propóleos de distintas regiones, buscando además parámetros químicos y/o biológicos de estandarización. La bioactividad de los propóleos se relaciona directamente con la naturaleza y concentración de los polifenoles en general, y de flavonoides en particular. Estos compuestos se encuentran en la fracción resinosa del producto, la cual constituye más del 50% del total de componentes. Una de las características principales de estos compuestos químicos es la de actuar como antioxidantes. Actualmente se ha ampliado el concepto de antioxidante convencional, abarcando no sólo la capacidad de reaccionar con moléculas oxidantes, sino que constituyen compuestos capaces de desencadenar un mecanismo de señalización que derive posteriormente en una respuesta antioxidante celular. En este sentido conocer el potencial antioxidante de nuestros propóleos aporta un valor agregado a este producto de la colmena, que contribuirá a buscar un mejor aprovechamiento de su explotación en el Uruguay y en el mercado internacional.

En este trabajo se estudió la capacidad antioxidante de propóleos uruguayos procedentes de diferentes regiones del país. Se determinaron las características organolépticas de todas las muestras y se prepararon extractos etanólicos, para su análisis químico y biológico. La composición química se evaluó por espectrofotometría UV y HPLC y se determinó la concentración relativa de polifenoles y flavonoides. La capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de propóleos se evaluó *in vitro* mediante un ensayo ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), así como siguiendo la capacidad de inhibir la oxidación de la lipoproteína proaterogénica LDL y de tirosinas. Todas las muestras ensayadas inhibieron la oxidación de LDL y la formación de nitrotirosina, y mostraron un gran potencial antioxidante, con valores ORAC significativamente mayores al de otros productos naturales. Por otro lado se evaluaron efectos celulares, donde los extractos ensayados mostraron ser potentes inductores de la expresión de la eNOS y con actividad citotóxica sobre células de adenocarcinoma de colon. Todos los efectos evaluados dependen directamente de la concentración de polifenoles y flavonoides presentes en los propóleos. En definitiva en este trabajo se demuestra que los propóleos uruguayos poseen una capacidad antioxidante importante y son potencialmente capaces de inhibir la oxidación de lípidos, proteínas y la formación de radicales libres. Además estos propóleos demostraron ser capaces de desencadenar respuestas celulares, modificando la expresión de enzimas específicas y evitando la proliferación de células tumorales.

1. INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto natural derivado de la colmena, elaborado por las abejas a partir de material recolectado de diferentes plantas y de su propio metabolismo, que posee comprobadas actividades antiinflamatoria [1], antiviral [2], antitumoral [3], antimicrobiana [4] y antioxidante [5], entre otras. Las abejas producen y utilizan al propóleo con fines análogos a la industria humana. En la colmena el propóleo genera un ambiente antiséptico; es inmunoestimulante; es impermeabilizante, evitando la pérdida de vapor de agua necesaria para el desarrollo de la progenie de abejas; es aislante térmico, se usa como cemento en huecos y grietas; barniza y repara las paredes internas de los panales y recubre a los intrusos luego de ser envenenados, evitando que se descompongan y propaguen infecciones [6-11].

En la elaboración del propóleo están involucradas sustancias vegetales (resinas) y animales (ceras y enzimas) que influyen notablemente en la composición del mismo [12]. Las propiedades farmacológicas de los propóleos están íntimamente ligadas a su composición química y varían en los distintos propóleos en función de su origen geográfico, botánico, método y tiempo de recolección, tipo de abeja, etc. [5, 12-13]. Esto determina diferencias en su calidad y propiedades organolépticas como la consistencia, color (que puede variar entre un verde – amarillo y un marrón oscuro), sabor, olor, y características medicinales (Figura 1) [7-8, 13-15]. Si bien esta variabilidad obstaculiza la estandarización, permite un espectro más vasto de aplicación.



Figura 1. Fotografías ilustrativas de la variedad de aspectos del propóleo

En términos muy generales el propóleo se compone de 50–55 % de resinas, 30–40% de ceras, 5–10% de aceites volátiles, 5% de polen y 5–10% de materiales diversos (orgánicos o minerales) [12, 16]. Las ceras son solubles en solventes apolares y se consideran la fracción inerte. Las resinas son el componente activo y son muy solubles en etanol, sin embargo dependiendo de su origen botánico también pueden ser solubles en agua [12]. Los componentes con actividad biológica son los polifenoles en general y flavonoides en particular, presentes en la fracción resinosa.

La estructura básica de los compuestos fenólicos consiste en un anillo aromático con uno o más hidroxilos como sustituyentes, siendo el más simple el fenol (Figura 2A). Por su carácter aromático los polifenoles presentan máximos de absorbancia en el UV. Estos compuestos unidos con azúcares se denominan glicósidos, los cuales son hidrosolubles, mientras que la forma no combinada, llamada aglicona es menos soluble. Los flavonoides por su parte contienen anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos (Figura 2B). Son muy abundantes en plantas, ya que alrededor de un 2 % del C asimilado por plantas se convierte en flavonoides o compuestos relacionados. Los flavonoides se clasifican en flavanonas, flavonoles, flavonas, chalconas, cianidinas, y otros, según la naturaleza de la cadena central C₃ (Figura 3).

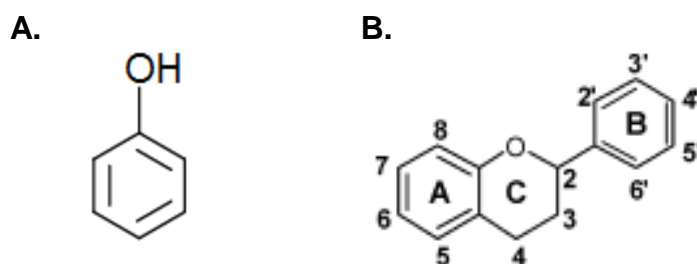


Figura 2. A. Estructura química del fenol. B. Estructura básica de un flavonoide

El propóleo se clasifica en dos grupos principales a nivel mundial: (i) brasilero (tipo baccharis o chilca), rico en derivados del ácido cumárico y se encuentra principalmente en Brasil; y (ii) europeo (tipo álamo), rico en flavonoides y específicamente en pinocembrina, crisina, galangina y tectocrisina [17], el cual se

encuentra ampliamente distribuido por el mundo (China, Hungría, Bulgaria, Uruguay y Argentina, entre otros).

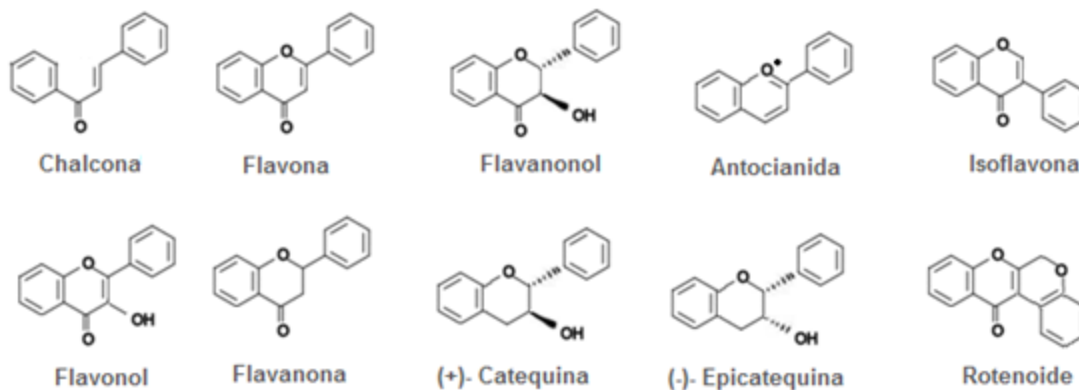


Figura 3. Estructura química de algunos tipos de flavonoides.

Tabla 1. Análisis químico de propóleos uruguayos [18].

Parámetro determinado	Composición (%)
Ceras	13.7 ± 1.84
Resinas y bálsamos	77.75 ± 1.88
Compuestos fenólicos*	21.73 ± 1,70
Humedad	2,32 ± 0,23
Aceites esenciales	0,89 ± 0,17
Cenizas	3,32 ± 0,46

*contenido en las resinas

Existen únicamente tres trabajos en la literatura que analizan la composición de los propóleos uruguayos. El análisis químico de las muestras frescas, realizado en uno de éstos, se muestra en la Tabla 1. Los compuestos fenólicos más abundantes fueron acacetina, apigenina, pinocembrina, isoramnetina, vainillina, quercetina, tectocrisina y

kaempferol. En este trabajo observaron también que la concentración de componentes activos y propiedades biológicas disminuyó, luego de un año de conservar las muestras a temperatura ambiente y oscuridad [18]. En otro de los trabajos, a partir de extractos etanólicos, se identificaron los compuestos indicados en la Tabla 2 y Figura 4, entre los que se destacan algunos compuestos nuevos: dos flavonoides (1 y 2) y uno de los ésteres del ácido ferúlico (24) [19]. La composición rica en flavonoides y ésteres del ácido ferúlico es similar a la de propóleos de Europa, China, Argentina y el sur de Brasil, de lo cual se deduce un origen botánico común, que para esas regiones es el álamo (*Populus sp.*) [19]. También se observa una equivalencia entre las propiedades biológicas evaluadas [20].

El amplio espectro de actividades biológicas de los propóleos se conoce hace tiempo y hay muchos trabajos científicos en la literatura que lo documentan. Como se mencionó anteriormente, las propiedades farmacológicas de los propóleos están íntimamente ligadas a su composición química y varían en los distintos propóleos en función de diversos factores. Se ha demostrado que el propóleos mejora la salud humana y previene enfermedades como la inflamación, diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares [21-22]. Por estas razones es ampliamente utilizado en la industria farmacológica, cosmetológica y alimenticia como suplemento saludable en bebidas y comidas. En particular, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, se ha comenzado a utilizar el propóleos como preservante natural de distintos productos de consumo [23-24].

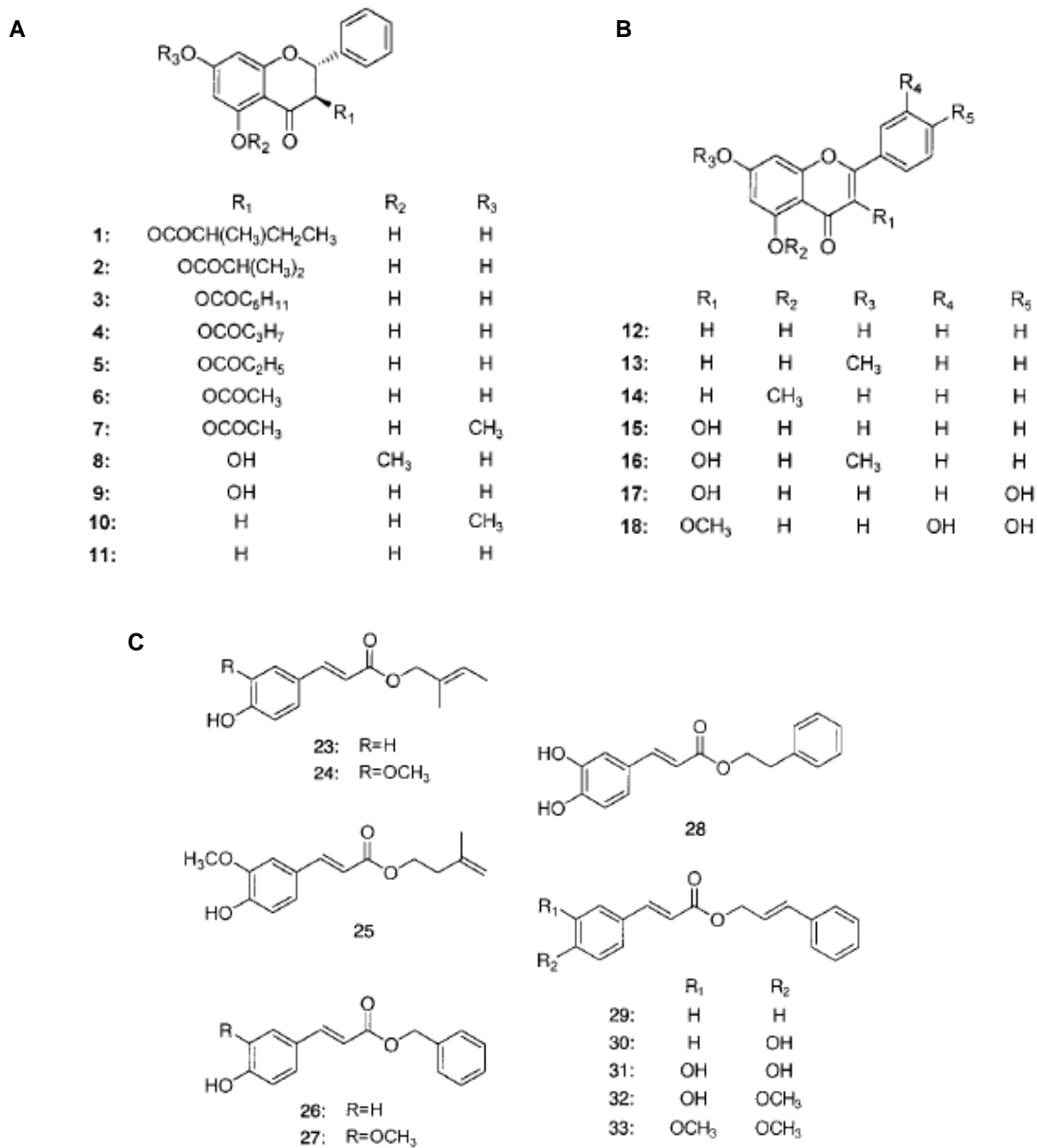


Figura 4. Compuestos fenólicos presentes en propóleos uruguayos [19]. **A.** Estructura de flavanonas y flavanonoles. **B.** Estructura de flavonas y flavonoles. **C.** Estructura de los ésteres del ácido fenólico.

Tabla 2. Compuestos fenólicos presentes en propóleos uruguayos [19]. Los números hacen referencia a las estructuras de la Figura 4.

