

# MODULACIÓN DE LA NADPH OXIDASA FAGOCÍTICA POR ÁCIDO NITROARAQUIDÓNICO

Tesis de Doctorado de  
Lucía González Perilli

Orientador: Dr. Andrés Trostchansky

Co-orientador: Dr. Homero Rubbo

Centro de Investigación Biomédica (CEINBIO), Departamento  
de Bioquímica, Facultad de Medicina, Uruguay

Tesis de Doctorado en Química  
Facultad de Química- PEDECIBA Química

2016

# INDICE

INDICE .....	1
1 RESUMEN .....	3
ABREVIACIONES: .....	5
2 INTRODUCCIÓN .....	6
2.1 Inflamación .....	6
2.1.1 Producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en macrófagos .....	6
2.1.2 Metabolismo del Ácido Araquidónico .....	10
2.2 NADPH oxidasa .....	13
2.2.1 NADPH oxidasa fagocítica en macrófagos .....	14
2.2.2 Activación y ensamblaje del complejo enzimático NOX2 .....	16
2.2.3 Producción de $O_2^{\bullet-}$ por NOX2 .....	18
2.2.4 Importancia fisiológica de la NOX2 .....	20
2.3 Proteína Disulfuro Isomerasa .....	21
2.3.1 Estructura y Función de PDI .....	21
2.3.2 Rol de la enzima PDI en la actividad NOX .....	24
2.4 Ácidos grasos nitrados .....	25
2.4.2 Propiedades biológicas del $NO_2AA$ .....	27
2.4.3 Rol terapéutico del $NO_2AA$ .....	29
3 HIPOTESIS .....	31
4 OBJETIVOS .....	32
4.1 Objetivo general .....	32
4.2 Objetivos específicos .....	32
5 Materiales y Métodos .....	33
5.1 Evaluación de los efectos del $NO_2AA$ sobre la actividad NADPH oxidasa fagocítica (NOX2). .....	34

5.2	Determinación del mecanismo de acción del NO <sub>2</sub> AA sobre la inhibición de NOX2.....	42
5.3	Análisis de la interacción entre el NO <sub>2</sub> AA y la PDI.....	45
5.4	Estudio del efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la PDI en macrófagos y su relación con la actividad NOX2 .....	50
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1	Evaluación de los efectos del NO <sub>2</sub> AA sobre la actividad NADPH oxidasa fagocítica (NOX2) .....	52
6.1.1	Efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la actividad NOX2 en macrófagos.....	52
6.1.2	Efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la actividad NOX2 en neutrófilos.....	59
6.1.3	Efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la funcionalidad del macrófago .....	60
6.1.4	Estudio de la inhibición de NOX2 por NO <sub>2</sub> AA <i>in vivo</i> . .....	64
6.2	Determinación del mecanismo de acción del NO <sub>2</sub> AA sobre la NOX2.....	65
6.3	Análisis de la interacción entre el NO <sub>2</sub> AA y la PDI.....	71
6.3.1	Purificación de la PDI recombinante .....	72
6.3.2	Estudio de actividad PDI en presencia de NO <sub>2</sub> AA .....	73
6.3.3	Rol del •NO liberado por NO <sub>2</sub> AA en la inhibición de la actividad PDI.....	77
6.3.4	Modificación covalente de la PDI por NO <sub>2</sub> AA.....	78
6.4	Estudio el efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la PDI en macrófagos y su relación con la actividad NOX2 .....	87
6.4.1	Efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la expresión de la PDI en macrófagos ....	87
6.4.2	Efecto del NO <sub>2</sub> AA sobre la distribución de PDI en los macrófagos activados.....	88
6.4.3	Efecto de la inhibición de PDI en actividad NOX2.....	94
7	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	96
8	AGRADECIMIENTOS .....	100
9	REFERENCIAS.....	102
10	PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES.....	120

## 1 RESUMEN

El derivado nitrado del ácido araquidónico (AA), el ácido nitroaraquidónico (NO<sub>2</sub>AA) presenta actividades antiinflamatorias celulares durante la activación de los macrófagos. Sin embargo, se sabe poco acerca de la capacidad del NO<sub>2</sub>AA para regular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en condiciones proinflamatorias. Una de las respuestas inmediatas tras la activación de macrófagos implica la producción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) por la enzima NADPH oxidasa fagocítica (NOX2). Como el AA es capaz de activar a la NOX2, proponemos que NO<sub>2</sub>AA puede modular la activación de los macrófagos mediante al inhibir la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por NOX2. Cuando los macrófagos se activaron en presencia de NO<sub>2</sub>AA, se observó una inhibición significativa de la actividad NOX2 evaluadas por la reducción de citocromo c, la luminiscencia de luminol, la fluorescencia del Amplex Red y por citometría de flujo. Este proceso también se produce en el fagosoma, sin afectar la viabilidad celular ni la fagocitosis. El NO<sub>2</sub>AA disminuyó la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de forma dependiente de la dosis y del tiempo de incubación siendo un efecto reversible. La inhibición observada no fue debida a una disminución de la fosforilación de las subunidades citosólicas (p40<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup>). Sin embargo, se observó una reducción de la migración a la membrana de p47<sup>phox</sup> lo que implica la prevención del correcto montaje de la enzima activa en la membrana. Los efectos observados *in vitro* se comprobaron en un modelo inflamatorio agudo *in vivo* mediado por tioglicolato, donde la inyección subcutánea de NO<sub>2</sub>AA fue capaz de disminuir la actividad NOX2 en los macrófagos de ratones tratados, confirmando los efectos observados en los estudios celulares. Trabajos recientes indican la participación de la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) en la activación de NOX2. Creemos que el NO<sub>2</sub>AA podría afectar directamente a la PDI provocando la inhibición de la actividad NOX2. El NO<sub>2</sub>AA inhibió las actividades tanto reductasa como chaperona de la PDI de forma dependiente de la dosis y del tiempo de incubación siendo independiente del •NO liberado por el NO<sub>2</sub>AA. Como los nitroalquenos son potentes electrófilos y la PDI tiene residuos de cisteína críticos para su actividad, podría formarse un aducto covalente reversible entre NO<sub>2</sub>AA y PDI. Hemos demostrado la modificación covalente reversible de PDI por NO<sub>2</sub>AA en residuos de cisteínas usando el ensayo de PEG-switch, así como LC-MS/MS, determinando la modificación de residuos de cisteína del sitio activo de

PDI. Además, los estudios de microscopía confocal demostraron que el pretratamiento con NO<sub>2</sub>AA en macrófagos activados con PMA presenta un cambio en la distribución intracelular de PDI así como cambios en la estructura de actina. El inhibidor de PDI Tiomuscimol presentó un efecto similar al nitroalqueno tanto en la distribución de PDI como en la inhibición de NOX2, lo que indica que la inhibición de NOX2 por NO<sub>2</sub>AA puede ser debido a la inhibición de la PDI. Asimismo, la colocalización de p47<sup>phox</sup> con PDI se vio disminuida en presencia del NO<sub>2</sub>AA, pudiendo afectar la función de PDI sobre la actividad NOX2. En resumen, nuestros resultados implican que las modificaciones covalentes por NO<sub>2</sub>AA en PDI podrían afectar la función moduladora de PDI en la NOX2, evitando su interacción con p47<sup>phox</sup> y su migración a la membrana, necesarios para la activación de la NOX2.

## ABREVIACIONES:

AA, ácido araquidónico; NO<sub>2</sub>AA, ácido nitroaraquidónico; ROS, especies reactivas del oxígeno; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; •NO, óxido nítrico; NOX2, NADPH oxidasa 2 o fagocítica; PDI, Proteína disulfuro isomerasa; TLR, Receptores tipo Toll; IL-1, Interleuquina- 1; TNF-α, factor de necrosis tumoral- α; RNS, especies reactivas del nitrógeno; PKC, Proteína Quinasa C; SOD, superóxido dismutasa; ONOO<sup>-</sup> + ONOOH, peroxinitrito; EDRF, factor de relajación derivado del endotelio; NOS, Óxido Nítrico Sintasa; nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; NOS2 o iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; LPS, Lipopolisacarido bacteriano; NF-κB, factor nuclear κB; •NO<sub>2</sub>, dióxido de nitrógeno; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrito; LOX, lipoxigenasa; LTs, leucotrienos; HETEs, ácidos hidroxieicosatetraenoicos; PGHS, prostaglandina endoperóxido H sintasa; PGG<sub>2</sub>, Prostaglandina G<sub>2</sub>; PGH<sub>2</sub>, Prostaglandina H<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub>, Prostaglandina F<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub>, Tromboxano A<sub>2</sub>; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol bifosfato; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol; RE, Retículo endoplasmático; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>; PMA, acetato de forbol miristato; PX, Phox homology; SH3, Src homology 3; PRR, región rica en prolina; AIR, región inhibitoria; AD, dominio de activación de p67<sup>phox</sup>; TPR, tetratricopeptide repeat; PKB, Proteína Quinasa B; GEFs, factores intercambiadores de nucleótidos de guanina; GAPs, GTPase-Activating Proteins; EGC, Enfermedad granulomatosa crónica; PUFAs, ácidos grasos poliinsaturados; HNO<sub>2</sub>, ácido nitroso; NO<sub>2</sub>-FA, ácidos grasos nitrados; HO-1, hemo oxigenasa-1; GCs, guanilato ciclasa soluble; AINEs, anti-inflamatorios no esteroideos; ANG II, angiotensina-II; ELA, Esclerosis Lateral Amiotrófica; MS, espectrometría de masa; LC, cromatografía líquida; MeOH, metanol; ATCC, American Type Culture Collection; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SBF, Suero bovino fetal; WT, wild type; ZOP, Zimosan opsonizado; dPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; PBS, Phosphate-Buffered Saline; DMSO, dimetil sulfóxido; fMLP, N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina; Cit c, citocromo c; DPI, difeniliodonio; MTT, (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; IP, Ioduro de propidio; H<sub>2</sub>DCF, 5,7-dihidroxiclorofluoresceína; DCF, diclorofluoresceína; OxyB, Fc-OxyBURST; FITC, fluoresceína; FITC-beads, partículas o beads conjugadas con fluoresceína; SDS-PAGE, electroforesis de poliacrilamida con SDS; BSA, seroalbúmina bovina; Zym-FITC, zimosan conjugado con FITC; DTT, Ditiotreitól; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; AO, Ácido oleico; GFP, Green Fluorescence Protein; DTNB, disulfuro 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico); NEM, N-etilmaleimida; BME, β-mercaptoetanol; PEG-5000, metoxipolietilenglicol maleimida; Tiom, tiomuscimol.

## **2 INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Inflamación**

La inflamación es una respuesta inespecífica frente a irritación, lesiones y/o infecciones. La respuesta inflamatoria ocurre en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino [1, 2]. Los síntomas de la inflamación se caracterizan por dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de función que resulta de la dilatación de los vasos sanguíneos que conducen a un incremento del suministro de sangre y del aumento de los espacios intercelulares que resulta en el movimiento de los leucocitos, proteínas y fluidos a la zona de inflamación [2-4].

Los macrófagos son elementos claves para el inicio del proceso inflamatorio, actuando en la primera línea de defensa mediante la detección de agentes infecciosos a través de receptores de membrana, iniciando vías de señalización que llevan a una amplia variedad de respuestas celulares [3]. Estos receptores reconocen un amplio rango de patrones moleculares foráneos a los organismos mamíferos pero comunes entre los patógenos. Estos incluyen varios receptores inespecíficos “scavenger” (barrenderos) y receptores tipo Toll (TLR) [5, 6]. Los ligandos de unión a receptores TLR provocan la producción de mediadores inflamatorios, como por ejemplo las citoquinas interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [7], que desencadenan los procesos inflamatorios así como el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS).

#### **2.1.1 Producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en macrófagos**

Los macrófagos, junto a los neutrófilos y otras células fagocíticas son componentes claves en las respuestas microbicidas y tumorocidas debido a su capacidad para producir ROS y RNS, en particular el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) y sus derivados [8] [9-13].