N°	Nombre	N°	Nombre	N°	Nombre
1	pinobanksina 3-(2-metil) butirato	12	Crisina	23	2-metil 2-butenil p-cumarato
2	pinobanksina 3-isobutirato	13	Tectocrisina	24	2-metil 2-butenil ferulato
3	pinobanksina 3-hexanoato	14	crisina 5-metil-eter	25	3-metil 3-butenil ferulato
4	pinobanksina 3-butanoato	15	Galangina	26	benzil p-cumarato
5	pinobanksina 3-propanoato	16	Izalpinina	27	benzil ferulato
6	pinobanksina 3-acetato	17	Kaempferol	28	fenetil cafeato
7	pinobanksina 3-acetoxi-7-metil-éter (3-acetilalpinona)	18	quercetina 3-metil-éter	29	cinamil cinamato
8	pinobanksina 5-metil-éter	19	ácido p-cumárico	30	cinamil p-cumarato
9	Pinobanksina	20	ácido cafeico	31	cinamil cafeato
10	Pinostrobina	21	ácido 3,4-dimetoxi-cinámico	32	cinamil isoferulato
11	Pinocembrina	22	ácido cinamilideneacético	33	cinamil 3,4-dimetoxicinamato

Una de las propiedades más explotadas de los propóleos es su actividad antimicrobiana, la cual evidentemente, está directamente relacionada al contenido de polifenoles totales [4, 25]. El alto contenido en flavonoides lo hace particularmente eficiente frente a bacterias gram-positivas [25-26], incluido el estafilococo dorado [27]; así como frente a levaduras [28]. Contrariamente, su actividad es más limitada frente a bacterias gram-negativas [29], aunque *Pseudomona Aureginosa*, *Escherichia coli* y *Proteus* han mostrado ser sensibles al tratamiento con propóleos [27]. Los flavonoides galangina, pinocembrina y pinostrobina, además de ácidos aromáticos, ésteres de los ácidos ferúlico, benzoico y cafeico son potentes bactericidas y bacteriostáticos [27, 30]. Este efecto se ejerce a través de diversos mecanismos, por ejemplo, desacoplando la energía de transducción de la membrana y disminuyendo así la motilidad del microorganismo, favoreciendo la acción del sistema inmune y antibióticos [31]. En general estos compuestos provocan daños severos al microorganismo tanto estructurales como funcionales, inhibiendo el ciclo celular, la síntesis proteica,

estimulando la liberación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y la secreción de citoquinas; causando en última instancia la lisis bacteriana [27, 31-33]. Por su parte el efecto antiviral de los propóleos es de amplio espectro, siendo potente frente a *Herpes*, *Poliovirus* [34], y virus de influenza A H3N2 [35]. A esta actividad contribuyen componentes abundantes como flavonoles y flavonas [34]. Incluso se ha visto que estos compuestos poseen un efecto sobre el herpes genital, superior al tratamiento con antivirales reconocidos como el aciclovir [2]. Por otra parte se ha visto que el tratamiento con propóleos suprime la expresión del virus HIV-1 en cultivos de células de linfocitos T CD4⁺ y de la microglia infectados con el mismo [36]. Los propóleos poseen además, propiedades antiparasitarias [37] y estimulan la actividad fungicida de macrófagos [38-39].

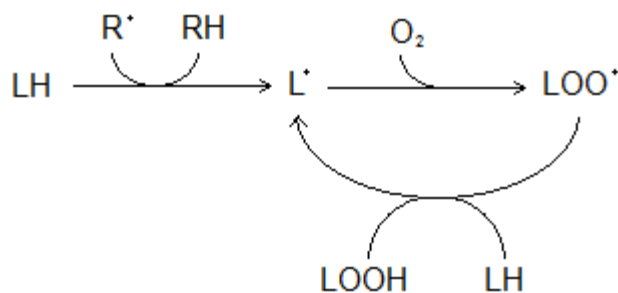
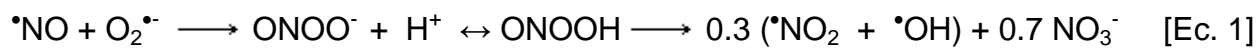
Otra de las propiedades beneficiosas destacadas de los propóleos es su capacidad antiinflamatoria y cicatrizante. Los mecanismos de acción incluyen la supresión de la migración de leucocitos [1], inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), y supresión de la activación y diferenciación de macrófagos mononucleares [40]. Se ha visto además que extractos etanólicos de propóleos ejercen funciones antiinflamatorias en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas [41]; y son inhibidores de la angiogénesis [42]. Particularmente el ácido cafeico fenetil éster (CAPE) es considerado el principal responsable de la acción antiinflamatoria [43-44], ya que inhibe la activación de NF- κ B [45], restringe la activación de células T [46], suprime la actividad de la ciclooxigenasa (COX) [47], y es un potente inhibidor de la síntesis de eicosanoides [48]. Otras propiedades inmunomoduladoras de los propóleos incluyen un incremento en los niveles de INF- γ secretado por los linfocitos, estimulación de la activación de macrófagos liberadores de óxido nítrico (\bullet NO) e inhibición de la proliferación linfocitaria [46, 49-51]. Además el uso de propóleos como adyuvante, mejora la eficacia de las vacunas [52], estimula la proliferación de leucocitos y la síntesis de anticuerpos, constituyendo un inmunoestimulante potente [53].

Los propóleos poseen propiedades hepatoprotectoras, principalmente debido a la presencia de ciertos minerales (cobre, hierro, manganeso y zinc) y flavonoides [54]. Se ha demostrado que los extractos de propóleos restauran las alteraciones del tejido *in vivo* [55-56], disminuyen el estrés oxidativo, contrarrestan los efectos del CCl_4 [57], curan el daño producido por acetaminofeno (AA, paracetamol) [58], contribuyen a conservar el nivel celular de glutatión y la integridad de la membrana [59] y reducen la toxicidad de drogas al combinarse con ellas [60].

Se ha observado que los propóleos son capaces de inducir apoptosis de células tumorales, regulando la actividad de caspasas, activando macrófagos [3] y potenciando la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) [61]. Ciertos componentes del propóleos previenen la formación de cáncer de colon [62-63], intestinal [64], de pulmón [65] y cáncer oral [66]. Los mecanismos involucrados incluyen: intervención en el ciclo celular, deteniendo la proliferación [67-70], estimulación de la fragmentación del ADN y la apoptosis [71]; restablecimiento de uniones intercelular de tipo GAP en células malignas [72], evitando las metástasis [73], entre otras. La ventaja principal de estos compuestos derivados de productos naturales, es que, en comparación con las drogas anticancerígenas, son menos genotóxicas hacia las células hematopoyéticas normales [74].

La capacidad antioxidante de productos naturales en general, y de los propóleos en particular, es una de las características más populares atribuidas a estos productos [22, 75-76]. En los sistemas biológicos se generan especies reactivas (algunas radicalares y otras no) derivadas del oxígeno y del nitrógeno, ya sea como consecuencia del metabolismo normal del oxígeno, por la acción de enzimas específicas (óxido nítrico sintasa, NADPH oxidasas, peroxidasas, etc.) o por exposición a determinados agentes ambientales (radiación UV, xenobióticos, etc.) [77-78]. Aunque radicales y oxidantes no son sinónimos, la mayoría de los radicales libres formados *in vivo* tienen un fuerte carácter oxidante, en particular el peroxinitrito, producto de la reacción entre $\cdot\text{NO}$ y superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$, Ec.1) y los radicales peroxilo (ROO^{\cdot} , Ec. 2) e hidroxilo (OH^{\cdot}). Se sabe que estas especies causan daño oxidativo a macromoléculas biológicas (proteínas, ADN, fosfolípidos y carbohidratos) alterando su estructura y por

ende su función biológica [77-78]. En respuesta a este bombardeo fisiológico de radicales, los organismos aeróbicos han evolucionado desarrollando diferentes mecanismos de defensa. Existen defensas antioxidantes primarias que descomponen directamente o atrapan estas especies reactivas, evitando la oxidación de biomoléculas críticas; éstas son enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, etc. Además, existen defensas no enzimáticas que incluye un grupo de biorreductores lipofílicos e hidrofílicos como el α -tocoferol (vit.E), ubiquinol, ácido ascórbico (vit.C), ácido úrico, etc., que actúan en diferentes compartimentos celulares [79].



[Ec. 2]

Considerando este delicado balance entre oxidantes, productos secundarios del metabolismo y antioxidantes endógenos, Helmut Sies define en 1991 el término “**estrés oxidativo**” como “una perturbación en el balance pro-anti oxidante a favor del primero, produciendo potencialmente daño” [80]. Recientemente se ha sugerido una nueva definición de estrés oxidativo [81], atendiendo a la creciente evidencia de que las especies oxidantes tienen un papel importante en la traducción de señales aún en condiciones fisiológicas, se debe considerar al estrés oxidativo como una disrupción en la señalización y control del estado redox celular. Los antioxidantes participan en la homeostasis redox y la reacción de éstos con radicales oxidantes, es más que una simple reacción de neutralización o “scavenging” de radicales, sino que se debe reconocer como parte de un mecanismo de señalización celular. De hecho, los resultados clínicos beneficiosos obtenidos con el uso de ciertos antioxidantes en patologías asociadas con estrés oxidativo, se están explicando por el rol que juegan los

antioxidantes en los mecanismos de señalización [82], más que por su característico poder reductor.

El daño oxidativo constituye uno de los mecanismos que conduce a enfermedades crónicas de alta incidencia como el cáncer, aterosclerosis, procesos inflamatorios, asma y envejecimiento [77, 80]. En este contexto los radicales libres representan un blanco terapéutico prometedor en el desarrollo de fármacos contra varias enfermedades. Por lo tanto hay un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes (naturales y sintéticos) que detengan o prevengan estos mecanismos de oxidación. Los polifenoles, constituyentes mayoritarios de los propóleos, poseen una fuerte actividad antioxidante [83], incluso se ha encontrado una buena correlación entre la ingesta de polifenoles y la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares [84] y neurodegenerativas [85].

Dado que el mercado para este producto está en franco crecimiento, con claras aplicaciones en la industria, se hace importante conocer en mayor detalle la composición y propiedades de los propóleos de distintas regiones, buscando además parámetros químicos y/o biológicos de estandarización. Además, conocer el potencial antioxidante de nuestros propóleos, le proporciona un valor agregado a este producto de la colmena que contribuirá a buscar un mejor aprovechamiento de su explotación en el Uruguay. En este trabajo, las muestras de propóleos en bruto fueron proporcionadas por la Sociedad Apícola Uruguaya (SAU), provenientes de diferentes regiones del país y fueron analizadas para la determinación de sus propiedades organolépticas, fisicoquímicas y antioxidantes, así como para la evaluación de efectos celulares.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos uruguayos desde un enfoque fisicoquímico y biológico.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinación de las características fisicoquímicas de extractos etanólicos de propóleos.

2.2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*:

- Ensayo ORAC
- Inhibición de la oxidación de LDL y tirosina

2.2.3. Evaluación de los efectos biológicos en cultivos celulares.

- Expresión de eNOS en células endoteliales
- Inhibición del crecimiento de una línea celular tumoral

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de extractos etanólicos de propóleos (EEP). Las muestras de propóleos fueron proporcionadas por la Sociedad Apícola Uruguaya y fueron conservadas a -20°C en oscuridad hasta su uso. En la Figura 5 se muestra la distribución geográfica de las muestras analizadas. Los extractos etanólicos de propóleos (EEP, 40 mg/ml), se prepararon agregando 20 ml de EtOH 75% a 2 g de propóleos previamente pulverizados. Esta suspensión se calentó a $50-60^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos y luego se filtró. Este procedimiento se realizó dos veces sobre cada muestra y luego se llevó cada extracto a un volumen final de 50 ml. Cada muestra de EEP se burbujeó con gas nitrógeno y se conservaron a temperatura ambiente en oscuridad. Se registró el espectro de absorción UV de cada EEP en un espectrofotómetro Cary 50 (Varian, USA).

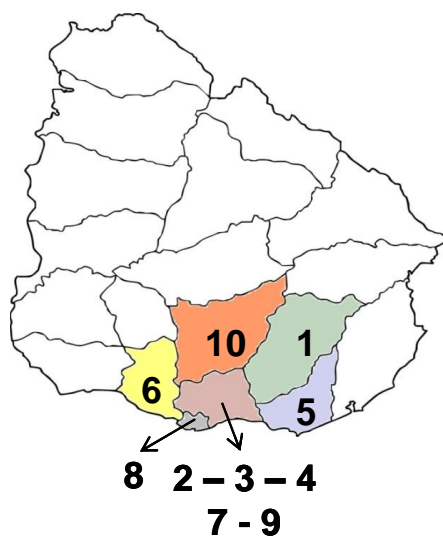


Figura 5. Distribución geográfica de las muestras de propóleos proporcionadas por la SAU.

3.2. Determinación del contenido de polifenoles y flavonoides totales. El contenido relativo de polifenoles fue determinado según el método de Folin-Ciocalteu (FC) [86]. Diferentes diluciones de EEP o ácido gálico (estándar) se mezclaron con el reactivo de FC, luego se agregó Na_2CO_3 10%, se incubó 2 h a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 760 nm. El contenido en flavonoides se determinó mezclando diferentes diluciones de EEP o quercetina (estándar) con Al_2Cl_3 5%. Dicha mezcla se

incubó 30 minutos en oscuridad y se determinó la absorbancia a 425 nm [86]. Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Electron Corporation, USA).

3.3. Separación de componentes de EEP por HPLC. Las muestras sometidas a este ensayo fueron los EEP 2, 3, 5 y 7. Las muestras fueron inyectadas en una columna de fase reversa C18 y se eluyeron a un flujo de 1ml/min, con un gradiente lineal de H₂O (solvente A) y metanol (solvente B), empezando con 30% B (0-15 min), aumentando hasta 90% B (15 - 75 min) y luego manteniendo 90% B (75 - 95 min) para finalmente decrecer hasta 30% B (95-105 min). Los compuestos separados se detectaron espectrofotométricamente a 254 nm. Los perfiles cromatográficos fueron realizados y analizados cualitativamente con la colaboración de la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Química, UdelaR.