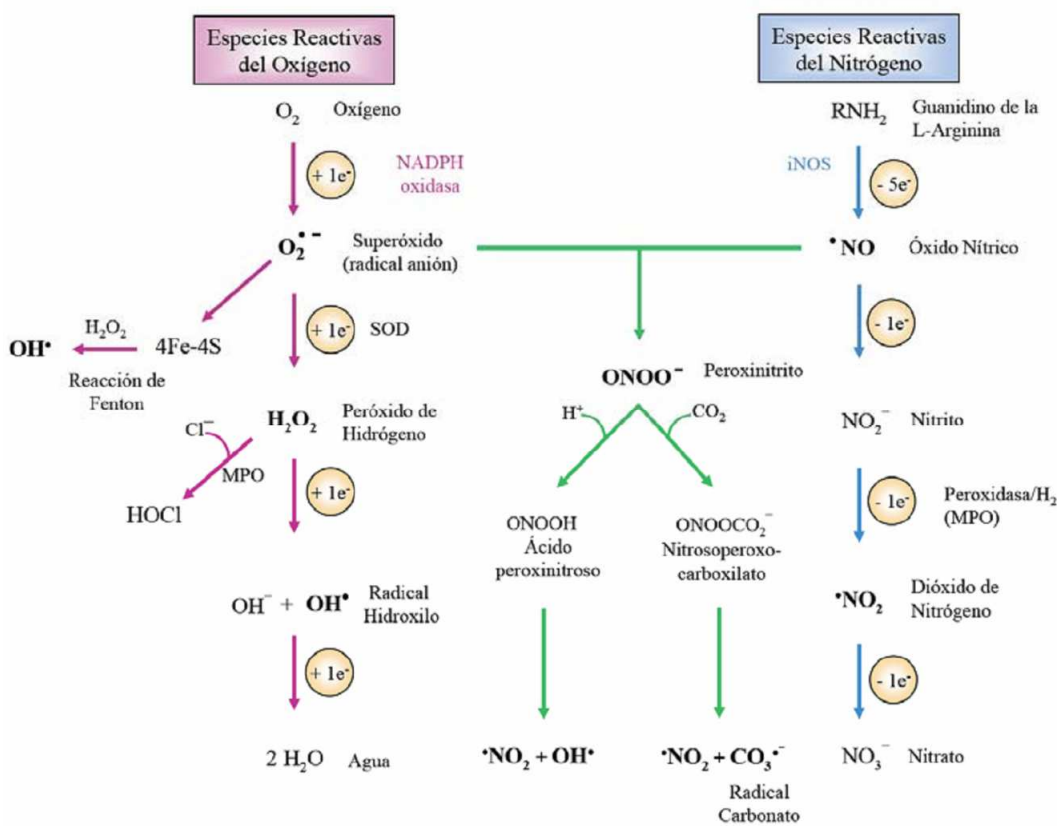
### 2.1.1.1 Radical Superóxido

El  $O_2^{\bullet-}$  es uno de los radicales libres generado por los macrófagos para atacar a agentes infecciosos. El  $O_2^{\bullet-}$  es producido por la reducción de un electrón del oxígeno por la enzima NADPH oxidasa fagocítica (NOX2) a nivel del fagosoma en macrófagos [14]. Las primeras evidencias de su producción fueron determinadas en neutrófilos donde se observó un aumento del consumo de oxígeno no dependiente de la cadena respiratoria durante la fagocitosis, proceso que recibió la denominación de “estallido respiratorio” [15]. Existen otras fuentes de  $O_2^{\bullet-}$  en las células como ser la respiración mitocondrial como subproducto de la cadena respiratoria [16] y otras enzimas como la xantina oxidasa [17]. Más adelante profundizaremos en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  por las enzimas NADPH oxidasas.

El  $O_2^{\bullet-}$  es un radical libre que puede actuar tanto como reductor y como oxidante ( $E^{o'}_{O_2/O_2^{\bullet-}} = -0.33 \text{ V}$  y  $E^{o'}_{O_2^{\bullet-}/H_2O_2} = 0.94\text{V}$ ), presentando en sistemas biológicos una vida media corta ( $< 1\text{ms}$ ) [11]. La carga negativa del  $O_2^{\bullet-}$  no le permite difundir a través de membranas biológicas a pH fisiológico y, de acuerdo a su pKa 4.8, a pH fisiológico se encuentra en su mayor parte de forma aniónica, lo que obliga a que su pasaje a través de las membranas se realice a través de canales aniónicos [11]. El  $O_2^{\bullet-}$  es un radical poco reactivo y sus efectos biológicos pueden darse por reducción de enzimas con centros férricos como la aconitasa [18] o alcalinización de organelos intracelulares [19]. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  como mecanismo efector de la respuesta inmune no se debe a una acción directa de este radical sino a la formación de especies derivadas como por ejemplo la reacción con el  $\bullet\text{NO}$  formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^- + \text{ONOOH}$ ) [20, 21] o por la generación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formado por dismutación espontánea del  $O_2^{\bullet-}$  o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) [22]. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un oxidante sin carga, permeable a las membranas biológicas y con capacidad de señalización dado por su capacidad de oxidar componentes celulares, como enzimas claves de rutas metabólicas activando o inhibiendo vías de señalización celular [23]. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede



formar por reacción de Fenton con metales de transición el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), de mayor poder oxidante aumentando así su poder destructivo contra patógenos [19]. Asimismo, la enzima Mieloperoxidasa (MPO), expresada abundantemente en gránulos de neutrófilos cataliza la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) durante el estallido respiratorio de neutrófilos a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y anión  $\text{Cl}^-$  que aumentan poderosamente la actividad microbicida [24] (Figura 1).



**Figura 1. Producción de especies reactivas por células fagocíticas.** Durante la activación macrofágica la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\bullet\text{NO}$  deriva en la formación de especies con propiedades físico-químicas características que definirán el rol que cada una juega durante el desarrollo de procesos patológicos. Figura adaptada de [9].

### 2.1.1.2 Óxido Nítrico y ERN

Otro radical libre sintetizado en los macrófagos es el •NO. El •NO es un radical libre bastante estable con poca capacidad redox y por ello no reacciona en forma rápida con la mayoría de las biomoléculas [25]. El •NO presenta una carga neta neutra, radio molecular pequeño, y es hidrofóbico lo que le permite difundir a través de las membranas lipídicas (con una difusión reportada de  $0.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para la membrana de eritrocitos [26]) saliendo del compartimento celular en el que es producido hacia células vecinas (parácrina). El •NO presenta reactividad selectiva con hemo, hierro y sulfoproteínas, fácil reacción con el oxígeno molecular y especies radicalares derivadas del oxígeno [10, 27].

El •NO es un potente vasodilatador regulando la presión sanguínea producido por células endoteliales, de ahí su nombre de factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) [28]. El •NO se une al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa y activa la producción de GMP cíclico que induce la relajación del vaso sanguíneo [28]. Asimismo, el •NO a altas concentraciones presenta actividad antimicrobiana en monocitos y macrófagos [29]. La identificación del •NO como mecanismo efector del sistema inmune se inicia con la caracterización de la arginina como un sustrato necesario para la actividad tumoricida de los macrófagos responsable de esos efectos [30, 31].

El •NO es producido por diversas células de mamífero y sintetizado por una familia de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintasa (NOS; EC 1.14.13.39) que catalizan la oxidación de L-arginina a L-citrulina en presencia de oxígeno molecular y NADPH [32]. Las distintas isoformas de la NOS se dividen en tres tipos: i) NOS neuronal constitutiva (nNOS), ii) NOS inducible (iNOS o NOS2), iii) NOS constitutiva en las células endoteliales (eNOS) [33]. Las tres formas revelan un mismo mecanismo de catálisis, aunque difieren en sus estructuras primarias, sus regulaciones y su localización cromosómica. La NOS2 está presente en macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, miocitos y células endoteliales [29]. La NOS2 se encuentra distribuida en el citosol del macrófago; del total de enzima, aproximadamente la mitad se localiza en vesículas que son transportadas hasta el fagosoma durante la activación del macrófago lo que determina que exista un aumento local en la concentración de •NO [34]. La expresión de la enzima está controlada por

citoquinas activadoras (ej: interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , IL-6) o inhibitoras (ej: factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), IL-4, IL-10) producidas por linfocitos T helper 1 y 2 [29, 35]. También productos de virus, bacterias, protozoarios y hongos son reguladores de la NOS2. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimula una inducción moderada de la expresión de la NOS2, pero en sinergia con INF $\gamma$  se obtiene una respuesta máxima. Éstas vías de inducción involucran al factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que media la inducción por LPS, IL-1b y TNF- $\alpha$  [36].

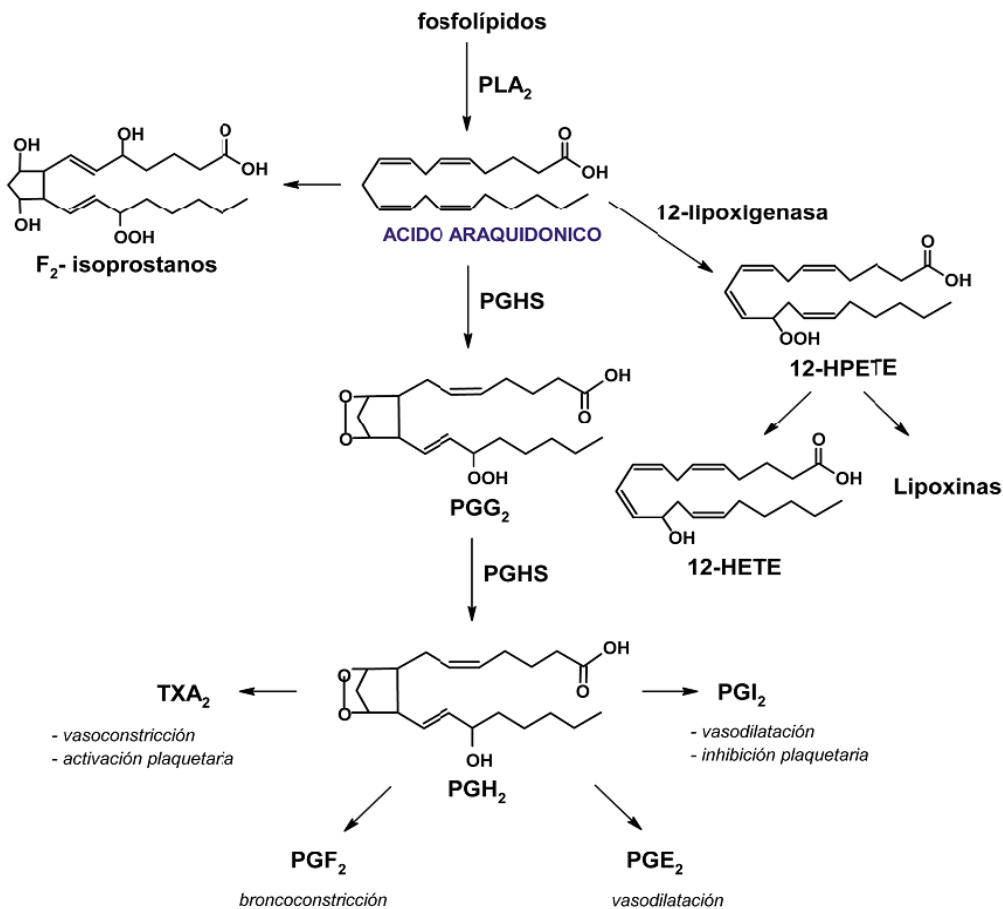
Gran parte de la toxicidad mediada por  $\bullet$ NO depende de la formación de ERN, tales como el peroxinitrito y dióxido de nitrógeno ( $\bullet$ NO<sub>2</sub>) que son más reactivos y tóxicos que su precursor  $\bullet$ NO [37]. La formación de las ERN a partir de  $\bullet$ NO requiere la presencia de otros oxidantes tales como O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o centros metálicos. El  $\bullet$ NO<sub>2</sub> se puede formar a partir de la ruptura homolítica del peroxinitrito produciendo también  $\bullet$ OH y también en entornos hidrofóbicos a partir de la autooxidación del  $\bullet$ NO. Asimismo, el  $\bullet$ NO<sub>2</sub> puede generarse por la acción de hemoperoxidasas o por complejos de metales de transición con un producto principal del metabolismo del  $\bullet$ NO, el nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) [37]. Las ERN pueden reaccionar modificando proteínas, lípidos [38, 39] y ácidos nucleicos [40, 41] promoviendo reacciones de nitrosación, nitrosilación, nitración y/o oxidación [12]. Estas modificaciones inducen respuestas citotóxicas que promueven respuestas inflamatorias así como reacciones de señalización celular [42, 43]. Además, la transformación en ERN determina la disminución de la biodisponibilidad del  $\bullet$ NO que se observa durante procesos inflamatorios crónicos [44].