3.4. Ensayo ORAC. El método utilizado fue adaptado de Davalos *et al.* [87]. Brevemente, se colocó diferentes diluciones de EEP o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Trolox (estándar) en una placa de 96 pocillos conteniendo fluoresceína 21 μM en buffer fosfato 75 mM, pH 7.4. La mezcla se preincubó durante 20 minutos a 37°C y luego se agregó 2, 2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP) 19 mM, concentración final. Se registró la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 512$ nm) cada 3 minutos, durante 90 minutos en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Electron Corporation, USA). Se calculó el área debajo de la curva (AUC) para el blanco (FL+ABAP) y cada concentración de Trolox, y se graficó vs la concentración de Trolox (μM) para obtener la curva de calibración. Luego se extrapolaron los valores de AUC obtenidos para cada muestra para obtener la concentración Trolox equivalente, la cual se utilizó en la Ec. 3 para obtener el valor ORAC de cada muestra de propóleos. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Lic. Gonzalo Genta, Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR.

$$\text{valor ORAC} = \frac{\text{concentracion Trolox equivalente}}{[\text{EEP}](\text{mg/L})} \quad [\text{Ec. 3}]$$

3.5. Oxidación de LDL. La LDL utilizada fue purificada a partir de plasma humano por ultracentrifugación en gradiente de KBr según se reportó previamente [88]. La concentración de proteína LDL se determinó a 280 nm, $\epsilon_{280} = 1.05 \text{ ml/mg.cm}^{-1}$ [88]. La oxidación de LDL se inició con el agregado de 50 μM CuSO_4 , a una solución de 0.05 mg/ml de proteína en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de EEP, en buffer fosfato 10 mM, pH 7.4. Se siguió la cinética de oxidación a 37°C por la aparición de dienos conjugados a 334 nm (Figura 11) en un espectrofotómetro Cary 50 (Varian, USA), acoplado a un controlador de temperatura.

3.6. Nitración de tirosina. La mezcla de reacción consistió en tirosina (Y) 0.1 mM en presencia de diferentes concentraciones de EEP, en buffer fosfato 100 mM, dtpa 0.1 mM, pH 7.4, a la cual se agregó 0.5 mM peroxinitrito para inducir la oxidación de Y. Los productos de reacción (NO_2Y y Y) se separaron por HPLC de fase reversa en una columna C18, en un gradiente de acetonitrilo 12%/TFA 0.1%/H₂O y fueron identificados por comparación con estándares de los mismos. El estándar de 3-nitrotirosina (NO_2Y) fue preparado mezclando 300 mg de tirosina con ácido acético a temperatura ambiente hasta la completa disolución del aminoácido. En baño de hielo se agregó la mezcla nitrante consistente en 0.1 ml de HNO_3 y 0.06 ml de H_2SO_4 en 5 ml totales de solución de tirosina. Se mantuvo la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Transcurrido ese período apareció un sólido amarillo, el cual fue filtrado y lavado con hexano. Para finalizar se recristalizó el sólido de acetato de etilo:metanol. Este producto fue amablemente sintetizado y purificado por la Dra. Mariana Boiani del Laboratorio de Química Orgánica (Facultad de Ciencias, UdelaR). Por su parte, el peroxinitrito utilizado se sintetizó a partir de NaNO_2 y H_2O_2 , como se describió previamente [89]. Antes de cada uso el H_2O_2 residual se eliminó con MnO_2 y la concentración de peroxinitrito se determinó a 302 nm, $\epsilon_{302} = 1.67 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.7. Expresión de eNOS en BAEC. Las células endoteliales de aorta bovina (BAEC) se obtuvieron a partir de aortas torácicas de vaca donadas por un frigorífico local y fueron cultivadas en medio M199 suplementado con 10% de suero fetal bovino en presencia de 0.1 g/L de estreptomycin y 0.1 g/L de penicilina, cambiando el medio cada 3 días. Para los experimentos se utilizaron células correspondientes a los pasajes 6-13. Para el ensayo con los EEP, se dispuso la misma cantidad de células en placas

de 60 mm de diámetro. Cuando se alcanzó el 90% de confluencia se cambió el medio por uno conteniendo 0.4 % de suero fetal bovino y se agregó la concentración correspondiente de EEP y las células se devolvieron a la estufa a 37°C, en atmósfera de CO₂. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (16 h), las células se lavaron con PBS, se cosecharon en buffer RIPA (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) y el lisado celular fue sonicado en 2 ciclos de 5 segundos cada uno. Luego, se cuantificó proteínas con el kit de ácido bicinconínico (Sigma-Aldrich; St. Louis, Mo. U.S.A.) y se sembró 10 µg de proteína de cada lisado celular en un gel de electroforesis SDS-PAGE. Finalmente se realizó un western blot para la enzima óxido nítrico sintasa endotelial. (eNOS). Los anticuerpos primario (anti eNOS) y secundario (anti ratón conjugado a HRP) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo. U.S.A.). Estos ensayos fueron realizados con la colaboración de la Dra. Natalia Romero (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR).

3.8. Efecto citotóxico en células de carcinoma de colon humano HT-29. Las células HT-29 fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino y fueron mantenidas a 37°C en atmósfera de CO₂. Al momento de agregar los estímulos, la monocapa de células se levantó con tripsina y se sembró la misma cantidad de células en una placa de 96 pocillos. Posteriormente se agregó según corresponda: EEP a diferentes concentraciones, solvente (EtOH) a la mayor concentración ensayada, DMSO 10% (control positivo) o medio de cultivo (control negativo) y se incubaron las células durante 72 h. Luego se agregaron 10 µl de WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato, Roche), y se dejó reaccionar 1 h. Por último se determinó la viabilidad celular espectrofotométricamente a 450 nm debida a la formación de un producto coloreado derivado del metabolismo de WST-1 por la célula. Estos ensayos fueron realizados con la colaboración del Lic. Martín Massner (Instituto Pasteur de Montevideo, Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR).

4. RESULTADOS

Las muestras de propóleos en bruto, proporcionadas por la SAU fueron clasificadas según su procedencia geográfica y caracterizadas por sus propiedades organolépticas como se muestra en la Tabla 3. Estas propiedades pueden ser usadas para estimar alguna de las propiedades fisicoquímicas a primera vista. Por ejemplo, si el propóleos es rígido significa que posee un alto contenido en resinas. Por otro lado, el sabor y olor son indicativos de la frescura de la muestra y las impurezas grandes pueden verse y separarse fácilmente. A partir de estas muestras, se prepararon los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de concentración 40 mg/ml, los cuales fueron utilizados para su caracterización fisicoquímica, antioxidante y para la evaluación de los efectos celulares.

Tabla 3. Propiedades organolépticas de las muestras de propóleos analizadas.

Muestra	Aspecto	Impurezas	Color
1	Cristales pequeños y polvo	Pasto	Oscuro y claro
2	Piedras pequeñas oscuras	Pasto	Marrón oscuro
3	Granulado pequeño y polvo	Pasto	Marrón oscuro
4	Cristales grandes	No	Ámbar
5	Granulado	No	Marrón oscuro
6	Granulado pequeño	No	Marrón oscuro
7	Cristales grandes	No	Ámbar
8	Masa grande consistente	Pasto	Marrón oscuro
9	Cristales grandes	No	Tonos de ámbar y naranja
10	Maleable	No	Rojizo

4.1. Propiedades fisicoquímicas

Como primera aproximación para la determinación del contenido total de componentes activos en los EEP, se realizaron espectros de absorción entre 240 y 420 nm para cada muestra a una concentración apropiada (Figura 6). Los polifenoles y flavonoides presentan un máximo de absorbancia en el UV, aproximadamente a 290 nm y la absorbancia en este máximo puede utilizarse como una medida relativa del contenido total de estos compuestos. La forma de los espectros fue similar para la mayoría de las muestras y de acuerdo a lo esperado, salvo para el EEP 5, el cual mostró un pico de absorbancia a 269 nm, posiblemente debido a la presencia de algún compuesto particular. Al comparar la absorbancia máxima en cada pico se observa que las muestras pueden clasificarse en dos grupos según la concentración relativa de polifenoles totales, donde las muestras EEP 4, 7, 9 y 10, presentan un alto contenido en polifenoles, mientras que el resto presentan un bajo contenido en los mismos (Tabla 4).

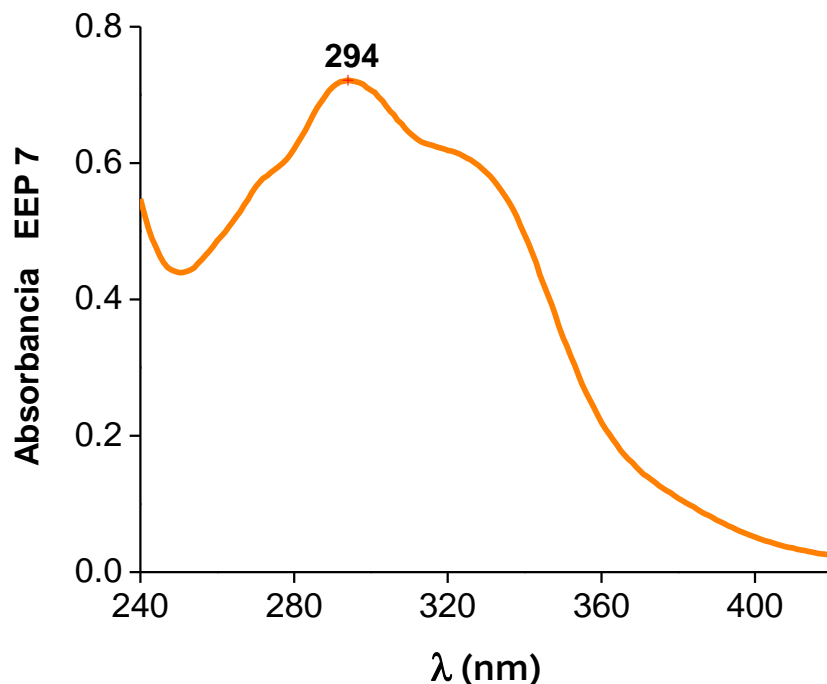


Figura 6. Espectro UV representativo obtenido para la muestra EEP 7. Se indica el máximo de absorbancia correspondiente.

Tabla 4. Absorbancia total de cada muestra a sus respectivos máximos en el UV.

Muestra	Absorbancia a λ máxima
EEP1	418
EEP2	156
EEP3	292
EEP4	1060*
EEP5	137
EEP6	154
EEP7	1414*
EEP8	364
EEP9	850*
EEP10	1080*

* Se destacan los extractos con alto contenido relativo en polifenoles.

A continuación se determinó el contenido relativo de polifenoles y flavonoides totales utilizando técnicas colorimétricas estandarizadas. El contenido de polifenoles se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, y ácido gálico como estándar para la curva de calibración, donde el producto coloreado formado se cuantifica a 760 nm. Por otro lado se determinó también el contenido relativo de flavonoides, los cuales en presencia de $AlCl_3$ forman un producto coloreado que absorbe a 425 nm. Para la curva de calibración se utilizaron concentraciones crecientes de quercetina. La concentración de polifenoles y flavonoides totales determinada para cada muestra de EEP se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de polifenoles y flavonoides totales en las muestras de propóleos ensayadas.

Muestra	[Polifenoles] (mg/g propóleos)	[Flavonoides]
EEP 1	85 ± 6	22 ± 2
EEP 2	44 ± 3	11 ± 2
EEP 3	44 ± 2	13 ± 1
EEP 4	141 ± 24*	45 ± 4*
EEP 5	35 ± 1	4 ± 1
EEP 6	33 ± 3	7 ± 1
EEP 7	176 ± 26*	54 ± 3*
EEP 8	75 ± 3	22 ± 3
EEP 9	128 ± 14*	35 ± 3*
EEP 10	146 ± 18*	41 ± 2*

* Se destacan los extractos con alto contenido relativo en polifenoles y flavonoides.

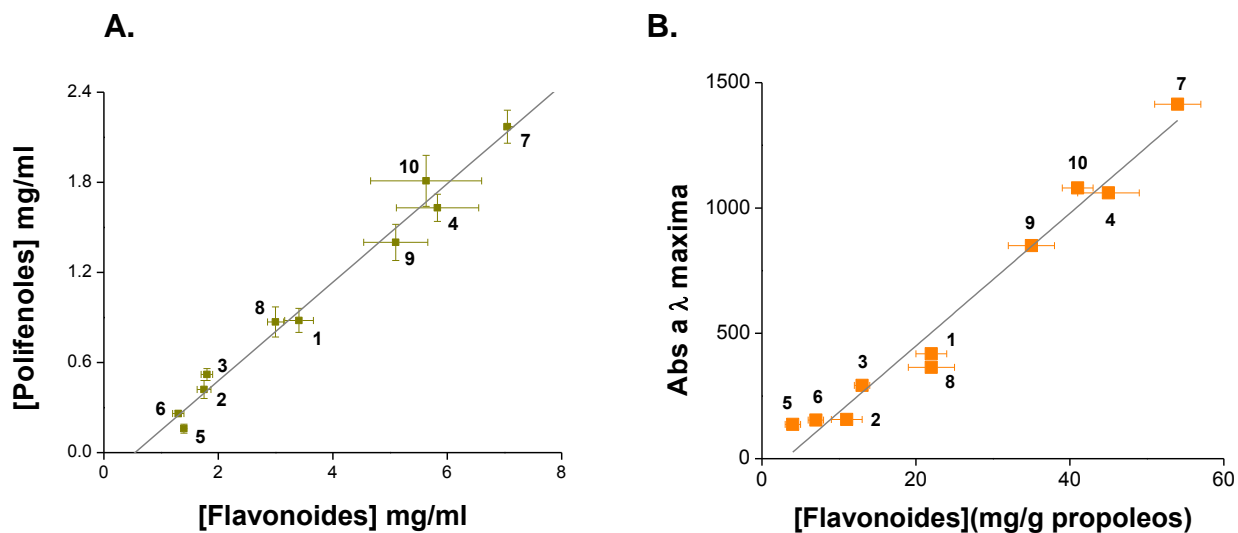
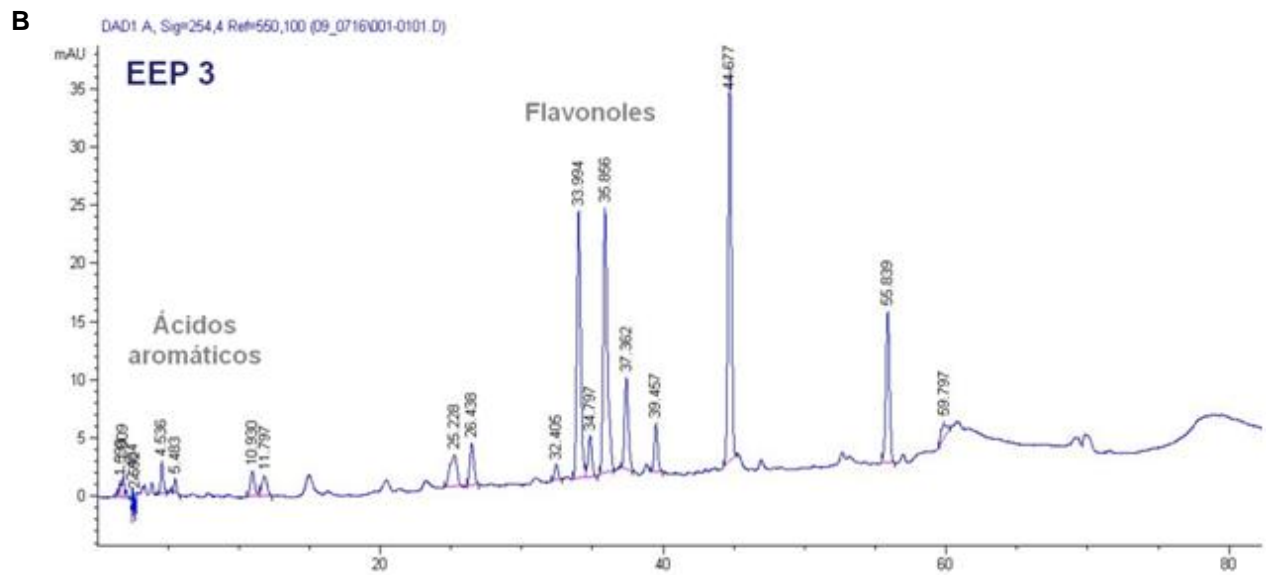
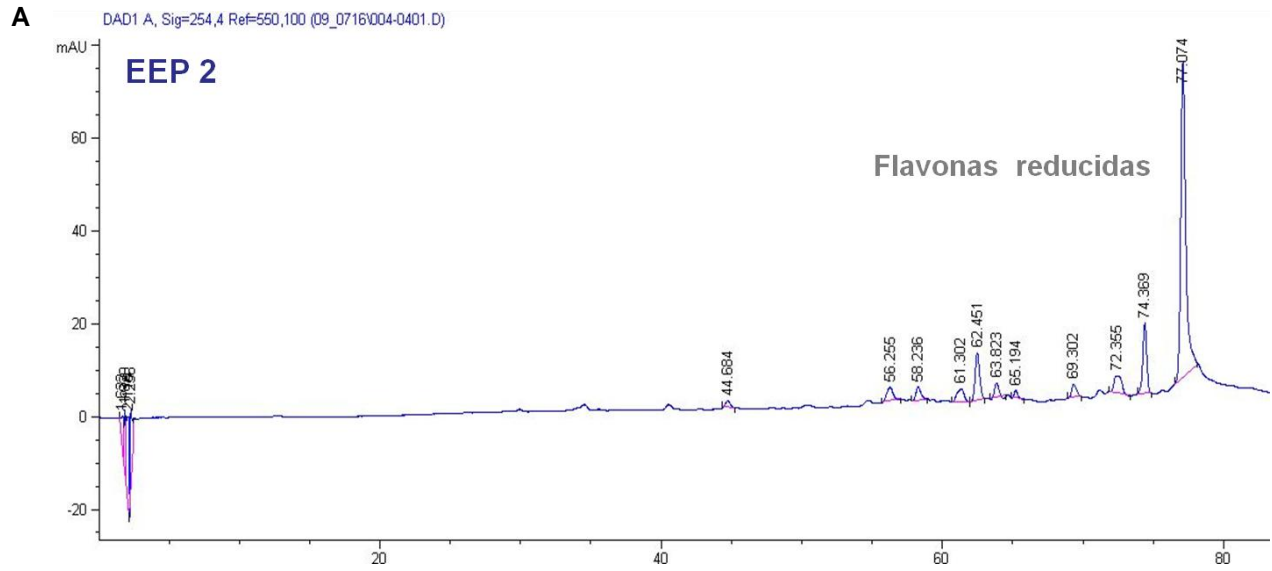


Figura 7. A. Relación entre la concentración de polifenoles y la de flavonoides para cada EEP. **B.** Relación entre la concentración de flavonoides y la absorbancia total del extracto a su máximo en el UV.

En la Figura 7A se observa que existe una correlación directa entre el contenido de polifenoles y flavonoides. Además puede concluirse que las muestras se distribuyen nuevamente en dos grupos, según el contenido de polifenoles y flavonoides sea alto o bajo. Esto concuerda con lo esperado según la tendencia observada en la Tabla 2. En la Figura 7B se observa que el contenido en polifenoles se correlaciona directamente con la absorbancia total determinada en la Tabla 4. *Por lo tanto puede concluirse que la determinación de la absorbancia máxima en el UV es un método efectivo, rápido y simple para estimar el contenido de polifenoles en extractos etanólicos de propóleos.*

Como se mencionó anteriormente, la naturaleza de los compuestos activos es variable entre los propóleos y depende de diferentes factores. De hecho los efectos biológicos de los diferentes propóleos, y productos naturales en general, dependen de la presencia de ciertos compuestos activos con propiedades particulares. Comúnmente estos compuestos pueden aislarse e identificarse específicamente por diferentes técnicas, siendo la más común el uso de HPLC de fase reversa. En este trabajo se realizó la separación por HPLC de fase reversa de los componentes presentes en diferentes muestras de EEP. En las Figuras 8A, B, C y D se muestran los cromatogramas obtenidos para las muestras 2, 3, 5 y 7 respectivamente. Los picos se asignaron a grupos de compuestos, considerando los tiempos de retención conocidos para los mismos en estas condiciones de corrida y resta una identificación específica de compuestos usando estándares individuales. De todos modos de los resultados obtenidos puede observarse que el perfil de distribución de compuestos es diferente entre las muestras ensayadas, salvo entre los extractos 2 y 5, cuyos cromatogramas son similares. En lo que respecta a la muestra 3 puede decirse que los componentes mayoritarios son flavonoles, mientras que la muestra 7 presenta un alto contenido en flavonas.



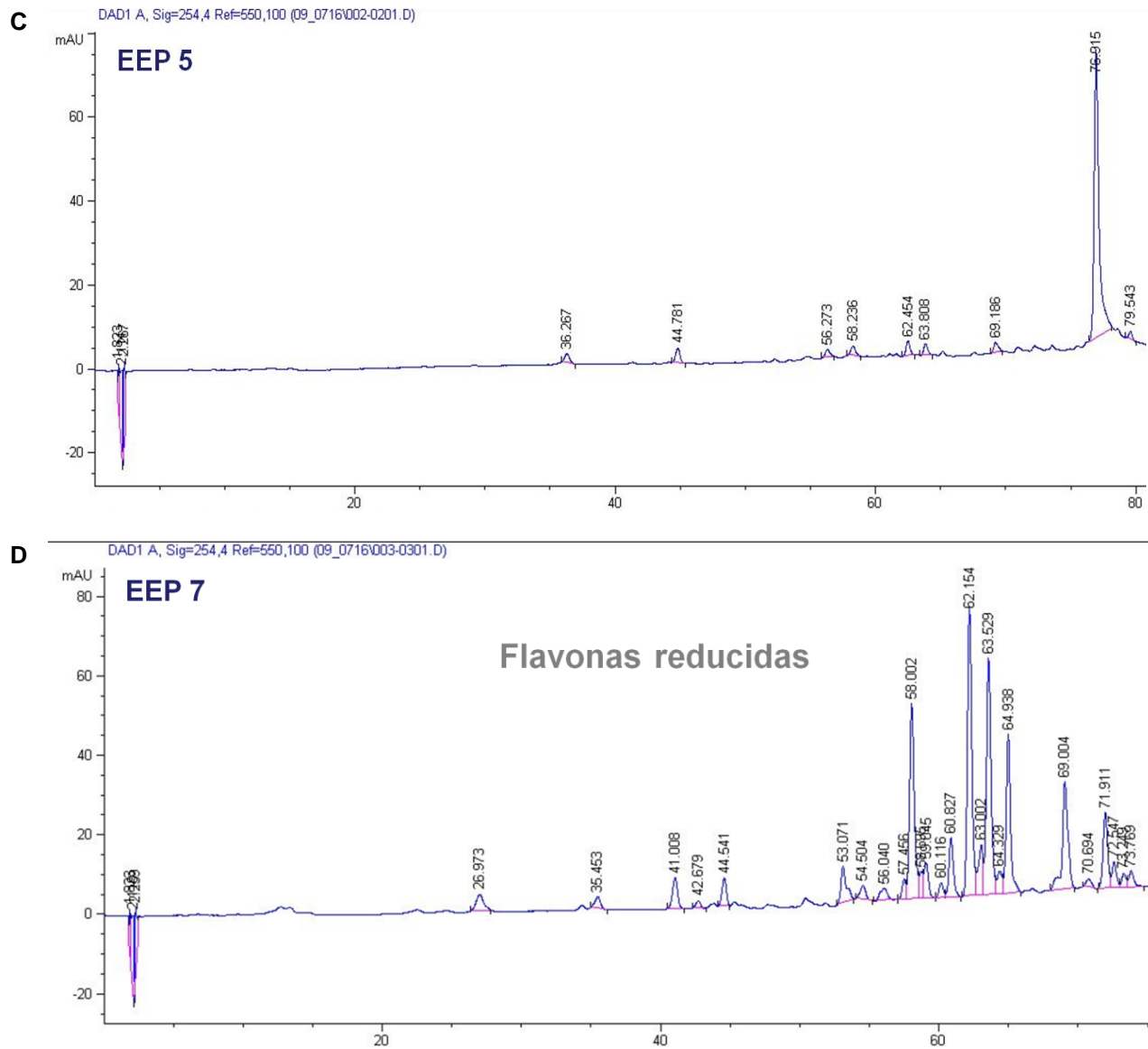


Figura 8. Cromatogramas de la separación por HPLC de fase reversa de los diferentes componentes presentes en muestras de EEP.

4.2. Capacidad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos

4.2.1. Ensayo ORAC

El ensayo ORAC es comúnmente usado como método de referencia a la hora de comparar la capacidad antioxidante de productos naturales. Esta técnica se basa en evaluar la protección que proporciona un antioxidante (XH) a una molécula blanco, en este caso fluoresceína (F), cuando es expuesta a una fuente de radicales oxidantes. Generalmente se utilizan radicales peroxilo (ROO•) producidos por la descomposición de un azo compuesto, como ser el 2, 2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP, Ec. 4-7). La oxidación de la fluoresceína se sigue por la pérdida de fluorescencia de la misma (bleaching) [90].



El ensayo se realizó mezclando fluoresceína con distintas concentraciones de EEP o Trolox (estándar de calibración). La mezcla se incubó a 37°C y luego se adicionó ABAP para iniciar la formación de radicales peroxilo. Se registró la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$) en cada pocillo durante 90 minutos. La protección de la oxidación de la fluoresceína por los EEP se muestra en la Figura 4. Se realizó una curva de calibración determinando el área bajo la curva (AUC) para cada concentración de estándar (Inserto Figura 9), a partir de la cual se obtuvieron los valores de concentración Trolox equivalente para cada condición de EEP ensayada. Luego se calculó el valor ORAC para cada muestra utilizando la ecuación 1 (Tabla 6).

En este caso se observa también que las muestras pueden dividirse en dos grupos, dependiendo de la capacidad antioxidante evaluada por el método ORAC. Además se observa que existe una buena correlación entre el índice ORAC y el

contenido total de polifenoles y flavonoides (Figura 10). Los antecedentes experimentales asocian de forma directa la capacidad antioxidante de los propóleos con el contenido de polifenoles totales [5] y, más aún, con el de flavonoides totales [91].

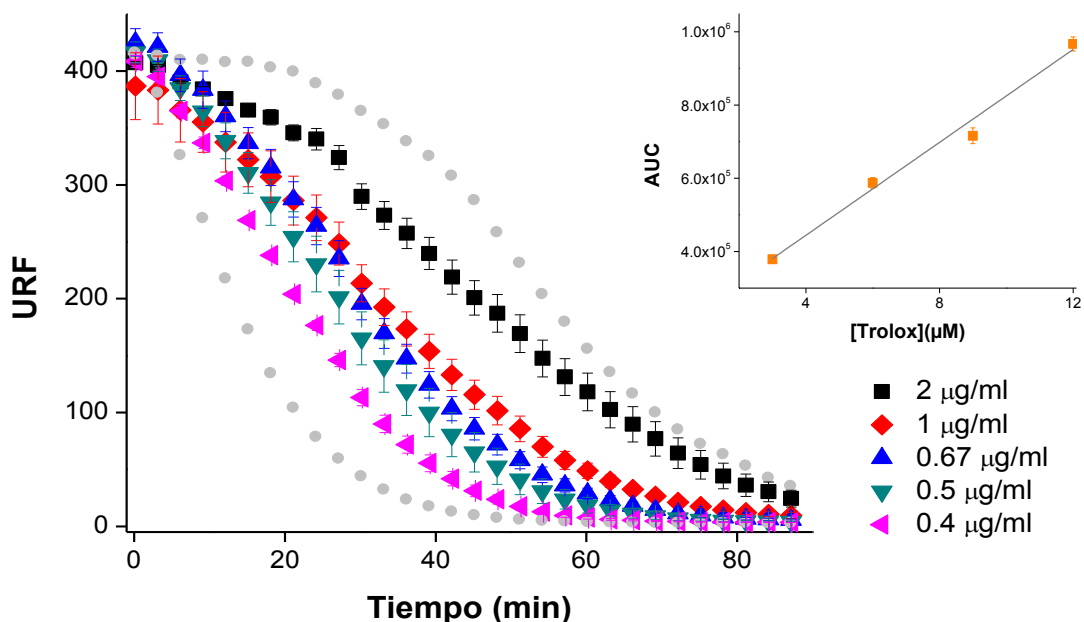


Figura 9. Ensayo ORAC. Gráfica representativa de la inhibición de la oxidación de fluoresceína por distintas concentraciones de EEP 7. Los símbolos grises representan la concentración máxima y mínima de Trolox. **Inserto.** Curva de calibración con Trolox.

Tabla 6. Valores ORAC calculados para cada muestra de propóleos.

EEP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valor ORAC (µmoles Trolox eq/mg propóleos)	2.5 ± 0.6	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.2	3.4 ± 0.8*	2.5 ± 0.3	2.4 ± 0.2	5.9 ± 0.8*	2.6 ± 0.4	6.1 ± 0.5*	5.0 ± 0.8*

*Se destacan los EEP con la mayor capacidad antioxidante.