Una producción exacerbada de especies reactivas puede generar efectos deletéreos por la acción de los radicales en las células de nuestro organismo, por lo que es importante la correcta regulación de su producción [8, 39, 45-47].

### **2.1.2 Metabolismo del Ácido Araquidónico**

Otros mediadores y reguladores de la inflamación son los derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA), un ácido graso poliinsaturado con cuatro dobles enlaces (20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ). El metabolismo del AA está finamente regulado a

nivel celular, donde se establece un balance entre su síntesis, transferencia entre y desde los fosfolípidos de membrana hacia las proteínas transportadoras, y liberación al citosol [48]. El AA puede ser metabolizado por distintas vías enzimáticas generando distintos tipos de lípidos bioactivos: i) a través de la vía de la lipoxigenasa (LOX) forma los leucotrienos (LTs), lipoxinas, y ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) [48, 49]; ii) su oxidación por la enzima prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS) genera los precursores para la síntesis de prostanoideos (prostaciclina, prostaglandinas y tromboxanos) [50, 51]; iii) por la vía de las enzimas citocromo P450 se forman los derivados del ácido eicosatrienoico [52]. El AA también puede ser blanco de oxidaciones no enzimáticas por radicales libres para formar isoprostanos e isoleucotrienos [53, 54], con actividades biológicas distintas a los productos de oxidación enzimática (Figura 2).



**Figura 2. Formación de prostanoideos a partir del ácido araquidónico.** La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) libera al AA de la membrana lipídica. La enzima PGHS por acción ciclooxigenasa de la enzima genera la Prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y por la acción peroxidasa forma la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>),

precursora de los lípidos bioactivos Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), Prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>), Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Asimismo, el AA puede ser convertido en 5-hidroieicosatetraenoicos (12-HETE) por la 12-lipoxigenasa, que es precursor de varios leucotrienos de actividad fisiológica. El AA también puede ser oxidado de manera no enzimática formando Isoprostanos.

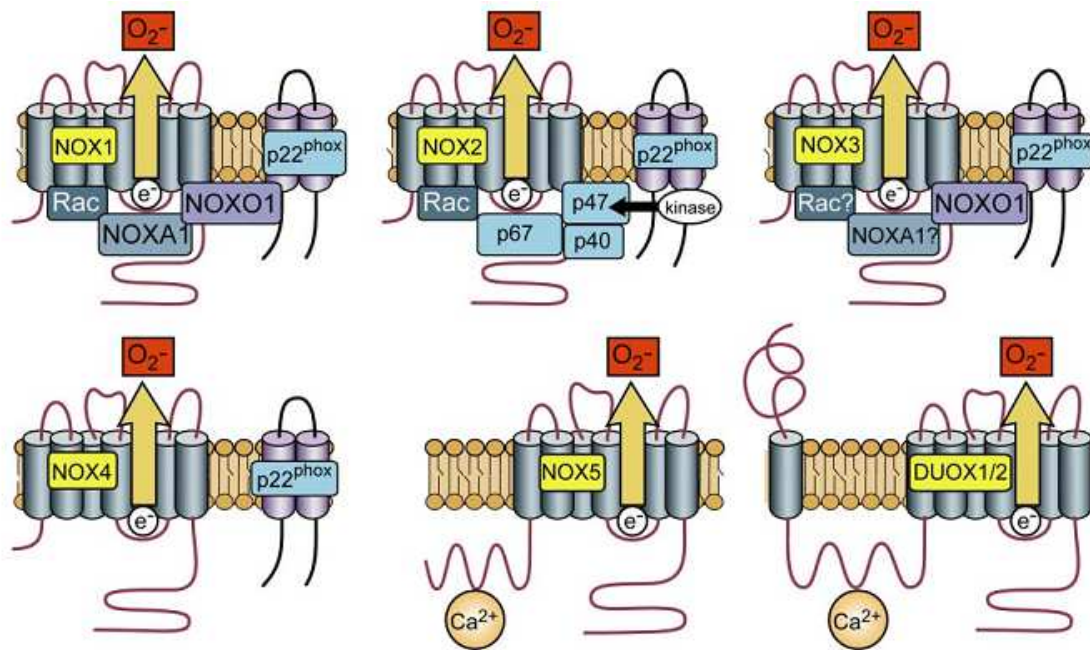
Los prostanoides poseen la capacidad de modular la intensidad y duración de las respuestas inflamatorias por presentar efectos pro y antiinflamatorios así como de coordinar importantes respuestas celulares en numerosas funciones fisiológicas [55]. La producción de lípidos bioactivos derivados del AA en los sitios de inflamación está regulada por estímulos presentes en la respuesta inmunológica (IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS, etc.) y por respuestas del metabolismo basal [48, 51, 56], siendo específico del contenido enzimático de cada tipo celular. Por ejemplo, los leucocitos y monocitos producen prostanoides (por la vía de la PGHS) y leucotrienos (por la vía de la LOX), y los granulocitos producen principalmente leucotrienos [48].

La biosíntesis de prostaglandinas se encuentra modulada por la producción de •NO en diversas especies y condiciones celulares; al mismo tiempo existen evidencias que los prostanoides pueden regular la síntesis de •NO en una variedad de tipos celulares [57]. El •NO puede interactuar con las enzimas que contienen hierro; como la PGHS es una hemo-enzima, puede ser un blanco potencial para el •NO modulando la síntesis de prostaglandinas [58]. Existe una discrepancia en la literatura respecto al efecto de esta modulación, donde se ha reportado que el •NO es capaz de inhibir [59, 60] o activar a la PGHS [53, 61-64]. En la inflamación, tanto la NOS2 como la PGHS-2 se encuentran coexpresadas en varios tipos celulares existiendo una clara relación entre el •NO y la PGHS que conduce a un aumento en la producción de prostaglandinas pro-inflamatorias [65, 66]. El mecanismo de acción de las prostaglandinas sobre la vía del •NO ha sido atribuido en la mayoría de los casos a un aumento en los niveles de segundos mensajeros, como el AMP cíclico. Se ha sugerido que el AMP cíclico está involucrado tanto en la estimulación como en la inhibición mostrada por los prostanoides [57].

## 2.2 NADPH oxidasa

La producción de  $O_2^{\bullet-}$  por macrófagos y otras células fagocíticas son un paso importante en la respuesta inmune innata. El  $O_2^{\bullet-}$  es producido por el complejo enzimático multiproteico NADPH oxidasa [67] y es responsable del denominado estallido [68]. Las NADPH oxidasas, denominadas NOXes (por NADPH oxidasas) son una familia de proteínas de membrana capaces de catalizar la producción de  $O_2^{\bullet-}$  debido a la reducción univalente del oxígeno dependiente de NADPH.

La familia de las NOXes presenta distintas isoformas: NOX1 (previamente denominada mox-1) [69, 70], NOX2 o gp91<sup>phox</sup> [71, 72], NOX3 [73], NOX4 [74, 75] y NOX5 [69, 73] y las DUOX1 y DUOX2, inicialmente llamadas tiroide oxidasas [76, 77] (Figura 3). En su conjunto, se expresan en la mayoría de los tipos celulares, siendo actualmente reconocidas como una de las fuentes de  $O_2^{\bullet-}$  implicadas en procesos fisiológicos como la señalización celular [78] y en situaciones patológicas como la disfunción vascular [79]. Las distintas isoformas presentan estructuras y funciones similares (Figura 3). Todos los miembros de la familia NOX comparten 6 dominios transmembrana altamente conservados que constituyen la subunidad con capacidad catalítica [80]. Algunas isoformas comparten algunas subunidades, como p22<sup>phox</sup> que se encuentra en NOX1-4 (Figura 3), pero difieren en su forma de activación [80]. A continuación detallaremos el mecanismo de activación de la NOX2.

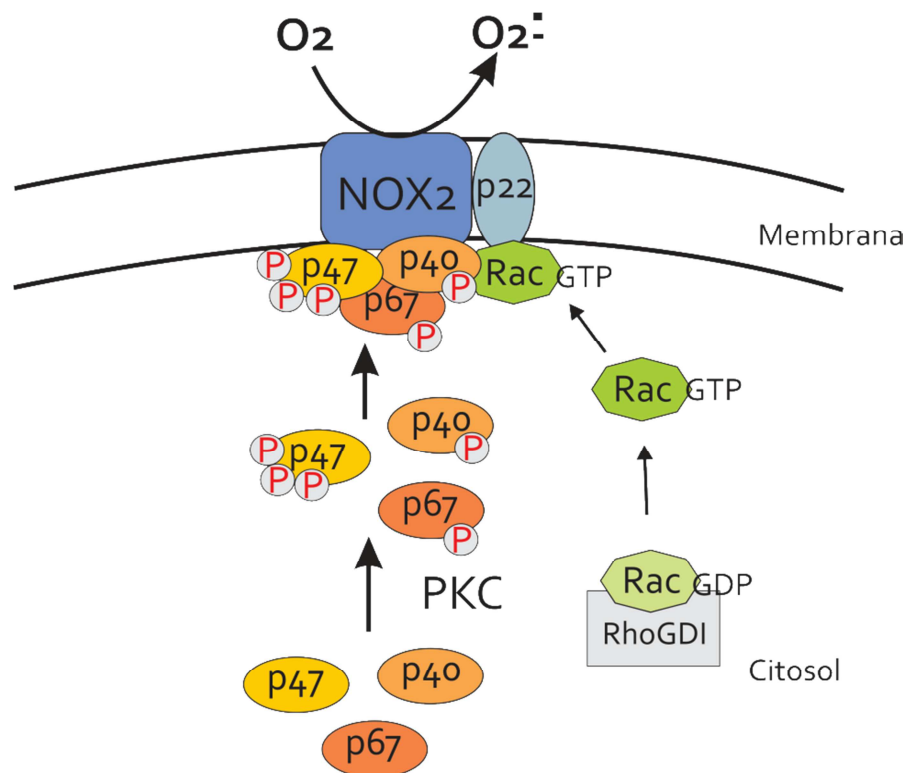


**Figura 3. Componentes de las isoformas de la NADPH oxidasa.** A pesar de las similitudes de las enzimas de la familia NOX, difieren en los componentes y sus mecanismos de activación. La actividad NOX1 requiere p22<sup>phox</sup>, NOXO1 y NOXA1, y de una GTPasa Rac. La NOX2 requiere p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, y Rac; la fosforilación de p47<sup>phox</sup> es requerida para la activación de NOX2, y p40<sup>phox</sup> no es absolutamente requerida para su activación. La NOX3 requiere de p22<sup>phox</sup> y NOXO1; el requerimiento de NOXA1 puede ser dependiente de la especie y el requerimiento de Rac está en debate. La NOX4 requiere p22<sup>phox</sup>, pero en sistemas reconstructivos esta constitutivamente activa sin otros requerimientos. Sin embargo, las células que expresan NOX4 posiblemente necesiten de Rac para su activación. NOX5, DUOX1, y DUOX2 son activados por calcio y no parecen requerir de otras subunidades. Figura extraída de [80].

### 2.2.1 NADPH oxidasa fagocítica en macrófagos

La NOX2 es la isoforma de la NADPH oxidasa que se encuentran principalmente en células fagocíticas profesionales como macrófagos y neutrófilos [80, 81]. La NOX2 es un complejo enzimático conformado por 6 subunidades: dos proteínas transmembrana (gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>) que conforman el heterodímero flavocitocromo *b*<sub>558</sub>, tres proteínas reguladoras citosólicas: p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> y una GTPasa Rac [14, 67, 80]. La GTPasa Rac1 es la isoforma predominantemente expresada en monocitos mientras que que Rac2 se asocia a los neutrófilos [82]. En reposo, las proteínas reguladoras se encuentran en el citosol y el complejo NOX está desensamblado e inactivo. Tras la activación en respuesta a estímulos

quimiotácticos o partículas fagocitables, los componentes citosólicos sufren una serie de modificaciones covalentes y cambios conformacionales que inducen su translocación hacia la membrana donde se asocian con gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> formando el complejo activo y produciendo el radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> hacia adentro del fagosoma o afuera de la célula [83] (Figura 4). La actividad NOX2 está regulada temporal y espacialmente para asegurar que la enzima se encuentre inactiva mientras la célula está en estado basal y prevenir la destrucción del tejido hospedador evitando daños colaterales [14].



**Figura 4. Activación de NADPH oxidasa fagocíticas.** En la figura se observan los componentes citosólicos y de membrana que forman la NOX2, su ensamblaje en la conformación activa. Se detalla de forma esquemática la activación de la enzima. Diversos agonistas estimulan vías de señalización que llevan a la activación de la PKC, enzima que lleva a cabo el proceso de fosforilación de los componentes citosólicos p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup>. Una vez fosforilados, las subunidades citosólicas migran a la membrana donde interaccionan formando el complejo activo con NOX2 y p22<sup>phox</sup>. Además la activación induce al intercambio de GDP por GTP de Rac que también migra a la membrana durante el proceso de activación de la enzima [80].



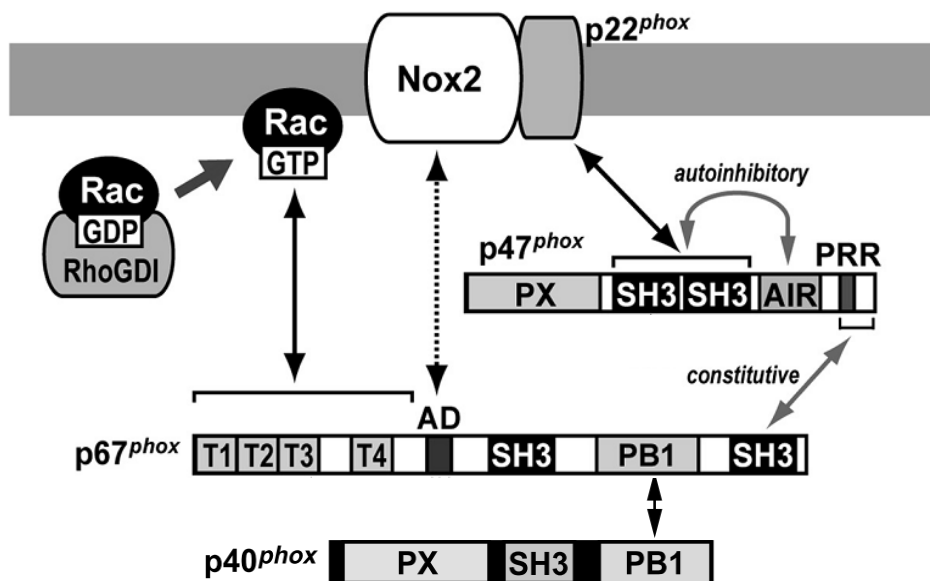
## 2.2.2 Activación y ensamblaje del complejo enzimático NOX2

Diversos receptores de membrana asociados a proteínas G y activados por una variedad de estímulos, pueden llevar a la activación de la NOX2. Dichos receptores inician el proceso de activación a través de la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) por la fosfolipasa  $\text{C}\beta$ , liberando inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $\text{IP}_3$  promueve la apertura de canales de calcio del Retículo Endoplasmático (RE) promoviendo un aumento momentáneo de calcio en el citosol. El calcio y el DAG activan a la Proteína quinasa C (PKC), y el calcio además activa la fosfolipasa A2 ( $\text{PLA}_2$ ) que libera AA de la membrana lipídica [81]. La PKC es capaz de activar la migración de los componentes citosólicos a la membrana promoviendo la fosforilación de dichos componentes. Además se ha reportado que el AA es capaz de estimular la activación de la NOX2 a promoviendo un cambio conformacional de  $\text{p47}^{\text{phox}}$  así como el intercambio de GDP por GTP en Rac [84-86]. La activación de la NOX2 también pueden ocurrir en respuesta a ésteres de forbol 2-miristato 13-acetato (PMA), un potente activador no fisiológico de PKC.

El ensamblaje de la NOX2 requiere un cambio conformacional de  $\text{p47}^{\text{phox}}$  activada por fosforilación lo que permite la interacción con  $\text{p67}^{\text{phox}}$  y  $\text{p40}^{\text{phox}}$  y la migración de los componentes citosólicos a la membrana [87, 88]. La proteína  $\text{p47}^{\text{phox}}$  contiene una secuencia aminoacídica de 390 residuos de aminoácidos con dos dominios adyacentes SH3 (Src homology 3), un dominio PX (Phox homology), una región rica en arginina y lisina (la región polibásica), una región rica en prolina (PRR) y una región inhibitoria AIR (autoinhibitory region) (Figura 5) [89, 90]. En reposo, los dominios SH3 de  $\text{p47}^{\text{phox}}$  están bloqueados por una asociación intramolecular con la región AIR, que se localiza inmediatamente C-terminal a la segunda de dominio SH3 [91, 92]. La liberación de la asociación inhibitoria es inducida por la fosforilación de múltiples residuos de serina (hasta 11 fosforilaciones) en la región AIR que genera un cambio conformacional de  $\text{p47}^{\text{phox}}$  [91, 93, 94]. La fosforilación de  $\text{p47}^{\text{phox}}$  está dado principalmente por las isoformas  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  de la PKC [95-97], pero existen varias quinasa que pueden llevar a cabo dicho proceso de fosforilación, como por ejemplo la MAP quinasa p38 [98-100], PAK [101], Caseína quinasa 2 [87], o Proteína Quinasa B (PKB/AKT) [102]. Asimismo, además de la

fosforilación de p47<sup>phox</sup>, se ha reportado que las proteínas p40<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> también son fosforiladas [103-106].

Una vez liberado, los dominios SH3 de p47<sup>phox</sup> pueden interactuar con la región PRR en la región C-terminal de p22<sup>phox</sup>, una interacción esencial para la activación NOX2 [107, 108] (Figura 5). El anclaje en la membrana de p47<sup>phox</sup> también se estabiliza por la interacción de la región PX de p47<sup>phox</sup> que es reconocida por fosfoinosítidos como fosfatidilinositol bifosfato luego de la translocación inducida por la activación [109]. Durante la activación, el dominio PX de p47<sup>phox</sup> se une al citoesqueleto a través de la moesina, proteína de la familia de proteínas de unión a actina [110-114] lo que sugiere que la interacción moesina-PX puede participar de la translocación de p47<sup>phox</sup> [115]. Recientemente se ha visto que la Proteína Disulfuro Isomerasa podría también tener un rol en el ensamblaje y activación de NOX2 [116, 117]. Este ítem será discutido y analizado más adelante en esta sección.



**Figura 5. Interacción de las subunidades de la NOX2.** En la figura se muestran los dominios de las proteínas citosólicas (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>), de membrana y Rac y sus interacciones entre sí. La proteína p47<sup>phox</sup> presenta en su secuencia un dominio PX, dos dominios SH3, un dominio de AIR y un dominio PRR. El dominio AIR interacciona con los dominios SH3 de la misma p47<sup>phox</sup> en estado de reposo (autoinhibición). Frente a estímulos que genera un cambio conformacional en p47<sup>phox</sup>, se liberan los dominios SH3 de p47<sup>phox</sup> e interacciona con p22<sup>phox</sup>. Asimismo el dominio PRR de p47<sup>phox</sup> interacciona con el dominio SH3 de p67<sup>phox</sup>. Además p67<sup>phox</sup> genera un complejo con p40<sup>phox</sup> por interacción entre PB1 de cada proteína. Rac-GTP se contacta con la región TPR (T1-T4) de p67<sup>phox</sup>.

Finalmente, al activarse el dominio de activación (AD) de p67<sup>phox</sup> se pone en contacto con gp91<sup>phox</sup>, necesario para la regulación de la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Figura adaptada de [85].

Asimismo, el cambio conformacional, p47<sup>phox</sup> puede interaccionar vía el dominio PRR con el segundo dominio de SH3 de p67<sup>phox</sup> [118], mientras que p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup> interaccionan entre sí por los dominios PB1 que contienen ambas proteínas [119, 120] (Figura 5). Las proteínas p40<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> no son capaces de translocarse en ausencia de p47<sup>phox</sup> [121]. Cabe destacar que la p40<sup>phox</sup> presenta un rol controversial observándose que la fosforilación puede estar asociada a roles estimuladores así como inhibitorios [106, 122, 123].

Otro componente importante para la activación es Rac. Rac presenta un rol regulador, siendo una GTPasa de la familia de proteínas Rho. En las células en reposo, Rac se encuentra en el citosol unido a GDP y al inhibidor de disociación Rho-GDP (RhoGDI). Luego de la estimulación, Rac intercambia el GDP por GTP y se libera de RhoGDI, pudiendo migrar a la membrana [90, 124] (Figuras 4 y 5). Rac-GTP, pero no Rac-GDP, es capaz de interaccionar con el dominio TPR (tetra-trico-peptide repeat) N-terminal de p67<sup>phox</sup>, interacción necesaria para la migración de Rac-GTP a la membrana [125, 126] (Figura 5). Rac también participa en la desactivación del complejo a través de sus propios mecanismos reguladores, por activación por GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) intercambiando GDP por GTP y su inactivación por GAPs (GTPase-Activating Proteins) que cataliza la hidrólisis de GTP [124].

### 2.2.3 Producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por NOX2

El complejo flavocitocromo *b*<sub>558</sub> constituye el núcleo catalítico de la enzima, que requiere la presencia de varios grupos prostéticos. La proteína gp91<sup>phox</sup> contiene en su estructura 6 alfa-hélices transmembrana con dos grupos hemo asimétricos coordinados con residuos de histidina de los dominios transmembrana III y V [127] y en el extremo C-terminal citoplasmático contiene un sitio de unión para el FAD y uno para el NADPH [128-135] (Figura 6). Por lo tanto, gp91<sup>phox</sup> presenta todos los cofactores necesarios requeridos para la transferencia de



los grupos hemo y luego al oxígeno generando una nueva molécula de  $O_2^{\bullet-}$  [80]. Figura extraída de [142].

## 2.2.4 Importancia fisiológica de la NOX2

Defectos en la función de la NOX resulta en una severa inmunodeficiencia y los individuos sufren de la Enfermedad Granulomatosa crónica (EGC), una rara enfermedad caracterizada por alta frecuencia a infecciones de bacterias y hongos [143-145]. Fueron identificadas mutaciones de los distintos componentes de la NADPH oxidasa fagocítica en pacientes con EGC, como en las subunidades  $gp91^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p22^{phox}$  o  $p67^{phox}$  [146]. La EGC es una inmunodeficiencia primaria poco frecuente en la que los individuos afectados sufren infecciones crónicas y granulomas inflamatorios causados por microorganismos. Los pacientes con EGC presentan mayor susceptibilidad a infecciones debido a la falta de mecanismos efectivos para atacar a patógenos externos dependiente de la formación de especies reactivas del oxígeno, por la falta de la correcta actividad de la NOX2 [144, 145]. La forma más frecuente de esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen de la  $gp91^{phox}$  ligado al cromosoma X [147]. Las demás formas de EGC son de tipo autosómicas recesivas debido a mutaciones en las otras subunidades mencionadas [148]. También se han observado mutaciones en Rac 2 presentando defectos en el estallido respiratorio de las células fagocíticas e infecciones recurrentes [149].

Por otro lado, los niveles altos de  $O_2^{\bullet-}$ , con su producto de dismutación, el  $H_2O_2$ , se han implicado en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, por lo que es necesario una correcta regulación de su producción de ROS [81, 150-153].