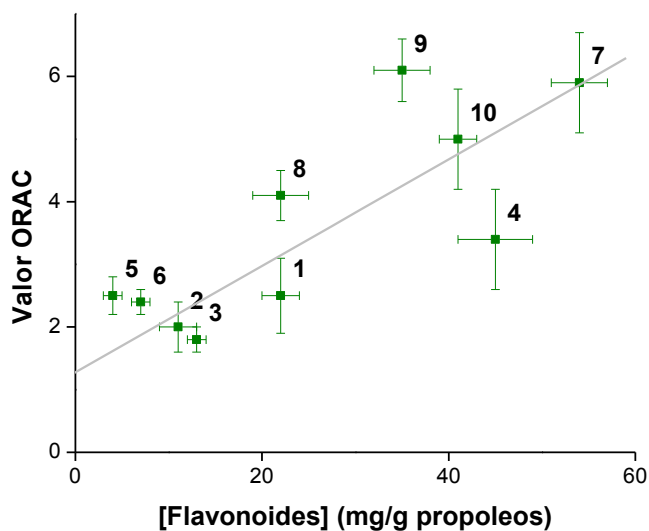


Figura 10. Relación entre el valor ORAC calculado para cada EEP y el contenido en flavonoides de los mismos.

4.2.2. Inhibición de la oxidación de LDL

La lipoproteína de baja densidad (LDL) es la responsable del transporte de colesterol en la sangre, la misma se compone de una fase lipídica y otra proteica (Figura 11). La oxidación de la LDL está asociada al desarrollo de varias patologías cardiovasculares, principalmente de arteriosclerosis [92], debido a una falla en la recaptación de la misma por las células, produciéndose así un aumento de colesterol en sangre. Se ha demostrado que un estado de estrés, desencadena la oxidación de la LDL y a su vez se ha visto que la suplementación con productos naturales ricos en polifenoles no sólo previene esta oxidación, sino que revierte el transcurso de la enfermedad [93].

En este trabajo se estudió el efecto de los EEP sobre la oxidación de LDL inducida por Cu^{2+} . Para ello se purificó LDL de plasma humano y se la incubó con diferentes concentraciones de las muestras de propóleos en presencia de Cu^{2+} a 37°C . Se siguió espectrofotométricamente a 234 nm la formación de enlaces dienos conjugados, productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la lipoproteína (Figura 12). La oxidación de LDL se caracteriza por presentar 2 fases

principales, una fase lag donde no se observa oxidación debido a la acción de los antioxidantes endógenos y una fase exponencial, donde se dispara la lipoperoxidación.

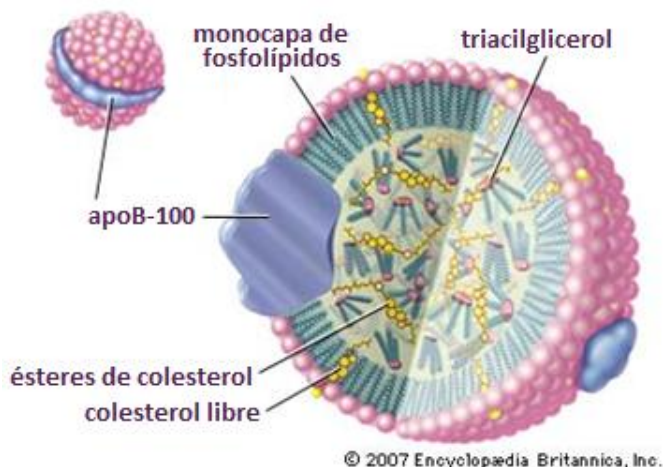


Figura 11. Esquema de la estructura de la lipoproteína de baja densidad LDL. La proteína está formada por la proteína apoB-100, unida a lípidos de diferente naturaleza. El colesterol es transportado en sangre en el interior de la LDL en forma de ésteres.

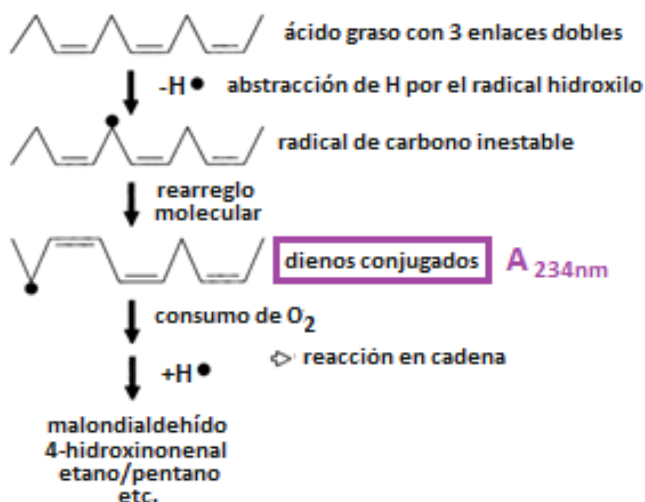


Figura 12. Esquema que representa los pasos de la lipoperoxidación y formación de dienos conjugados como productos de oxidación lipídica.

En las Figuras 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa cómo la presencia de EEP previene la oxidación de la LDL, ya sea prolongando la duración de la fase lag y/o disminuyendo la velocidad de la fase exponencial. Según el grado de inhibición de la oxidación de la LDL, las muestras se pueden ordenar: EEP4,

EEP10>>EEP7, EEP1>EEP2, EEP3, EEP9>EEP8. Aunque se obtuvieron resultados positivos para todas las muestras de propóleos ensayadas, se destaca la capacidad antioxidante de los EEP 4, 7 y 10. Esto además concuerda con los resultados obtenidos sobre el contenido en componentes antioxidantes (polifenoles y flavonoides totales).

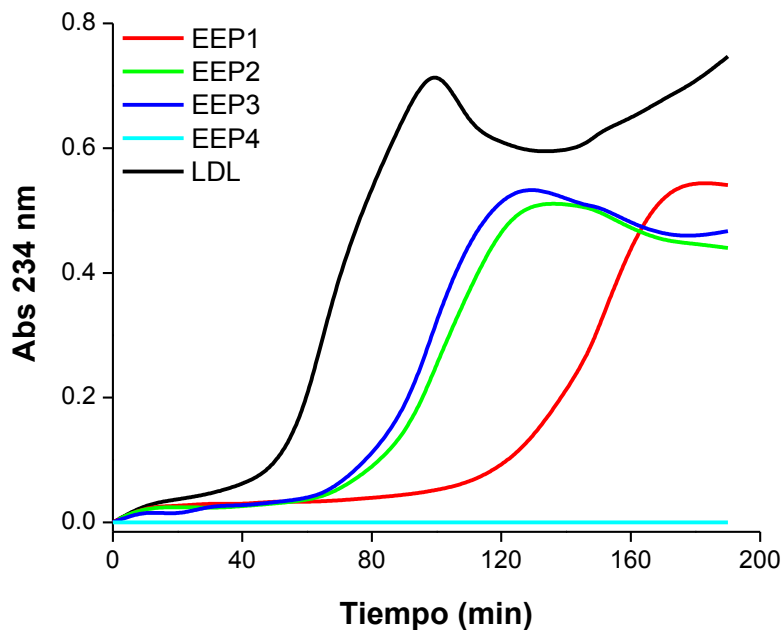


Figura 13. Perfil de oxidación de la LDL en ausencia (negro) y presencia de las distintas muestras de propóleos a una concentración de 0.67 µg/ml.

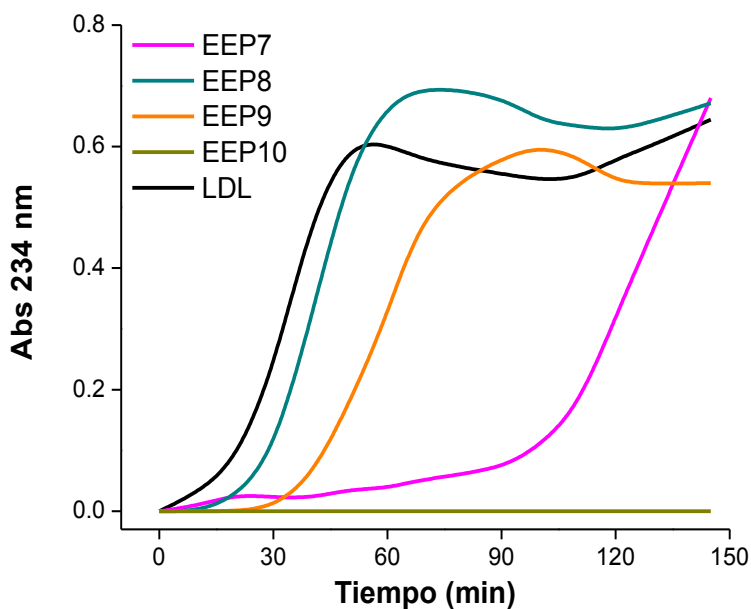
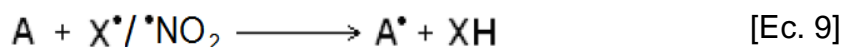
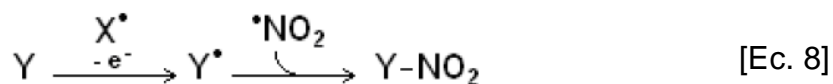


Figura 14. Perfil de oxidación de la LDL en ausencia (negro) y presencia de las distintas muestras de propóleos a una concentración de 0.4 µg/ml.

4.2.3. Inhibición de la nitración de tirosinas

La nitración de tirosinas (Y) es una modificación postraduccional de proteínas que ocurre ocasionalmente *in vivo*, principalmente en condiciones patológicas como ser la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y procesos de inflamación. Esta modificación puede alterar o inactivar completamente ciertas enzimas, así como intervenir en cascadas de señalización celular. Los compuestos biológicos nitrantes son especies derivadas del $\cdot\text{NO}$, principalmente el peroxinitrito. La nitración es un proceso oxidativo radicalar en el cual el ácido peroxinitroso (ONOOH), sufre ruptura homolítica formando los radicales dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) e hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), responsables de la nitración de tirosina (Ec. 8).



Los compuestos antioxidantes en general pueden interferir con el proceso de nitración a diferentes niveles: a través de la interacción directa con el peroxinitrito, o con sus radicales derivados (Ec. 10) o con el radical tirosilo (Y^\cdot) impidiendo su nitración y formando nuevamente tirosina (Ec. 9). De esta manera la intervención de compuestos antioxidantes puede prevenir la formación de productos de oxidación proteicos, previniendo el daño celular y el desarrollo o avance de las patologías asociadas.

Para evaluar la capacidad de los propóleos uruguayos de prevenir esta modificación oxidativa *in vitro*, se trató a la tirosina con diferentes concentraciones de EEP y se agregó peroxinitrito como oxidante. Los productos de reacción (NO_2Y y Y) se separaron por HPLC de fase reversa en un gradiente de acetonitrilo/TFA/ H_2O y se identificaron por comparación con los respectivos estándares. En la Figura 15 se muestra un cromatograma representativo de los resultados obtenidos para los EEP ensayados, donde puede observarse que la presencia de EEP previene la formación de NO_2Y de manera dependiente de la concentración.

Si se compara el efecto de distintas muestras de EEP, se observa que la inhibición de la formación de NO_2Y varía según la muestra tenga un alto contenido en polifenoles y flavonoides (EEP 4) o un bajo contenido (EEP 1, por ejemplo). Por lo tanto, se concluye *que existe una correlación directa entre la capacidad antioxidante y la cantidad de componentes activos* (Figura 16).

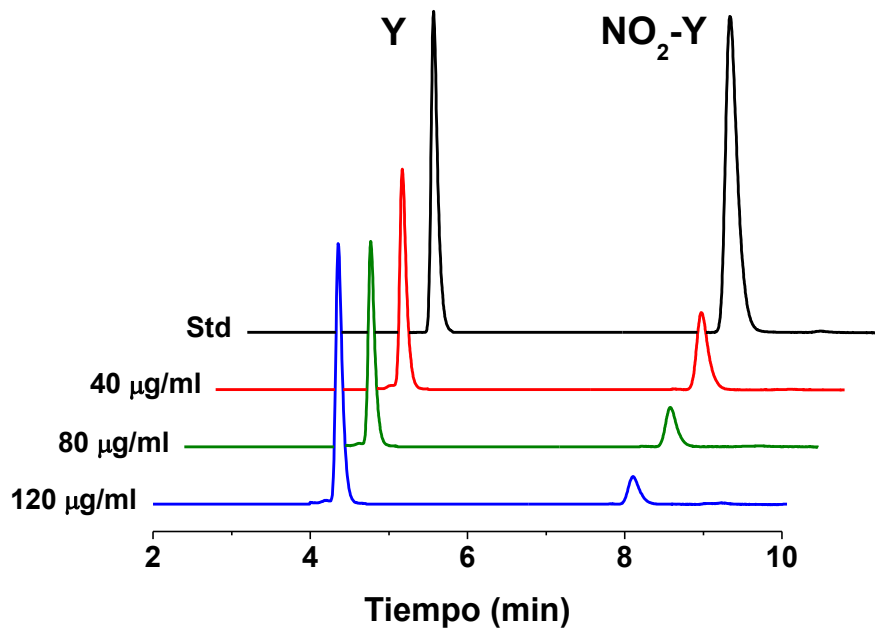


Figura 15. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC de la mezcla de reacción tirosina y peroxinitrito, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de EEP 4.

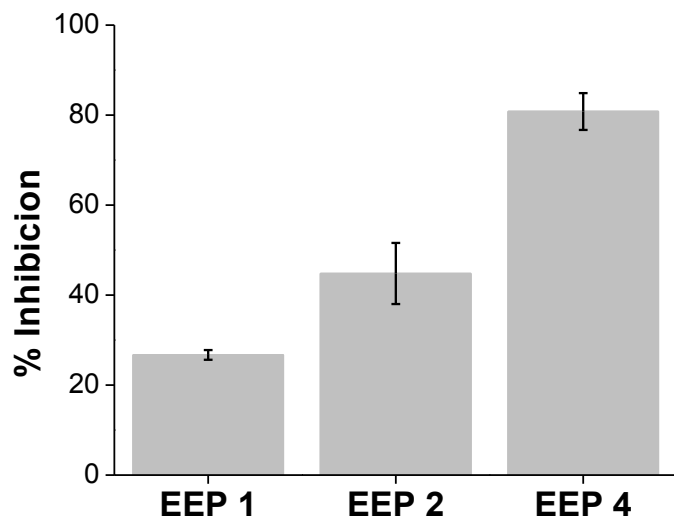


Figura 16. Inhibición de la formación de nitrotirosina por distintos EEP de concentración 120 µg/ml.

4.3. Efectos celulares de extractos etanólicos de propóleos

4.3.1. Efecto en la expresión de la óxido nítrico sintasa

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es responsable de la síntesis de $\bullet\text{NO}$ en los sistemas biológicos. Existen 3 isoformas de la enzima, dos de expresión constitutiva y presentes mayoritariamente en tejido endotelial (eNOS o NOS3) y neuronal (nNOS o NOS1) y una de expresión inducible, presente mayoritariamente en macrófagos y neutrófilos (iNOS o NOS2). El $\bullet\text{NO}$ tiene importantes funciones biológicas, relacionadas también a la localización de las NOS, entre las que se destacan, vasodilatación, transmisión sináptica y respuesta inmune. A nivel endotelial el $\bullet\text{NO}$ es importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular, regulando la presión sanguínea, la agregación plaquetaria, y otros mecanismos de señalización. La producción de $\bullet\text{NO}$ puede ser regulada a nivel de la actividad enzimática o en la expresión génica de la enzima, regulando de esta manera la biodisponibilidad del $\bullet\text{NO}$. Se ha reportado que el tratamiento de células endoteliales con polifenoles derivados de productos naturales produce un aumento en la producción de $\bullet\text{NO}$ y en la expresión de la enzima NOS [94-95]. Estos efectos demuestran que los antioxidantes naturales ejercen funciones a nivel de señalización celular y no constituyen únicamente compuestos reductores capaces de atrapar especies oxidantes.

Para evaluar el efecto a nivel celular de los propóleos uruguayos se trataron células endoteliales de aorta bovina (BAEC) con distintas concentraciones de EEP. Luego de la incubación, las células se trataron para un ensayo de western blot con el objetivo de evaluar y comparar la expresión de la enzima eNOS. En la Figura 17 se muestra el resultado obtenido para el extracto 9, donde puede observarse que existe una significativa inducción en la expresión de la enzima por efecto del propóleos.

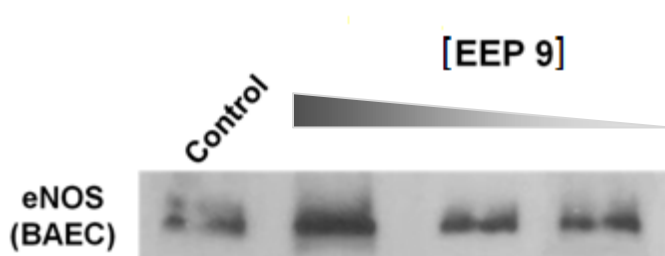


Figura 17. Western blot para la enzima óxido nítrico sintasa endotelial de BAEC. Se ensayaron concentraciones de EEP 9 equivalentes a 5.3, 4 y 3.2 mg/ml respectivamente. Se sembró la misma cantidad de proteína en cada carril.

4.3.2. Actividad citotóxica en células de carcinoma de colon humano

La capacidad de diferentes polifenoles, entre ellos flavonoides, como agentes antitumorales ha sido demostrada ampliamente [21]. En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de diferentes EEP sobre cultivos de células de adenocarcinoma de colon humano HT-29. Para ello se expuso a las células a concentraciones crecientes de EEP durante 72h. Se eligieron tres extractos a ensayar, EEP 2, 7 y 9, con el objetivo de comparar el efecto citotóxico con el contenido en componentes activos. Se realizaron controles para evaluar el efecto del solvente con etanol a la mayor concentración ensayada y un control de citotoxicidad positivo con dimetilsulfóxido (DMSO). Los resultados se muestran en la Figura 18, expresados como viabilidad celular relativa en función de la concentración de EEP. Los resultados obtenidos se relativizaron con respecto al control de solvente, el cual no presentó toxicidad celular a la concentración ensayada (Figura 19).

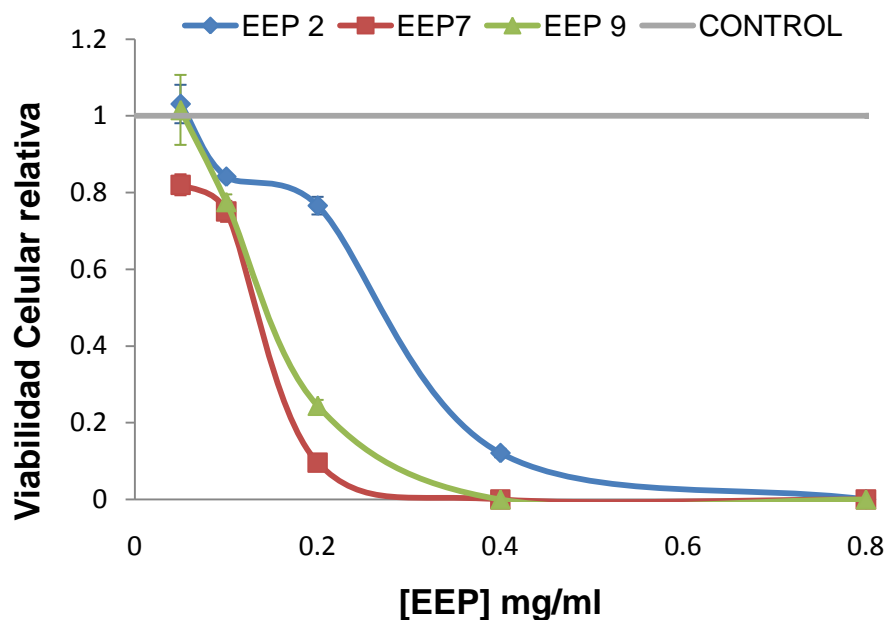


Figura 18. Viabilidad de células HT-29 tratadas con diferentes concentraciones de propóleos. Los resultados obtenidos se relativizaron con respecto al control.

La citotoxicidad de los extractos sobre las células se evidencia por disminución de la viabilidad celular con respecto al control, determinada por formación del producto de metabolización de WST-1. En las Figura 18 y 19 se observa que la presencia de los propóleos inhibe la proliferación celular. En la Figura 19 se muestran fotografías representativas de los cultivos celulares y las diferentes condiciones a los que fueron sometidos, dónde se ve claramente el efecto citotóxico de los propóleos, el cual aumenta con la concentración de los mismos.

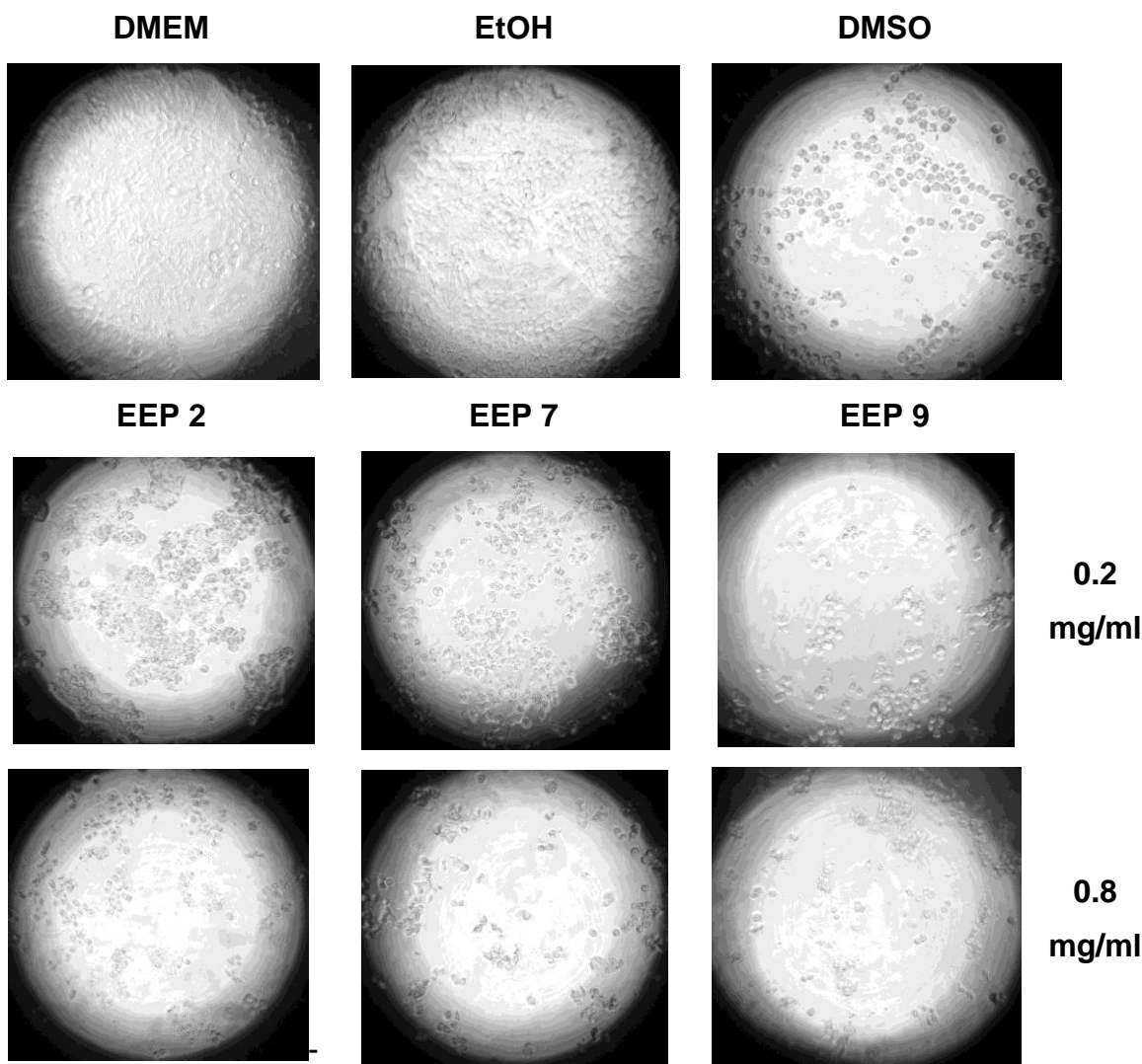


Figura 19. Vista microscópica (100x) de los cultivos celulares HT-29 en distintas condiciones de incubación con EEP. Se muestran los controles celulares con medio de cultivo, solvente de EEP y citotoxicidad por DMSO.

Los resultados muestran que si bien todos los EEP mostraron una actividad citotóxica importante, se destacan aquellos extractos con mayor contenido en polifenoles (EEP 7 y 9). Entre los EEP ensayados el número 7 fue el único que demostró tener un efecto a la menor concentración ensayada, mientras que a mayores concentraciones el resultado no se diferencia del EEP 9.

En la Tabla 7 se muestran los valores de IC_{50} , donde puede verse que los extractos 7 y 9 poseen valores comparables entre sí y presentan el mayor efecto citotóxico. En conclusión puede decirse que *la capacidad citotóxica sobre este tipo celular tumoral depende no solo de la concentración de propóleos, sino que está directamente relacionada a la concentración de polifenoles presente en el producto*. Cabe destacar que estos experimentos carecen de un control de citotoxicidad sobre células normales para validar este efecto como una potencial actividad antitumoral específica. Estos controles se están comenzando a realizar en cultivos de fibroblastos, en colaboración con el Lic. Martín Masner (Lab. Fisicoquímica Biológica).

Tabla 7. Citotoxicidad (IC_{50}) de EEP sobre células HT-29.

Muestra	IC_{50}
EEP 2	0.27 mg/ml
EEP 7	0.13 mg/ml
EEP 9	0.14 mg/ml

5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La cantidad de trabajos relacionados a la capacidad antioxidante de productos naturales ha aumentado significativamente en la última década debido a su relación con los beneficios a la salud del consumo de frutas y verduras ampliamente reconocidos. Los antioxidantes naturales son generalmente multifuncionales en los alimentos y en los sistemas biológicos. Se han desarrollado una gran variedad de protocolos para la evaluación de la capacidad antioxidante de productos naturales, que utilizan diferentes sistemas generadores de radicales, diferentes métodos de inducir oxidación y de determinar los puntos finales de la misma [96-97]. Desafortunadamente no existe un único método que contemple todas las vías de acción de un antioxidante, o permita la identificación de los blancos biológicos a partir de un ensayo *in vitro*. De hecho, muchas veces los resultados obtenidos por diferentes metodologías pueden ser variables y confusos. La actividad y mecanismos de acción de antioxidantes naturales complejos, es afectada por muchos factores, incluyendo el sistema utilizado, las propiedades de reparto del antioxidante entre diferentes fases e interfases, y el estado físico de las sustancia. Por estas razones, los protocolos de análisis de antioxidantes deben diseñarse con mucho cuidado, basándose en la especificidad del método analítico usado para seguir el progreso de la oxidación y eligiéndose puntos finales apropiados relevantes a la protección de alimentos contra la oxidación.

La selección de compuestos de referencia válidos, para comparar la actividad antioxidante *in vitro* es otro punto a considerar. En este sentido, la evaluación de la capacidad antioxidante debe llevarse a cabo en diferentes condiciones de oxidación, utilizando varios métodos para medir diferentes productos de oxidación. Tal es la controversia generada en este sentido que la revista “Food and Chemical Toxicology”, publicó en 2003 un artículo donde se detallan los requerimientos básicos para publicar un artículo que documente la capacidad antioxidante, antimutagénica y/o anticancerígena de una sustancia, tanto *in vitro* como *in vivo* [98].

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de propóleos uruguayos como parámetro de calidad. Se utilizaron diferentes aproximaciones metodológicas con el objetivo de abarcar diferentes mecanismos de acción posibles y

moléculas blanco. El método ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), originalmente desarrollado por Glazer [99], y posteriormente modificado por Ou [100], se utiliza para determinar la actividad antioxidante contra especies reactivas del oxígeno (ROS) en medio acuoso. El ensayo ORAC ha sido ampliamente utilizado en la literatura para evaluar la capacidad atrapadora de radicales libres de plasma humano, proteínas, ADN, antioxidantes aislados y extractos de productos naturales (ref. en [101]). Este método resulta conveniente y posee numerosas ventajas sobre otros métodos como FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ya que involucra radicales peróxido, de los más abundantes en sistemas biológicos [102], y la determinación del AUC resulta superior a aquellos ensayos que utilizan, ya sea un porcentaje de inhibición a un tiempo fijo, o un período de tiempo de inhibición a un porcentaje inhibitorio fijo (por ejemplo una fase lag) [101]. El método ORAC considera el tiempo y el grado de inhibición de la oxidación del blanco por estos radicales debido a la presencia de los antioxidantes [103]. Se está tendiendo a usar este método ORAC para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y productos naturales, lo cual ayudaría enormemente a comparar los distintos productos antioxidantes con este índice.