## 2.3 Proteína Disulfuro Isomerasa

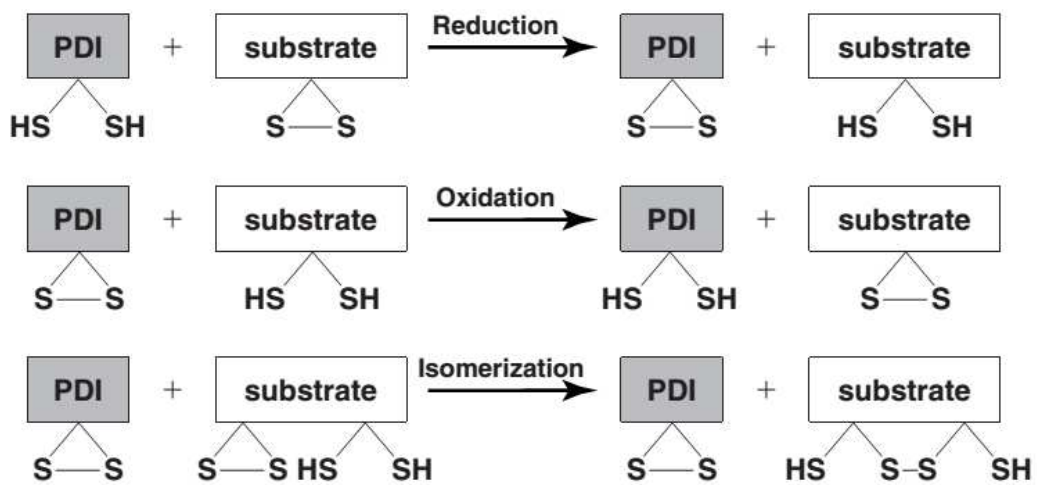
La Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI; EC 5.3.4.1) es una enzima miembro de la superfamilia de las oxidorreductasas ditiol-disulfuro [154-157]. La PDI se expresa en casi todos los tejidos de mamífero [158, 159] y es una de las proteínas más abundantes en el RE presentando una señal de retención en el RE (secuencia KDEL en el C-terminal) y su cantidad es ~0.8% de las proteínas totales en la célula [160]. Su función principal es asistir al plegamiento de proteínas catalizando la formación y ruptura de puentes disulfuro entre cisteínas dentro de una proteína para alcanzar la conformación nativa, al facilitar la formación de puentes disulfuros correctos mientras se está plegando en el RE. La PDI también presenta actividad como chaperona, ayudando a las proteínas incorrectamente plegadas a alcanzar su plegamiento correcto [161].

No se han reportado ratones knockout de PDI y debido a su papel esencial en la célula es posible que no sean viables. La desregulación de la expresión de PDI y/o la actividad enzimática se asocia con una serie de enfermedades humanas neurodegenerativas y cardiovasculares [162-166].

### 2.3.1 Estructura y Función de PDI

La PDI es una enzima chaperona redox conservada de la superfamilia de las tioredoxinas, la cual ayuda al plegamiento redox de proteínas a través de la oxidación y múltiples reacciones de intercambio de tiol-disulfuro intramoleculares [161, 167]. La principal actividad de PDI es la isomerización de tioles siendo la función mejor demostrada de la enzima su capacidad de asistir en la introducción de uniones disulfuro en proteínas desplegadas en el RE [161]. La PDI presenta en el dominio catalítico un motivo característico ditiol CXXC en el sitio activo, importante para su actividad tiol-disulfuro reductasa (rotura de disulfuro), oxidasa (formación de disulfuro) e isomerasa (rearrreglo de enlaces disulfuros) [168, 169] (Figura 7). La PDI puede mostrar una actividad reductasa fuera del RE donde el estado redox local es más reductor. En el RE, y potencialmente en otros microambientes menos reductores, la PDI tiende a actuar como oxidasa y/o

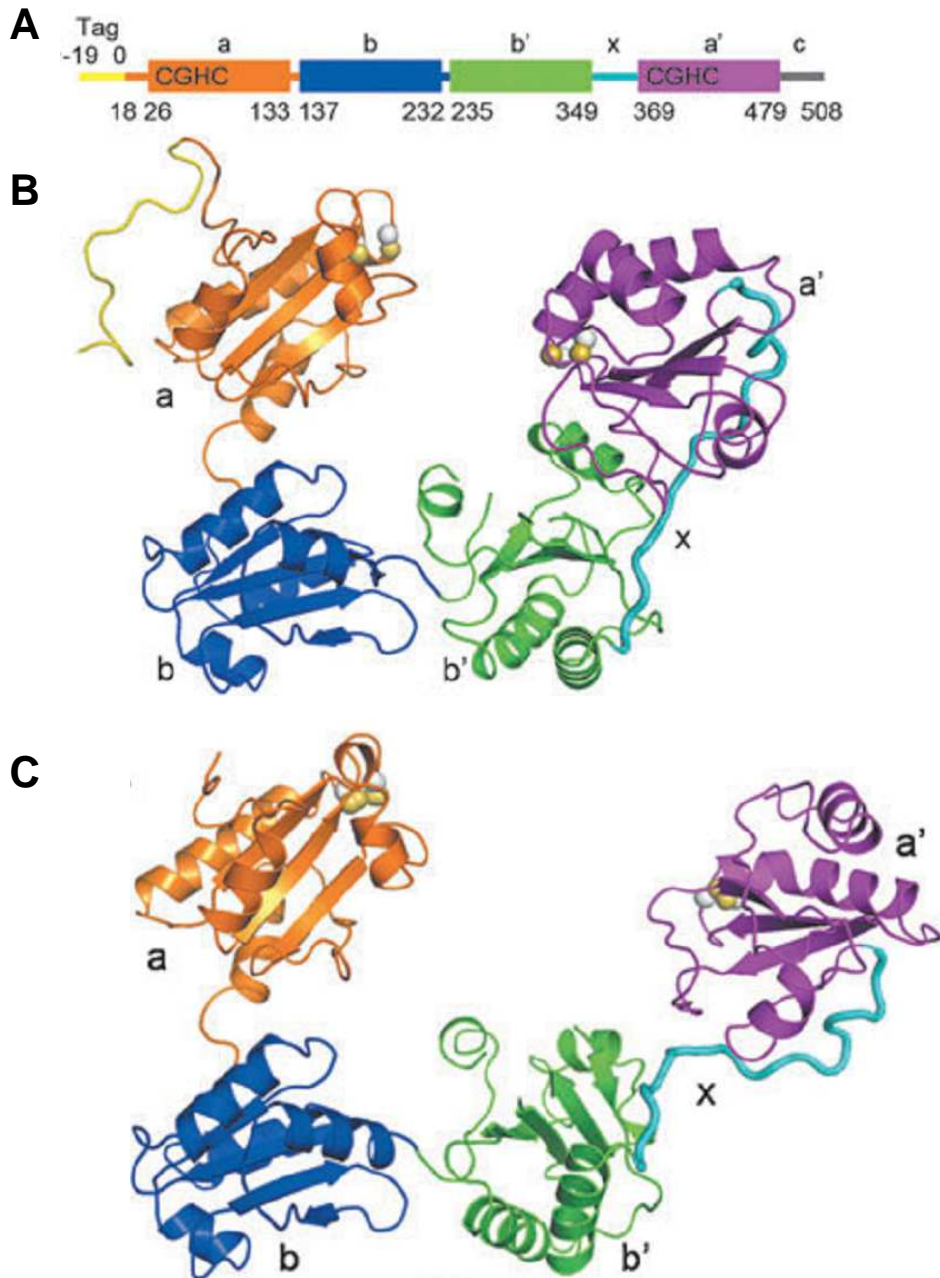
isomerasa, reacciones que son esenciales para el plegamiento adecuado de proteínas [170]. La PDI recobra su estado de oxidación en el RE por la enzima oxidasa del RE, Ero-1, la cual es reoxidada por transferencia de electrones al oxígeno generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [171]. La PDI también presenta actividad chaperona que es independiente del estado redox de los tioles del sitio activo [172, 173]. Las tres actividades catalíticas de PDI, la actividad redox de tioles, el intercambio de tiol-disulfuro, y la actividad chaperona son fundamentales para la función del RE [174].



**Figura 7. Reacciones redox de tioles por PDI con proteína.** La PDI presenta tres actividades dependientes de residuos de cisteínas: la actividad reductasa donde provoca la ruptura de enlaces disulfuro de la proteína blanco, la actividad oxidasa la cual forma enlaces disulfuro en la proteína sustrato, y la actividad isomerasa que rearrregla los enlaces disulfuro de la proteína blanco [161]. En el RE, y potencialmente en otros microambientes menos reductores, la PDI tiende a actuar como oxidasa y/o isomerasa, mientras que fuera de éste, en ambientes más reductores actúa como reductasa [170]. Figura extraída de [175].

Todos los miembros de la familia PDI comparten la estructura de dominio similar a la tiorredoxina caracterizado por el pliegue  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$  [169]. La PDI contiene cuatro dominios *abb'a'*. Los dos sitios activos redox que contienen el motivo CXXC se encuentran en los dominios *a* y *a'*. Los dominios de sitios activos están vinculados por los dominios *b* y *b'*. También hay una pequeña región interdominio conocido como el x-linker situado entre *b'* y *a'* [176, 177]. Los recientes avances en Resonancia Magnética Nuclear y cristalografía de rayos X han

permitido la identificación de *b'* como el dominio chaperona el cual contiene una gran superficie hidrofóbica multivalente que permite la unión de distintas proteínas para su plegamiento [178].



**Figura 8. Estructura cristalográfica de la PDI oxidada y reducida.** (A) Se muestra la cadena de la PDI humana con los distintos dominios: *a* (naranja), *b* (azul), *b'* (verde), *a'* (violeta) y el interdominio x-linker (celeste). (B) Diagrama de cintas de la PDI humana reducida (vista frontal) con la separación de los sitios activos de 27.6 Å. (C) Diagrama de cintas de la PDI humana oxidada (vista frontal) con la separación de los sitios activos de 40.3 Å. Figura extraída de [179].



Wang y colaboradores determinaron la estructura tridimensional de PDI humana tanto en las formas reducidas y oxidadas [180]. En la forma oxidada de PDI el sitio activo *a* y *a'* se encuentran separados por 40,3 Å y los dominios tiorredoxina *abb'a'* están todos en el mismo plano [179]. En el estado reducido de la enzima, los sitios activos están separados por 27,6 Å. Sin embargo, sólo *abb'* están en el mismo plano y *a'* está inclinada 45° [179] (Figura 8). Esto indica que el estado oxidado de PDI presenta una conformación abierta permitiendo la entrada de sustratos para la actividad chaperona (péptidos desplegados) y el estado reducido tiene una conformación cerrada que inhibe su entrada. Esto resalta la importancia de los cambios conformacionales inducidos por el estado redox de los sitios activos y sugiere una mayor regulación redox de la actividad chaperona [181].

La PDI, además del RE, se encuentra también presente en otros compartimentos subcelulares incluyendo el citoplasma, núcleo, mitocondrias y el lado extracelular de la membrana plasmática [182-184] donde cumple funciones regulando varios procesos biológicos importantes, incluyendo la coagulación [185], la respuesta de la lesión [186], el tráfico subcelular y la secreción de proteínas [187] [188], la traducción del ARNm [189], la presentación de antígenos [190], la activación y agregación de plaquetas [191] y la formación de trombos [192-194], la migración de células T [195], la migración de células de glioma [196], la fusión de gametos [197] y en la actividad de la NADPH oxidasa [175].

### **2.3.2 Rol de la enzima PDI en la actividad NOX**

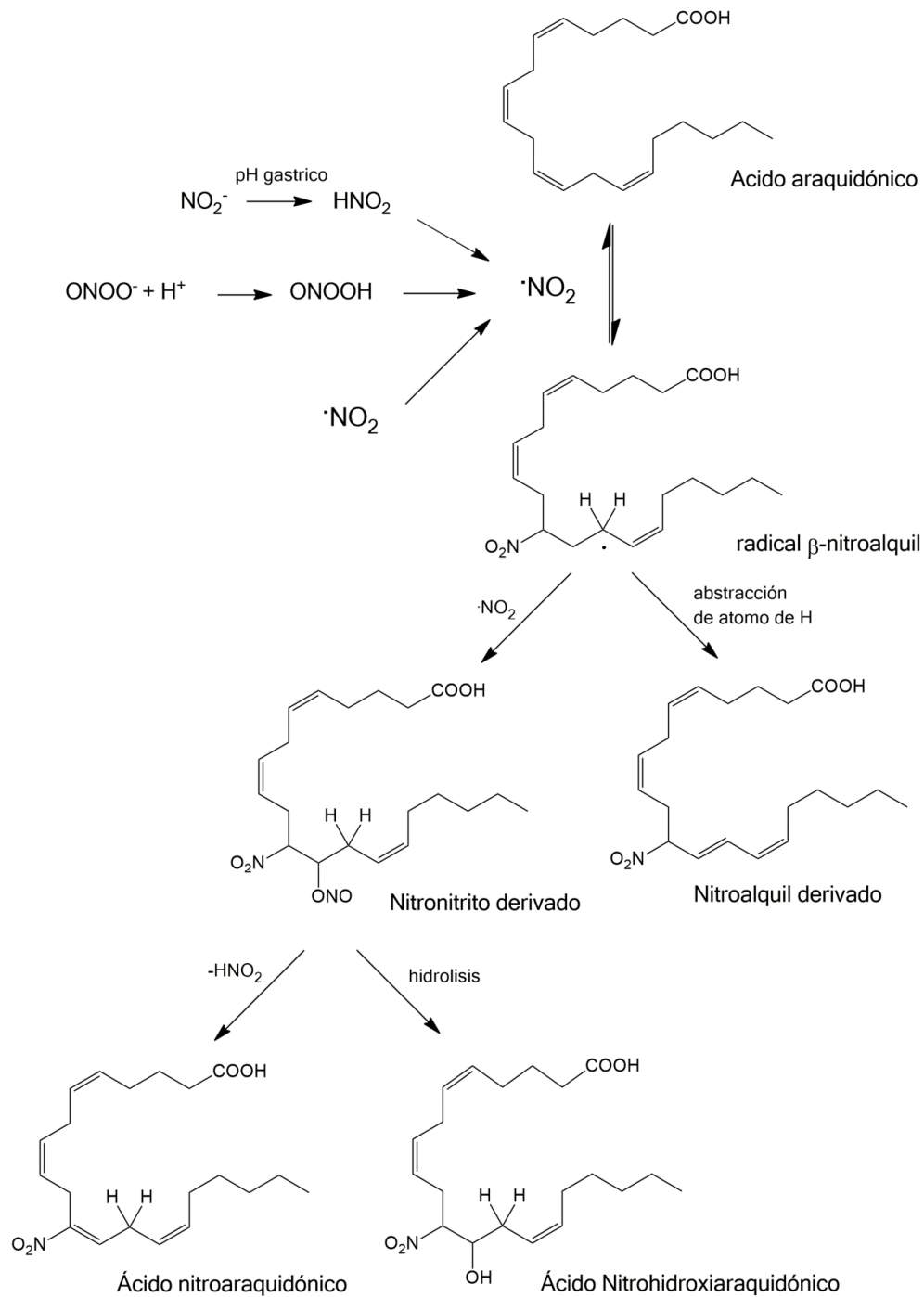
La PDI está involucrada en la actividad de las NOXes, como una proteína reguladora de su actividad, modulando la actividad de las isoformas de NOX tales como NOX1 [198, 199], NOX2 [116, 117] y NOX4 [199]. Está reportada la interacción entre la PDI y la NOX en células del músculo liso vascular, macrófagos y neutrófilos dentro del RE así como en el citosol [116, 117, 175, 198, 199]. En células musculares lisas vasculares, la sobreexpresión de PDI provoca un incremento en la actividad NOX1 así como de su ARNm [198], el cual coincide con la mayor colocalización de PDI y la subunidad p22<sup>phox</sup> de NOX1 y NOX4, las

isoformas mayoritarias en estas células [198, 199]. En macrófagos de línea celular J774, la sobreexpresión de PDI incrementa la fagocitosis de *Leishmania chagasi* y la producción de  $O_2^{\bullet-}$  por NOX2, mientras que el silenciamiento de PDI disminuye ambos procesos [117], indicando una función fundamental asociada a la actividad de NOX2. En neutrófilos humanos, la PDI interacciona con  $p47^{phox}$  en forma dependiente del estado redox, de forma que la PDI podría actuar como un organizador redox de NOX2 de leucocitos modulando la migración de  $p47^{phox}$  a la membrana, así como el correcto ensamblaje y subsecuente activación de NOX2 [116]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la PDI juega un importante rol en la regulación de la producción de ROS por las enzimas NADPH oxidasas.

## 2.4 Ácidos grasos nitrados

Los ácidos grasos libres y esterificados, componentes principales de las membranas biológicas y lipoproteínas plasmáticas, son sustratos para la modificación oxidativa por oxidantes fisiológicos. Muchas de estas modificaciones representan eventos importantes durante las enfermedades inflamatorias crónicas [1]. A nivel de membranas biológicas, debido a la capacidad del  $\bullet NO$  de difundir y concentrarse en medios lipofílicos, diversas RNS son capaces de reaccionar con ácidos grasos insaturados para formar nitro-, nitrito- y nitroepoxi-derivados [47, 200, 201]. Estas reacciones ocurren simultáneamente con procesos de lipoperoxidación, generando una mezcla compleja de productos oxidados y nitrados [39]. El agente nitrante para la formación de ácidos grasos nitrados más estudiado es el  $\bullet NO_2$ , cuya reacción conduce a la generación de derivados isomerizados, oxidados y/o nitroalílicos, nitroalqueno, dinitro, o nitro-hidroxilípidos [200, 202] (Figura 9).

En los últimos años se han detectado *in vivo* derivados de ácidos grasos nitrados libres o esterificados con diversas propiedades biológicas [203]. Los ácidos grasos nitrados ( $NO_2$ -FA) presentan actividades pleiotrópicas con propiedades antiinflamatorias [42, 204-209] detectados *in vivo* en el rango de concentraciones de nanomolar y bajo micromolar [210-213]. Está demostrado que la nitración lipídica ocurre en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, con productos finales capaces de modular las respuestas celulares [200, 214-219].



**Figura 9. Formación de ácido nitroaraquidónico.** En este esquema se ejemplifica la formación de un nitroalqueno con el ácido nitroaraquidónico ( $\text{NO}_2\text{AA}$ ). El AA puede reaccionar con  $\cdot\text{NO}_2$  producido por distintas fuentes, generando un radical  $\beta$ -nitroalquilo que puede reaccionar con una segunda molécula de  $\text{NO}_2$  y con liberación de  $\text{HNO}_2$  produce el  $\text{NO}_2\text{AA}$  o desencadenar en otros productos según la tensión de oxígeno.

Los nitroalquenos (con el grupo  $-\text{NO}_2$  unido a uno de los carbonos de un doble enlace) son capaces de activar diferentes vías de señalización intracelular, por ejemplo la del receptor PPAR $\gamma$  modulando la expresión de genes relacionados con la inflamación [206, 214, 217], liberando  $\bullet\text{NO}$  en medio acuoso [214, 220, 221] y promoviendo la vasorelajación independiente de endotelio [216]. Además está reportado que producen un aumento en la expresión de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1) [204, 222] al tiempo que disminuye la expresión de NOS2 en macrófagos [221]. Estas acciones de los  $\text{NO}_2\text{-FA}$  pueden ser explicadas por su capacidad electrofílica para modificar covalentemente proteínas [223] como por ejemplo los factores de transcripción nucleares claves NF- $\kappa\text{B}$  y Nrf-2 [204, 224, 225].

En los últimos años, hemos demostrado varias acciones biológicas importantes para el ácido nitroaraquidónico ( $\text{NO}_2\text{AA}$ ), el derivado nitrado del AA [207, 221, 226, 227] (Figura 9), las cuales profundizaremos a continuación.

#### **2.4.2 Propiedades biológicas del $\text{NO}_2\text{AA}$**

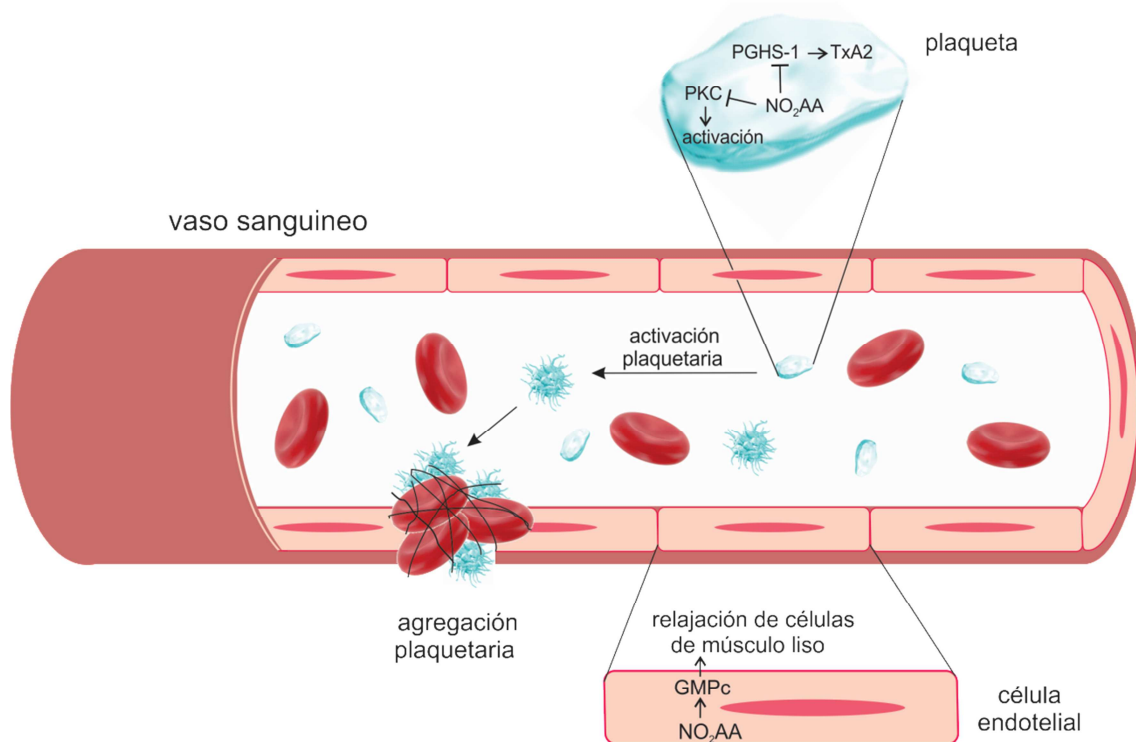
En los últimos años, se han demostrado varias acciones biológicas importantes del  $\text{NO}_2\text{AA}$  [207, 221, 226, 227]. En macrófagos activados, el  $\text{NO}_2\text{AA}$  ejerce acciones antiinflamatorias de protección al regular negativamente la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ ) inducida por LPS y la disminución de la expresión de NOS2, sumada a la activación de la vía Nrf2 contribuyendo al apagado fisiológico de la respuesta inflamatoria en los macrófagos [205, 221].

Como el AA es el sustrato para la actividad de PGHS, se estudió si la modificación por nitración del AA podría afectar la actividad de la PGHS. El  $\text{NO}_2\text{AA}$  fue capaz de inhibir las actividades POX y COX de PGHS-1 pero sólo afectó a POX en PGHS-2 [227]. Estos efectos inhibitorios eran exclusivos para  $\text{NO}_2\text{AA}$ , dado que no se observaron dichos efectos para otros nitroalquenos testeados. El análisis cinético indica que el  $\text{NO}_2\text{AA}$  inhibe las isoformas de la PGHS (PGHS-1 y -2) en un proceso que parece ser prácticamente irreversible [227]. Cabe destacar que la PGHS-2 se encuentra en monocitos, macrófagos y neutrófilos y participa en la producción de

prostaglandinas pro-inflamatorias siendo la enzima blanco farmacológico de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) [228]. El mecanismo de acción de la inhibición observada implica la liberación de grupo hemo de la enzima como resultado de la reacción del NO<sub>2</sub>AA con la proteína, siendo diferente de lo reportado para otros inhibidores de la enzima bien conocidos y reportados en la literatura [227]

La capacidad de NO<sub>2</sub>AA para modular la actividad de PGHS-1 se evaluó en un modelo celular, utilizando plaquetas humanas [226, 227]. El NO<sub>2</sub>AA representa un potente inhibidor de la agregación mediada por trombina [226, 227] inhibiendo la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), producto final de la vía del AA dependiente de la PGHS. El NO<sub>2</sub>AA inhibe las respuestas de plaquetas desde la activación de PKC (por ejemplo secreción de α-gránulo, la fosforilación de Erk2, translocación de PKC a la membrana), sin afectar a las respuestas que se encuentran upstream a dichas actividades (por ejemplo, de movilización de Ca<sup>2+</sup> [226]).