Las muestras de propóleos analizadas en este trabajo pueden separarse en dos grupos dependiendo del contenido en polifenoles y flavonoides, lo que se refleja directamente en la capacidad antioxidante de los mismos. Los propóleos 4, 7, 9 y 10 se despegan del resto de las muestras en lo que respecta a las características mencionadas. Además, se debe destacar que los resultados obtenidos en el ensayo ORAC indican que los propóleos uruguayos en general poseen una actividad significativamente mayor a otros productos naturales con propiedades antioxidantes reconocidas, con valores ORAC 150 veces mayor que para vino tinto [102] y 500 veces mayor que para miel [104]. Por la bibliografía recopilada, se esperaba un contenido en flavonoides y polifenoles totales similar al de las muestras de propóleos del tipo “europeo” y superior al del tipo “brasileño”. Sin embargo, los valores obtenidos resultaron ser intermedios entre ambos, probablemente relacionado a la mezcla de flora autóctona e importada que prevalece en nuestro territorio, entre otros factores. De todos modos la concentración de componentes bioactivos de varios de los propóleos

ensayados mostró ser superior a algunos propóleos de la región [91, 105], así como superior al vino tinto [102] y la miel [104]. Se concluye por lo tanto, que la calidad de los polifenoles presentes en los propóleos, reflejada en su capacidad de atrapar radicales peroxilo, es mejor que en mieles y vinos tintos.

En cuanto a la composición específica de polifenoles y flavonoides de los propóleos uruguayos, puede observarse que el perfil cromatográfico del extracto 7, que presenta una gran abundancia y variedad de compuestos, es muy diferente al obtenido para el resto de las muestras. Las muestras 2 y 5 tienen perfiles similares, lo que se refleja también en la concentración de polifenoles y flavonoides y en los valores ORAC obtenidos para las mismas. Si bien la muestra 3 parece tener una variabilidad significativa en sus componentes, la naturaleza química de los mismos difiere de la muestra 7. Por lo tanto, aunque se trata de resultados preliminares, se podría estimar que para el extracto 7 la capacidad antioxidante destacada se deba a la presencia de flavonoides tipo flavonas, que están ausentes o a muy baja concentración en los otros extractos ensayados. Por ahora, la capacidad antioxidante no puede atribuirse a algún compuesto en particular, ya que no todas las muestras fueron analizadas por HPLC. Sería interesante analizar la composición del resto de las muestras de propóleos y poder identificar algún o algunos flavonoides particularmente activos como antioxidantes, o incluso identificar algún nuevo flavonoide como componente de propóleos, que pueda aportarle un valor agregado adicional al mismo.

El ensayo de oxidación de LDL permite evaluar dos características de los antioxidantes al mismo tiempo, ya que por un lado permite evaluar la capacidad del producto de actuar en una fase lipídica/hidrofóbica y por otro representa una potencial aplicación biológica, por la relación de la oxidación de LDL y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [92]. Los flavonoides pueden retrasar o inhibir la oxidación de la LDL de diferentes maneras: (i) interviniendo tanto en la fase de iniciación como en la fase de propagación de reacciones en cadena oxidativas de lípidos; (ii) quelando iones metálicos pro-oxidantes, como hierro y cobre; (iii) reciclando otros antioxidantes como el α -tocoferol; (vi) preservando la actividad paraoxonasa asociada a HDL; y/o (vii) inhibiendo enzimas celulares involucradas en la oxidación de LDL mediada por células, como ser la fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipooxigenasa,

GSH reductasa, xantino oxidasa y NADPH oxidasa (referencias en [106]). En este trabajo hemos demostrado que todos los propóleos ensayados previenen la oxidación de LDL inducida por Cu^{2+} , destacándose la capacidad antioxidante de aquellas muestras con mayor contenido en polifenoles y flavonoides. La relevancia de los ensayos de oxidación de LDL *in vitro* es discutible, debido principalmente a las concentraciones de Cu^{2+} utilizadas, significativamente mayores a las fisiológicas. Si bien se ha sugerido que la oxidación de LDL determinada por estos métodos puede no reflejar la oxidación *in vivo*, es demostrado que el aumento en el consumo de productos naturales ricos en flavonoides o de ciertos polifenoles en particular, está asociado a una disminución en el riesgo de enfermedades cardiovasculares en general [107-108], previene el avance de la arteriosclerosis en particular [109] y vuelven a la LDL plasmática más resistente a la oxidación [110].

Otra de las aproximaciones metodológicas utilizadas en este trabajo para evaluar la capacidad antioxidante de los propóleos, fue la inhibición de formación de 3-nitrotirosina. La nitración de tirosinas proteicas es una modificación postraduccional, producida como consecuencia de eventos oxidativos a nivel celular y se la ha asociado con diferentes enfermedades [111-113]. Una de las rutas principales de formación de nitrotirosina *in vivo* implica al peroxinitrito, el cual se produce en condiciones fisiológicas en el medio intracelular y extracelular [114]. En condiciones de estrés oxidativo, en donde las concentraciones de compuestos prooxidantes, como el peroxinitrito, se ve aumentada, es importante contar con elementos que permitan contrarrestar los efectos deletéreos causados a macromoléculas biológicas críticas como ser proteínas y/o enzimas. En este sentido, hemos demostrado que los propóleos uruguayos ensayados poseen la capacidad de inhibir la formación de nitrotirosina inducida por peroxinitrito de manera dependiente de la concentración de EEP. El hecho de que aquellos propóleos con alto contenido en polifenoles hayan mostrado la mayor capacidad inhibitoria, confirma la relación directa que existe entre la capacidad antioxidante y la presencia de estos compuestos. En un estudio reciente que compara diferentes productos naturales de China, se observó que el propóleos fue el producto con mayor capacidad, no solo de inhibir la formación de nitrotirosina, sino también de inhibir la oxidación de LDL y la fragmentación de ADN inducidas por peroxinitrito [115].

Últimamente los antioxidantes naturales han recibido especial atención por la capacidad de desencadenar una respuesta celular mediada por vías de señalización, que derivan en una respuesta antioxidante dependiente de la activación de ciertos genes y en consecuencia por la acción de enzimas y proteínas específicas [116]. Tal es el caso de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El óxido nítrico es el producto de síntesis de la eNOS y responsable de llevar a cabo una variedad de funciones fisiológicas en el endotelio de gran importancia. Entre éstas se encuentran, relajación vascular, inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de proliferación de células de músculo liso e inhibición de adhesión leucocitaria. Es de conocimiento popular que el consumo de vino tinto está relacionado a la prevención y retroceso de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y la arteriosclerosis [116-117]. Tal efecto se debe a los polifenoles y flavonoides presentes en el vino, y uno de los posibles mecanismos de acción está relacionado a su capacidad de regular la actividad de la eNOS de diversas maneras, ya sea activándola directa o indirectamente y/o aumentando la expresión génica de la misma [95, 118-119], hasta se ha observado que ciertos mecanismos son dependientes de la estructura química del compuesto [120]. Este efecto se ha demostrado para otros productos naturales, como el chocolate [121] y extractos de propóleos brasileros [122]. En nuestro trabajo el EEP 9 mostró ser un potente inductor de la expresión de la enzima eNOS, aparentemente de una manera dependiente de la concentración. Debemos mencionar que los resultados obtenidos en cuanto a la relación entre expresión de eNOS y concentración de extracto fueron algo confusos, no habiéndose obtenido la misma dosis-respuesta para otros extractos ensayados. Este tipo de efecto podría deberse a que la inducción de la enzima se debe a un compuesto polifenólico en particular, y por lo tanto un extracto con baja concentración general de polifenoles pero con gran preponderancia de esos polifenoles podría disparar la respuesta celular con la misma potencia que un extracto con alta concentración general de polifenoles. Un análisis en profundidad de la composición química de los extractos ayudaría a identificar los compuestos con directa acción sobre la expresión de esta enzima.

Actualmente se está evaluando el efecto de los propóleos uruguayos en la actividad y expresión de otra enzima del metabolismo redox, la NADPH oxidasa (Nox). Esta enzima representa una de las principales fuentes de radical superóxido a nivel celular y su desregulación se ha relacionado a varias patologías [123-124]. Estos experimentos podrían explicar en mayor profundidad el mecanismo de acción y los efectos beneficiosos ya comprobados del propóleos. En la literatura se encuentran varios trabajos en donde se destaca el efecto de polifenoles presentes en productos naturales sobre la Nox [125-128]. Un mecanismo posible supone que una disminución en la producción de superóxido y a su vez un aumento en la producción de óxido nítrico, disminuya la cantidad de peroxinitrito disponible para desencadenar efectos oxidativos deletéreos. Estos experimentos se están llevando a cabo en colaboración con el Dr. Francisco Laurindo del Laboratorio de Biología Vasculare de la Universidad de San Pablo.

Finalmente, se evaluó la potencial actividad anticancerígena de los propóleos. Dado que los propóleos son productos comestibles, es particularmente interesante evaluar la citotoxicidad de los mismos en células cancerígenas de origen gastrointestinal. Además, el cáncer de colon es el tercero más frecuente en el mundo y causa unas 500.000 muertes anuales. En la evaluación del efecto citotóxico de los propóleos uruguayos en células de adenocarcinoma de colon, nuevamente se observó una correlación con el contenido total de polifenoles entre las muestras. Si bien a la mayor concentración ensayada todos los extractos tuvieron un efecto citotóxico, la muestra 7 fue la única que mostró actividad a concentraciones bajas. Los valores de IC_{50} obtenidos para los propóleos uruguayos en células HT-29 (130 $\mu\text{g/ml}$ para el EE 7), resultaron significativamente mayores que para propóleos de China (19 $\mu\text{g/ml}$) y Brasil (39 $\mu\text{g/ml}$) [129], aunque comparables a los de origen griego (92.5 $\mu\text{g/ml}$) [67]. Si bien es necesario realizar un control de citotoxicidad en células normales, vale la pena mencionar que en el estudio de los propóleos griegos el valor de IC_{50} (242 $\mu\text{g/ml}$) para las líneas de fibroblastos normales (DSF9 y DSF60) utilizadas como control, fue mayor que el obtenido para los extractos 7 y 9, pero comparable al del extracto 2. Por lo tanto, los propóleos con mayor contenido en flavonoides son potencialmente una herramienta eficiente y segura para el tratamiento del cáncer. En lo que respecta al mecanismo de

acción antiproliferativo de los propóleos y demás productos naturales, depende del tipo de cáncer y principalmente de la naturaleza química de los compuestos activos presentes en los mismos [67, 129].

Uno de los problemas que se presenta al tratar proyectar la actividad antioxidante de estos compuestos fenólicos observada *in vitro*, a la actividad a desarrollar *in vivo*, es la biodisponibilidad limitada de estos compuestos. La mayoría de los estudios en humanos han examinado el metabolismo de flavonoides individuales, ingeridos a dosis farmacológicas, más que a niveles de consumo normales en la dieta (23-170 mg/día). Los humanos raramente consumen flavonoides individualmente, debido a la vasta distribución de los mismos en los alimentos, lo que hace difícil la extrapolación de los resultados. Los flavonoides en general son transformados durante su absorción y alcanzan el plasma predominantemente como metabolitos secundarios, las moléculas incambiadas se encuentran a muy bajas concentraciones. Sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo su carácter anfótero y la capacidad de formar puentes de hidrógeno vía grupos OH, son capaces de interaccionar con la superficie de membranas y macromoléculas biológicas como la LDL y albumina sérica, facilitando su transporte y mecanismos de acción [130].

En el presente trabajo se ha demostrado que los propóleos uruguayos son una importante fuente de compuestos antioxidantes, con capacidad no sólo de atrapar directamente radicales libres, sino con gran potencial de inhibir la oxidación lipídica, proteica y además desencadenar eventos de señalización redox a nivel celular, con consecuencias beneficiosas. Esperamos que los resultados hallados promuevan el estudio de los propóleos uruguayos y de algunas de sus posibles aplicaciones, así como contribuir al valor agregado de un producto local

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Naito, Y., et al., *Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema*. *Phytother Res*, 2007. **21**(5): p. 452-6.
2. Vynograd, N., I. Vynograd, and Z. Sosnowski, *A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV)*. *Phytomedicine*, 2000. **7**(1): p. 1-6.
3. Aso, K., et al., *Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937*. *Biol Pharm Bull*, 2004. **27**(5): p. 727-30.
4. Isla, M.I., et al., *Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(4): p. 1166-72.
5. Ahn, M., et al., *Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China*. *Food Chemistry*, 2007. **101**: p. 1383 - 1392.
6. Caillas, A., *Propóleos*, in "*Propóleos: Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización con fines Terapéuticos*", C.P.d.T.y.E. Apícolas, Editor. 1975, Apimondia: Bucarest, Rumania. p. 5 - 7.
7. Cañas, S., *Els Productes del Rusc*. *Mètode*, 2002(33): p. 51 - 55.
8. Ghisalberti, E.L., *Propolis: a review*. *Bee World*, 1979. **60**: p. 59 - 84.
9. Maidana, J.F. *Características fisicoquímicas de los propóleos de la República Argentina*. in *Apiacta*. 2001.
10. Neves Marques, A., *Apicultura en Marcha*. 1989, Florianópolis: Gráfica Editora Dehon Ltda. 231 - 234.
11. Nikolaev, A.B., *Defensa de la ciudad de las abejas*, in "*Propóleos: Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización con fines Terapéuticos*", C.P.d.T.y.E. Apícolas, Editor. 1975, Apimondia: Bucarest, Rumania. p. 8-9.
12. Bedascarrabure, E., et al., *Propóleos*. 2006, San Martín de Tucumán, Tucumán, Argentina: Ediciones Magna.
13. Krell, R., *Value-added products from beekeeping*, ed. FAO. Vol. 124. 1996. 153 - 186.
14. Cheng, P.C. and G. Wong, *Honey bee propolis: prospects in medicine*. *Bee World*, 1996. **77**(1): p. 8 - 15.
15. Markham, K.R., et al., *HPLC y GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis*. *Phytochemistry*, 1996. **42**(1): p. 205 - 211.
16. Stângaciu, S., *A guide to composition & properties of propolis*. 1997, Constanta, Rumania: Dao Publishing House.
17. Fujimoto, T., J. Nakamura, and M. Matsuka, *Diversity of propolis. Part 1. Propolis from the world*. *Honeybee Science*, 2001. **22**: p. 9 - 16.
18. Bonvehí, J.S. and F.V. Coll, *Study on propolis quality from China and Uruguay*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2000. **55c**: p. 778 - 784.
19. Kumazawa, S., et al., *Studies of the constituents of Uruguayan propolis*. *J Agric Food Chem*, 2002. **50**(17): p. 4777-82.
20. Park, Y.K., et al., *Comparação das características físico químicas das própolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul: evidência fitoquímica de sua origem botânica*, in *Apacame. Mensagem Doce*. 2001.
21. Banskota, A., Y. Tezuka, and S. Kadota, *Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis*. *Phytother. Res.*, 2001. **15**: p. 561-571.
22. Burdock, G.A., *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*. *Food Chem Toxicol*, 1998. **36**(4): p. 347-63.
23. Ozcan, M. and A. Ayar, *Effect of propolis extracts on butter stability*. *J. Food Quality*, 2003. **26**: p. 65-73.
24. McKibben, J. and N.J. Engeseth, *Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey*. *J Agric Food Chem*, 2002. **50**(3): p. 592-5.
25. Kujumgiev, A., et al., *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. *J Ethnopharmacol*, 1999. **64**(3): p. 235-40.
26. El-Bassuony, A. and S. AbouZid, *A new prenylated flavanoid with antibacterial activity from propolis collected in Egypt*. *Nat Prod Commun*, 2010. **5**(1): p. 43-5.

27. Marcucci, M.C., *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. Apidologie, 1995. **26**(2): p. 83 - 100.
28. Uzel, A., et al., *Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples*. Microbiol Res, 2005. **160**(2): p. 189-95.
29. Grange, J.M. and R.W. Davey, *Antibacterial properties of propolis (bee glue)*. J R Soc Med, 1990. **83**(3): p. 159-60.
30. Lavie, P., *Características del propóleos*, in *Propóleos: Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización con fines Terapéuticos*, C.P.d.T.y.E. Apícolas, Editor. 1975, Apimondia: Bucarest, Rumania. p. 35 - 42.
31. Mirzoeva, O.K., R.N. Grishanin, and P.C. Calder, *Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria*. Microbiol Res, 1997. **152**(3): p. 239-46.
32. Gatto, M.T., et al., *Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(2): p. 269-72.
33. Takaisi-Kikuni, N.B. and H. Schilcher, *Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance*. Planta Med, 1994. **60**(3): p. 222-7.
34. Amoros, M., et al., *Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate*. J Nat Prod, 1994. **57**(5): p. 644-7.
35. Serkedjieva, J. and N. Manolova, *Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids)*. Journal of Natural Products, 1992. **55**(3): p. 294 - 7.
36. Gekker, G., et al., *Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures*. J Ethnopharmacol, 2005. **102**(2): p. 158-63.
37. Higashi, K.O. and S.L. de Castro, *Propolis extracts are effective against Trypanosoma cruzi and have an impact on its interaction with host cells*. J Ethnopharmacol, 1994. **43**(2): p. 149-55.
38. Murad, J.M., et al., *Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against Paracoccidioides brasiliensis*. J Ethnopharmacol, 2002. **79**(3): p. 331-4.
39. Borges-Walmsley, M.I., et al., *The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol, 2002. **10**(2): p. 80-7.
40. Hu, F., et al., *Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models*. J Ethnopharmacol, 2005. **100**(3): p. 276-83.
41. Park, E.H. and J.H. Kahng, *Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis*. Arch Pharm Res, 1999. **22**(6): p. 554-8.
42. Song, Y.S., et al., *Inhibition of angiogenesis by propolis*. Arch Pharm Res, 2002. **25**(4): p. 500-4.
43. Borrelli, F., et al., *Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract*. Fitoterapia, 2002. **73 Suppl 1**: p. S53-63.
44. Song, Y.S., et al., *Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity*. Cancer Lett, 2002. **175**(1): p. 53-61.
45. Natarajan, K., et al., *Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9090-5.
46. Marquez, N., et al., *Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 993-1001.
47. Rossi, A., et al., *The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis*. Fitoterapia, 2002. **73 Suppl 1**: p. S30-7.
48. Mirzoeva, O.K. and P.C. Calder, *The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1996. **55**(6): p. 441-9.
49. Sa-Nunes, A., L.H. Faccioli, and J.M. Sforcin, *Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production*. J Ethnopharmacol, 2003. **87**(1): p. 93-7.
50. Ansorge, S., D. Reinhold, and U. Lendeckel, *Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells*. Z Naturforsch [C], 2003. **58**(7-8): p. 580-9.
51. Dantas, A.P., et al., *Treatment of Trypanosoma cruzi-infected mice with propolis promotes changes in the immune response*. J Ethnopharmacol, 2006. **103**(2): p. 187-93.

52. Fischer, G., et al., *Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. Vaccine*, 2007. **25**(7): p. 1250-6.
53. Chu, W.H., *Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated Aeromonas hydrophila in carp (Carassius auratus gibelio)*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006. **21**(1): p. 113-7.
54. Bhadauria, M., S.K. Nirala, and S. Shukla, *Duration-dependent hepatoprotective effects of propolis extract against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats*. *Adv Ther*, 2007. **24**(5): p. 1136-45.
55. Shukla, S., M. Bhadauria, and A. Jadon, *Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity*. *Indian J Exp Biol*, 2004. **42**(10): p. 993-7.
56. Turkez, H., M.I. Yousef, and F. Geyikoglu, *Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver*. *Food Chem Toxicol*, 2010.
57. Bhadauria, M., S.K. Nirala, and S. Shukla, *Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride*. *Mol Cell Biochem*, 2007. **302**(1-2): p. 215-24.
58. Seo, K.W., et al., *The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism*. *Phytother Res*, 2003. **17**(3): p. 250-3.
59. El-Khatib, A.S., et al., *Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo*. *Z Naturforsch [C]*, 2002. **57**(3-4): p. 379-85.
60. Lahouel, M., et al., *[The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration]*. *Pathol Biol (Paris)*, 2004. **52**(6): p. 314-22.
61. Sforcin, J.M., R. Kaneno, and S.R.C. Funari, *ABSENCE OF SEASONAL EFFECT ON THE IMMUNOMODULATORY ACTION OF BRAZILIAN PROPOLIS ON NATURAL KILLER ACTIVITY*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2002. **8**(1).
62. Rao, C.V., et al., *Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon*. *Cancer Res*, 1993. **53**(18): p. 4182-8.
63. Shimizu, K., et al., *Artepillin C in Brazilian propolis induces G(0)/G(1) arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells*. *Mol Carcinog*, 2005. **44**(4): p. 293-9.
64. Mahmoud, N.N., et al., *Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(5): p. 921-7.
65. Kimoto, T., et al., *Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C*. *Virchows Arch*, 2001. **438**(3): p. 259-70.
66. Lee, Y.J., et al., *Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells*. *Cancer Lett*, 2000. **153**(1-2): p. 51-6.
67. Pratsinis, H., et al., *Antiproliferative activity of Greek propolis*. *J Med Food*, 2010. **13**(2): p. 286-90.
68. Kuo, H.C., et al., *Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo*. *Cancer Lett*, 2006. **234**(2): p. 199-208.
69. Rao, C.V., et al., *Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate*. *Cancer Res*, 1995. **55**(11): p. 2310-5.
70. Huang, M.T., et al., *Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(4): p. 761-5.
71. Su, Z.Z., et al., *Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells*. *Anticancer Res*, 1995. **15**(5B): p. 1841-8.
72. Na, H.K., et al., *Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line*. *Cancer Lett*, 2000. **157**(1): p. 31-8.
73. Liao, H.F., et al., *Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(27): p. 7907-12.
74. Mishima, S., et al., *Two related cinnamic Acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice*. *Biol Pharm Bull*, 2005. **28**(6): p. 1025-30.
75. Fierro, W., *El propóleos, un producto con destacable capacidad antioxidante*. *Antioxidantes y calidad de vida*, 2001. **7**(33): p. 5-11.

76. Marcucci, M.C., *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. *Apidologie*, 1995. **26**: p. 83-99.
77. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. Vol. 269. 1999: Oxford Science Publications.
78. Sies, H., ed. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. ed. A. Press. 1991, Harcourt Brace Jovanovich: Londres.
79. Frei, B., *Natural antioxidants in human health and disease*. 1994: Academic Press.
80. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. 1991: Academic Press.
81. Hansen, J.M., Y.M. Go, and D.P. Jones, *Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006. **46**: p. 215-34.
82. van den Berg, R., et al., *Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress*. *Br J Nutr*, 2001. **86 Suppl 1**: p. S121-7.
83. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui, *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*. *Free Radic Biol Med*, 1994. **16**(6): p. 845-50.
84. Hertog, M.G., et al., *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. *Lancet*, 1993. **342**(8878): p. 1007-11.
85. Engelhart, M.J., et al., *Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease*. *Jama*, 2002. **287**(24): p. 3223-9.
86. Popova, M., et al., *Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis*. *Phytochemical Analysis*, 2004. **15**: p. 235.
87. Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay*. *J. Agric. Food Chem.*, 2004. **52**: p. 48.
88. Möller, M., et al., *Membrane "lens" effect: Focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the NO/O₂ reaction*. *Chem. Res. Toxicol.*, 2007. **En prensa**.
89. Trostchansky, A., et al., *Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **395**(2): p. 225-32.
90. Cao, G., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **14**(3): p. 303-11.
91. Mendes da Silva, J.F., et al., *Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities*. *Food Chemistry*, 2006. **99**: p. 431 - 435.
92. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
93. Raederstorff, D., *Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review*. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2009. **79**(3): p. 152-165.
94. SALL DIALLO, A., et al., *Cognac Polyphenolic Compounds Increase Bradykinin-Induced Nitric Oxide Production in Endothelial Cells*. *Physiol. Res.*, 2008. **57**: p. 885-892.
95. Leikert, J.F., et al., *Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells*. *Circulation*, 2002. **106**(13): p. 1614-7.
96. Antolovich, M., et al., *Methods for testing antioxidant activity*. *Analyst*, 2002. **127**(1): p. 183-98.
97. Frankel, E.N. and J.W. Finley, *How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(13): p. 4901-8.
98. Verhagen, H., et al., *The 10 basic requirements for a scientific paper reporting antioxidant, antimutagenic or anticarcinogenic potential of test substances in in vitro experiments and animal studies in vivo*. *Food Chem Toxicol*, 2003. **41**(5): p. 603-10.
99. Glazer, A.N., *Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine*. *FASEB J*, 1988. **2**(9): p. 2487-91.
100. Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(10): p. 4619-26.
101. Prior, R.L. and G. Cao, *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(11-12): p. 1173-81.
102. Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(1): p. 48-54.
103. Cao, G., et al., *Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II*. *Clin Chem*, 1995. **41**(12 Pt 1): p. 1738-44.

104. Gheldof, N. and N.J. Engeseth, *Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(10): p. 3050-5.
105. Isla, M.I., et al., *Antioxidant activity of Argentine propolis extracts*. J Ethnopharmacol, 2001. **76**(2): p. 165-70.
106. Lapointe, A., C. Couillard, and S. Lemieux, *Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(10): p. 645-58.
107. Lagiou, P., et al., *Intake of specific flavonoid classes and coronary heart disease--a case-control study in Greece*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(12): p. 1643-8.
108. Huxley, R.R. and H.A. Neil, *The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Eur J Clin Nutr, 2003. **57**(8): p. 904-8.
109. Napoli, C., et al., *Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis*. Heart Vessels, 2008. **23**(2): p. 124-33.
110. Lourenco, C.F., et al., *LDL isolated from plasma-loaded red wine procyanidins resist lipid oxidation and tocopherol depletion*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(10): p. 3798-804.
111. Haddad, I.Y., et al., *Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2407-13.
112. Gomez-Fernandez, P., et al., *[Vascular damage in chronic renal failure. The increase of vascular nitrotyrosine and cytochromes accumulation is accompanied by an increase of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression]*. Nefrologia, 2005. **25**(2): p. 155-62.
113. Kaur, H. and B. Halliwell, *Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients*. FEBS Lett, 1994. **350**(1): p. 9-12.
114. Boveris, A., L. Valdez, and S. Alvarez, *Inhibition by wine polyphenols of peroxy-nitrite-initiated chemiluminescence and NADH oxidation*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **957**: p. 90-102.
115. Luo, Y., et al., *Evaluation of the Protective Effects of Chinese Herbs against Biomolecule Damage Induced by Peroxynitrite*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74**(7): p. 1350-4.
116. Dell'Agli, M., A. Busciala, and E. Bosisio, *Vascular effects of wine polyphenols*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(4): p. 593-602.
117. Dohadwala, M.M. and J.A. Vita, *Grapes and cardiovascular disease*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1788S-93S.
118. Leblais, V., et al., *Relaxation induced by red wine polyphenolic compounds in rat pulmonary arteries: lack of inhibition by NO-synthase inhibitor*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(1): p. 25-35.
119. Gresele, P., et al., *Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1602-8.
120. Auger, C., et al., *The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(1): p. 162-7.
121. Karim, M., K. McCormick, and C.T. Kappagoda, *Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation*. J Nutr, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2105S-8S.
122. Paulino, N., et al., *Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea in-vitro*. J Pharm Pharmacol, 2002. **54**(6): p. 845-52.
123. Carluccio, M.A., et al., *Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2344-54.
124. Lassegue, B. and K.K. Griendling, *NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 653-61.
125. Feillet-Coudray, C., et al., *Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems*. Free Rad. Biol. Med., 2009. **46**: p. 624-632.
126. Castilla, P., et al., *Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 1053-61.

127. Davalos, A., et al., *Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells*. Br J Nutr, 2009. **102**(8): p. 1125-35.
128. Sarr, M., et al., *Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(4): p. 794-802.
129. Ishihara, M., et al., *Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines*. Oncol Rep, 2009. **22**(2): p. 349-54.
130. Cook, N. and S. Samman, *Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. Nutr. Biochem., 1996. **7**: p. 66-76.

GRACIAS

Especialmente a Ana y a Matías, por darme la oportunidad de formar parte de este laboratorio en donde pude crecer, aprender, desarrollarme como estudiante, científica, docente, y brindarme las herramientas para superarme como persona.

A todos mis compañeros de largas jornadas de trabajo, a los que están desde siempre y a los que fueron llegando en el camino. Porque fueron como una segunda familia: escuchando, aconsejando, amenizando...y soportando la conclusión de esta etapa. Gracias a Bea, Daniel, Ernesto, Flor, Gaby, Gefe, Inés, Leo, Laura, Laia, Lucía, Magela, Maggie, Majo, Martín, Seba, Patricia y Wilson. De todos me llevo buenos recuerdos y grandes amigos.

A mis padres que me enseñaron a perseguir lo que quiero y conseguir mis objetivos, a toda mi familia: mis hermanas, mis abuelos, mis tías, mis primos, y a mis amigas. Todos me apoyaron siempre en cada etapa de mi carrera.

A Javi, que en este mismo camino me sumó un nuevo título, que poco tiene que ver con la ciencia. A mi esposo, gracias por el apoyo, la compañía, el entusiasmo, la inspiración y el amor de siempre.