Asimismo, se estudiaron los efectos del ácido graso nitrado sobre los procesos de vasorelajación. Tanto el NO<sub>2</sub>AA como el derivado metilado del mismo, metil 6-nitroaraquidonico, inducen la vasodilatación de células de músculo liso vascular mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) formando GMP cíclico. Este efecto es independiente del endotelio, lo que sugiere que su actividad vasodilatadora no está dada por cambios en los niveles de •NO [229] (Figura 10).



**Figura 10. Acción del NO<sub>2</sub>AA sobre la activación y agregación plaquetaria y la relajación de las células músculo liso vascular.** El NO<sub>2</sub>AA es capaz de inhibir la producción de TxA<sub>2</sub> inhibiendo la PGHS-1; además inhibe la PKC en su conjunto modulando la activación y agregación plaquetaria en el vaso sanguíneo [226]. Asimismo, el NO<sub>2</sub>AA activa la Guanilato Ciclasa aumentando los niveles de GMPc que conduce a la vasorelajación de las células de músculo liso [229].

### 2.4.3 Rol terapéutico del NO<sub>2</sub>AA

El rol terapéutico del NO<sub>2</sub>AA fue evaluado en dos modelos patológicos: uno de daño renal y otro de enfermedad neurodegenerativa. El papel de las ROS en la disfunción endotelial, el remodelado cardiovascular y renal, inflamación y fibrosis inducidos por la angiotensina-II (ANG II) ha sido bien documentada [230]. Las acciones de la ANG II involucran como eventos críticos el aumento de la generación de ROS intracelulares, así como la activación de cascadas de señalización redox sensibles [231]. La ANG II induce la producción de ROS excesiva y la disfunción mitocondrial, que finalmente conduce a la apoptosis y la necrosis de las células tubulares renales [232]. La administración del NO<sub>2</sub>AA modula el daño inflamatorio mediado por ANG II en células de epitelio renal a través de la disminución en la formación de peroxinitrito y la disfunción mitocondrial

posterior. La protección de la función mitocondrial por NO<sub>2</sub>AA en un modelo de lesión renal destaca su uso como una antioxidante mitocondrial [233].

Otro modelo patológico usado fue el de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por parálisis muscular progresiva por muerte de motoneuronas. El 10-20% de los casos de ELA familiar son causadas por mutaciones de la superóxido dismutasa 1 (SOD1). Los estudios de la capacidad de actuar del NO<sub>2</sub>AA fue realizado utilizando motoneuronas obtenidas de ratones hSOD1<sup>G93A</sup> que sobreexpresan la hSOD1 mutada [234]. Recientemente, fue descrito que la administración de NO<sub>2</sub>AA a un cultivo de astrocitos obtenidos de ratones SOD1<sup>G93A</sup> causó una disminución de la muerte de las neuronas motoras, así como la activación de Nrf2 y la inducción de enzimas antioxidantes de fase II y junto a un aumento en los niveles de glutatión total [222]. Por lo tanto, el aumento de las defensas antioxidantes inducidos por el tratamiento NO<sub>2</sub>AA podría potencialmente mejorar la capacidad antioxidante en astrocitos y ser parcialmente responsable de la protección observada. Teniendo en cuenta que el sistema nervioso central es abundante en AA, es posible que el NO<sub>2</sub>AA sea generado como una respuesta adaptativa durante condiciones inflamatorias para proteger a las neuronas motoras.

### **3 HIPOTESIS**

En procesos inflamatorios crónicos, donde la nitración de AA puede ocurrir debido a condiciones de estrés nitro-oxidativo, el NO<sub>2</sub>AA podría modular la expresión y/o actividad de enzimas inducibles clave (por ejemplo, NOS2 o PGHS-2, HO-1) ayudando en la resolución de los procesos inflamatorios. Nuestra hipótesis propone al NO<sub>2</sub>AA como un mediador antiinflamatorios, disminuyendo el estrés oxidativo a través de la inhibición de la actividad y/o expresión a nivel macrofágico de enzimas productoras de ROS, en particular la NOX2.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto y los mecanismos de acción del NO<sub>2</sub>AA sobre la NADPH oxidasa fagocítica (NOX2).

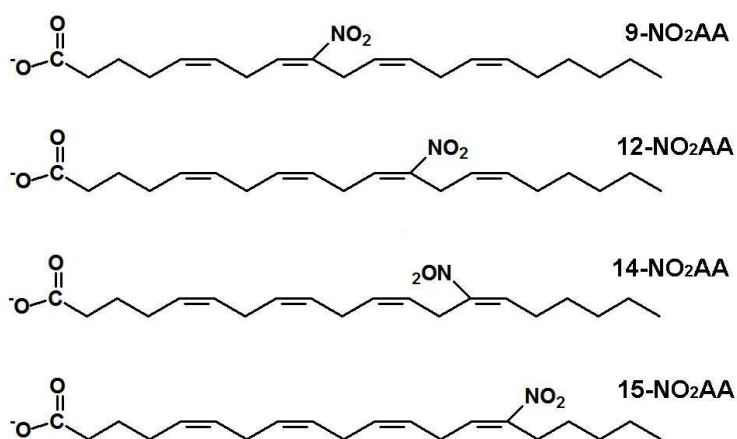
### **4.2 Objetivos específicos**

1. Estudiar los efectos del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NADPH oxidasa fagocítica.
2. Analizar los mecanismos de acción involucrados en la acción del NO<sub>2</sub>AA sobre la NOX2.
3. Analizar la interacción entre el NO<sub>2</sub>AA y la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI).
4. Elucidar el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la PDI en macrófagos y el rol de PDI en la inhibición de la actividad NOX2.

## 5 Materiales y Métodos

Se realiza la descripción de las metodologías utilizadas de acuerdo a las actividades definidas para cada objetivo planteado.

El ácido nitroaraquidónico ( $\text{NO}_2\text{AA}$ ) fue sintetizado y cuantificado en nuestro laboratorio como se describió previamente [221]. Para la síntesis del  $\text{NO}_2\text{AA}$ , el AA se incubó con  $\text{NaNO}_2$  en una relación molar 1:1 a  $25^\circ\text{C}$  bajo agitación continua por una hora en condiciones aeróbicas. La reacción se detuvo mediante la extracción del componente lipídico del sistema por el agregado de acetato de etilo/ $\text{NaCl}_{\text{sat}}$  (1:2, v:v) y se colectó la fase orgánica (fase inferior en el tubo). La fase orgánica se lava dos veces con  $\text{NaCl}_{\text{sat}}$  y luego se evapora con  $\text{N}_2$ ; los productos de la reacción se resuspenden en metanol (MeOH). La mezcla obtenida se analizó por TLC analítica utilizando hexano:dietiléter:acético (80:20:0.1) como fase móvil y anisaldehído como revelador, o por espectrometría de masa (MS). Las fracciones con  $\text{NO}_2\text{AA}$  puro fueron evaporadas en ambiente de  $\text{N}_2$ , resuspendidas en metanol, y analizadas y cuantificadas por LC-MS/MS. Las fracciones de  $\text{NO}_2\text{AA}$  purificadas se separaron en alícuotas que se almacenan a  $-80^\circ\text{C}$ . Para los experimentos con  $\text{NO}_2\text{AA}$  el porcentaje de MeOH en las muestras fueron menores al 1%. En todos los casos se realizaron los controles con el vehículo para verificar que no afectaron el resultado del mismo. El  $\text{NO}_2\text{AA}$  utilizado corresponde a una mezcla de isómeros siendo los mayoritarios 4 isómeros: 9-, 12-, 14-, y 15- $\text{NO}_2\text{AA}$  (Figura 11).



**Figura 11. Isómeros mayoritarios obtenidas de la purificación de  $\text{NO}_2\text{AA}$ . Los 4 isómeros mayoritarios son: 9-, 12-, 14-, y 15- $\text{NO}_2\text{AA}$  [221].**

Los experimentos fueron realizados como mínimo tres veces, por lo menos por triplicado, en días independientes. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desviación standard, a menos que se indique algo distinto. Las medias fueron comparadas utilizando test de Student o test de ANOVA, considerando diferencias significativas aquellos datos que presentan un  $p < 0,05$ .

## **5.1 Evaluación de los efectos del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NADPH oxidasa fagocítica (NOX2).**

### ***Cultivo de macrófagos de línea celular***

La línea celular J774A.1 se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC). Es derivada de un reticulosarcoma murino de la cepa BALB/c, inducida bajo forma de ascitis [235], comparte con los macrófagos primarios gran parte de sus características, tal como la fagocitosis, síntesis y secreción de lisozima y proteasas neutras y expresión de receptores Fc y C3. El cultivo de esta línea se realizó en 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) comercial 1.0 g/L de glucosa, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomycin y 10 % suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (a 56°C por 20 minutos). Se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

Los experimentos se realizaron en placas de 6 o 24 pocillos usando el *buffer* Dulbecco's PBS (dPBS: 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.7 mM KCl, 1.45 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) suplementado con 5,5 mM glucosa y 1 mM L-arginina o en el medio de cultivo DMEM según se indica en cada caso en la sección de resultados. Las células fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer.

### ***Cultivo de macrófagos primarios***

La extracción de macrófagos de bazo de rata se realizó como se describe en [236] con modificaciones. Las ratas Wister fueron suministradas por la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de Facultad de Medicina y todos los

procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas de experimentación animal de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) (Exp. N° 071140-001050-12). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el bazo seguido de homogeneizado mecánico. El extracto obtenido presenta un remanente de glóbulos rojos, los cuales fueron lisados por shock hipotónico. Las células de bazo fueron sembradas en placas de vidrio y mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de SBF. Se descartaron las células en suspensión y las células adheridas se sembraron en placas de 24 pocillos, obteniendo un cultivo enriquecido de macrófagos para la realización de los experimentos correspondientes [236].

Para la extracción de macrófagos primarios de medula ósea de ratones knockout de NOX2, se utilizaron ratones C57BL/6 gp91<sup>phox</sup>-/- obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) [78, 143]. Todos los animales estudiados fueron tratados de acuerdo a las normas de experimentación animal de la CHEA (Exp. N° 071140-000880-12). Para la obtención de los macrófagos, los ratones C57BL/6 wild type (WT) y gp91<sup>phox</sup>-/- fueron sacrificados, se extrajeron la tibia y el fémur de forma estéril en PBS, las epífisis fueron removidas y los huesos se lavaron abundantemente con una jeringa conteniendo medio RPMI para extraer la médula ósea. Para la diferenciación a macrófagos, las células obtenidas fueron expuestas a medio condicionado de células L929 por 7 días como fuente de factores estimulantes de colonia de granulocitos/macrófagos [237, 238]. Para los experimentos donde se utilizaron estos macrófagos, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos y se mantuvieron con medio DMEM suplementado con 10% de SBF hasta su tratamiento. Se contaron las células utilizando una cámara de Neubauer.

### ***Purificación de neutrófilos humanos***

Los neutrófilos humanos fueron purificados a partir de 20 mL sangre entera según el protocolo reportado [239]. La sangre fue mezclada con el anticoagulante Citrato trisódico en una relación 1:3 (peso/volumen) resuspendido en *buffer* Krebs (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, y 2 mM D-glucosa, pH 7.4) y HetaSep (Stemcell technologies). La sangre

fue sedimentada por 45 minutos a 25°C y la capa de plasma superior fue recuperada, traspasada a un tubo y fue agregado lentamente Lymphoprep frío (2:1 de plasma/Lymphoprep). La mezcla fue centrifugada a 800g por 20 minutos a 4°C resuspendiendo el pellet en PBS frío y 0,4 % Citrato trisódico (peso/volumen) y centrifugado nuevamente a 400g por 5 minutos a 4°C. Los eritrocitos fueron removidos usando tres ciclos de lisis hipotónica. Finalmente las células fueron resuspendidas con *buffer* Krebs, contadas y fueron diluidas a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/mL y mantenidas a 4°C [239].

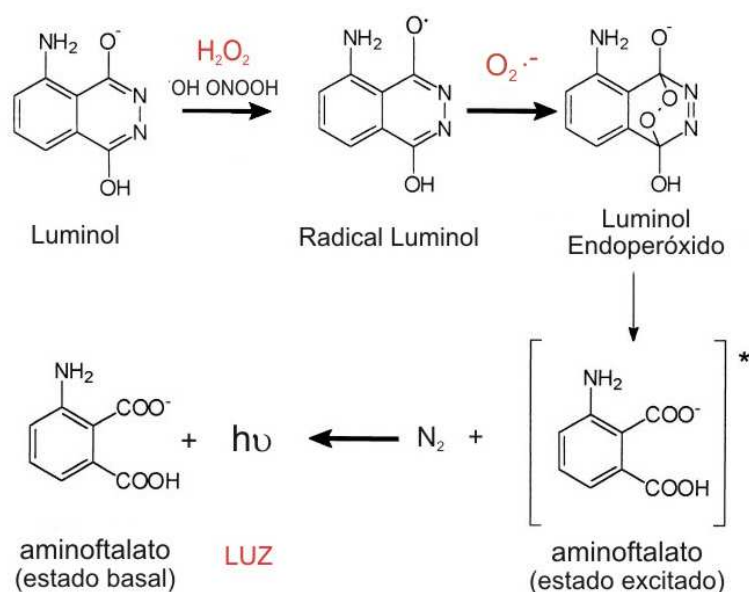
### **Actividad NADPH oxidasa**

Para los experimentos de actividad de la NOX2, los macrófagos de línea celular J774A.1 o los macrófagos primarios fueron sembrados en placas de 24 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) y las células fueron activadas a 37°C por exposición con el éster de forbol PMA (3 µg/mL en dimetil sulfóxido, DMSO) [240] o zimosan opsonizado (ZOP, 1.2 mg/mL). El ZOP fue preparado por incubación de zimosan con plasma humano fresco por 20 minutos a 37°C, seguido de tres lavados con PBS mediante centrifugación a 1000 g por 5 minutos a 4°C [241]. La condición control corresponde a las células en ausencia de estímulo. Controles con la misma cantidad de DMSO (vehículo de PMA) fueron realizados, sin observar toxicidad a las concentraciones utilizadas.

Para los ensayos de actividad de la NOX2 en neutrófilos humanos, las células en suspensión fueron diluidas en placas de 24 pocillos de suspensión ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) y las células fueron activadas a 37°C por exposición con PMA (3 µg/mL) o el péptido N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP, 10 µM) [242].

La actividad de la enzima NOX2 en los macrófagos fue determinada mediante a) formación de  $O_2^{\bullet-}$  por el ensayo de reducción de citocromo c inhibible por SOD [243]; b) formación de  $O_2^{\bullet-}$  y su producto de dismutación espontánea, el  $H_2O_2$  por luminiscencia del Luminol [244, 245]; c) formación de  $H_2O_2$  por fluorescencia del Amplex Red en presencia de la peroxidasa HRP [246].

- a) Reducción del cit c. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  fue determinado midiendo la reducción del citocromo c por el  $O_2^{\bullet-}$  medido por absorbancia a 550 nm ( $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [243]. Los macrófagos ( $5 \times 10^5$  células) fueron activados con PMA o ZOP en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de citocromo c en *buffer* dPBS y se midió la absorbancia a 550 nm por 1 hora de forma continua en un lector de placa (Varioskan). Se incluyó un control con la SOD (600 U/ml) que cataliza la reacción de dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  formando  $H_2O_2$  para verificar que la reducción es debido a la producción de  $O_2^{\bullet-}$ . La actividad de NOX2 se calculó como la pendiente del gráfico primario.
- b) Luminiscencia del luminol. Para los ensayos de luminiscencia, se utilizó el reactivo luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona), reactivo que reacciona con  $H_2O_2$  formando el luminol radical el cual por reacción con  $O_2^{\bullet-}$  forma un endoperóxido que genera el aminoftalato en estado excitado y decaer al estado basal liberando luz (Figura 12) [247]. Los macrófagos confluentes ( $5 \times 10^5$  células) fueron activados con PMA o ZOP junto con el luminol (100  $\mu\text{M}$ ) en dPBS. La formación de  $O_2^{\bullet-}$  fue analizado siguiendo la luminiscencia por la oxidación de luminol a 37°C en un lector de luminiscencia en placa por 1 hora de forma continua (Lumistar, BMG Labtechnologies). La actividad de la NOX2 se determinó como el punto máximo de luminiscencia. Se incluyó el control sin luminol.



**Figura 12. Oxidación del Luminol durante la formación de  $O_2^{\bullet-}$ .** El luminol reactivo que reacciona con  $H_2O_2$  formando el luminol radical el cual por reacción con  $O_2^{\bullet-}$  forma un endoperóxido que genera el aminofalato en estado excitado y decaer al estado basal liberando luz. Adaptado de [247].

c) Fluorescencia del Amplex Red. La actividad de NOX2 fue estudiada mediante oxidación del Amplex Red (Invitrogen-Molecular Probes), el cual reacciona con el  $H_2O_2$ , producto de dismutación del  $O_2^{\bullet-}$ , que en presencia de la peroxidasa HRP genera la molécula fluorescente Resorufina [246]. Los macrófagos fueron activados con PMA o ZOP en presencia de 50  $\mu$ M de Amplex Red y 4  $\mu$ g/mL de HRP en dPBS. La fluorescencia del Amplex Red ( $\lambda_{ex}$ = 515 nm,  $\lambda_{em}$ = 590 nm) fue medida a 37°C en un lector en placa de fluorescencia (Fluostar, BMG Labtechnologies). La actividad NOX2 se determinó como la pendiente inicial de los gráficos primarios.

Para los tratamientos con  $NO_2AA$ , los macrófagos fueron tratados con  $NO_2AA$  (1-50  $\mu$ M) en dPBS a 37°C 15 minutos o 60 minutos según el experimento, y luego se activaron con PMA o ZOP. Para los experimentos de dependencia del tiempo de incubación fue utilizado 10  $\mu$ M de  $NO_2AA$  incubado entre 15 y 120 minutos, mientras que para los ensayos de dependencia de la dosis se utilizó entre 1-10  $\mu$ M de  $NO_2AA$ . En todos los casos se determinó la actividad NOX2 por Luminiscencia del luminol y fluorescencia del Amplex Red. En todos los casos, los controles con AA (10 o 50  $\mu$ M), fueron realizados para confirmar los efectos debidos a la adición del grupo  $-NO_2$  a la cadena carbonada, así como el control con el nitroalqueno en ausencia de activación. Como control se utilizó un inhibidor de la NOX2, el difeniliodonio (DPI) [248, 249]; 50 $\mu$ M de DPI por 15 minutos fue incubado previamente a la adición del activador.

Para los experimentos con neutrófilos humanos, las células fueron incubadas con 1 y 5  $\mu$ M de  $NO_2AA$  y activadas con 10  $\mu$ M de fMLP midiendo la actividad NOx2 por reducción de citocromo c. Además fueron incubados con 2, 5 y 10  $\mu$ M de  $NO_2AA$  y activados con 3  $\mu$ g/mL PMA midiendo la actividad NOX2 mediante el ensayo de fluorescencia de Amplex Red en presencia de HRP. La condición de  $NO_2AA$  sin activar fue incluida.

## **Viabilidad celular**

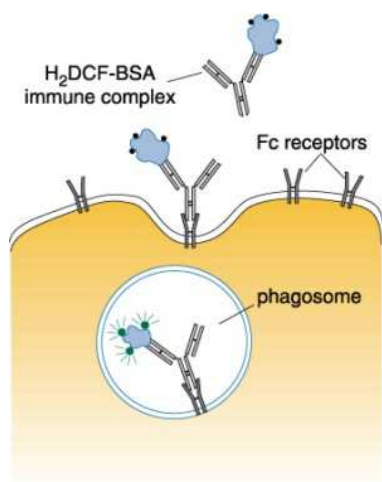
Los efectos del NO<sub>2</sub>AA sobre la viabilidad celular fue analizada usando los ensayos de a) MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) [250] y b) Ioduro de propidio (IP) [251].

- a) Ensayo de MTT. La viabilidad celular fue analizado por la reducción metabólica del Bromuro de MTT realizada por la capacidad reductora celular en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad celular [250]. Los macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) incubados con NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M) o vehículo (MeOH) en *buffer* dPBS a 37°C por 24 h. Las células fueron lavadas con dPBS y tratadas con solución de MTT (5 mg/mL) con Metosulfato de Fenazina (PMS, 0,22 mg/mL) por 45 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas con dPBS, seguido de la adición de DMSO y *buffer* fosfato Sorensen (0.133 M, pH 7.2). Las células muertas adquirieron una coloración azul, y fue cuantificada por absorbancia a 576 nm ( $\epsilon = 16.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) utilizando un lector de placa (Varioskan). El porcentaje de viabilidad por MTT fue determinado definiendo como 100% la absorbancia de las células sin tratar.
- b) Ensayo de IP. Para determinar la toxicidad del nitroalqueno se realizó el ensayo con Ioduro de Propidio (IP) el cual es un agente intercalante de ácidos nucleicos que cuando la célula presenta daños en la membrana plasmática, el IP es capaz de entrar a las célula e intercalarse en el ADN aumentando su fluorescencia [251]. Los macrófagos J774.1 ( $5 \times 10^5$  células) fueron incubados con NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M) o vehículo (MeOH) a 37°C por 1h, 5h y 24h en *buffer* dPBS. Los macrófagos fueron lavados y tratados con IP por 30 minutos en oscuridad a 37°C. Las células fueron lavadas dos veces por 1 minuto con dPBS, puestas en suspensión y la fluorescencia medida por citometría de flujo ( $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=585 \text{ nm}$ ). Se determinó una región de alta fluorescencia llamada M2 y el porcentaje de células muertas fue definido como el porcentaje de células que se encuentran de M2.

## **Oxidación de Fc-oxyBURST**



Para evaluar la liberación de  $O_2^{\bullet-}$  durante la fagocitosis se utilizaron los complejos inmunes Fc-oxyBURST (OxyB, Invitrogen-Molecular Probes). Estas moléculas están formadas por moléculas de seroalbumina bovina (BSA) conjugadas con 5,7-dihidroxiclorofluoresceína ( $H_2DCF$ ) e IgG que exponen su fracción Fc al medio [252]. Esta estructura permite, luego del reconocimiento por parte de los receptores Fc, fagocitadas y oxidada a  $H_2DCF$  generando diclorofluoresceína (DCF) dentro del fagosoma aumentando la fluorescencia (Figura 13). Los macrófagos J774A.1 ( $1 \times 10^6$  células) fueron tratados con vehículo, AA ( $10 \mu M$ ),  $NO_2AA$  ( $10 \mu M$ ) o DPI ( $50 \mu M$ ) por 60 minutos a  $37^\circ C$  en dPBS. Luego las células fueron lavadas con dPBS dos veces por 1 minuto y se incubaron con  $50 \mu g/mL$  OxyB por una hora. Las células fueron levantadas, lavadas 3 veces por 1 minuto con dPBS para eliminar el exceso de OxyB y resuspendidas en dPBS, y se dejaron en oscuridad para su análisis. La fluorescencia por la oxidación de OxyB fue medida por citometría de flujo en un FACS Calibur (BD Biosciences) ( $\lambda_{ex} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 530$  nm).



**Figura 13. Estructura y mecanismo de acción del Fc-OxyBURST.** El Fc-OxyBURST (OxyB) consiste en una molécula de BSA (azul) unida a una molécula de diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCF$ ) y acompañado con anticuerpo IgG anti-BSA. El OxyB es reconocido por el receptor Fc de los macrófagos y es internalizado. La  $H_2DCF$  se oxida a DCF fluorescente por los oxidantes formados dentro del fagosoma, como ser el  $O_2^{\bullet-}$  de la NOX2. Imagen extraída del datasheet del producto.

### **Capacidad fagocítica de los macrófagos**

Para estudiar la capacidad de fagocitosis, se utilizaron partículas o beads conjugadas con fluoresceína (FITC-beads), las cuales son reconocidas y fagocitadas por los macrófagos [253]. Los macrófagos J774A.1 confluentes ( $1 \times 10^6$  células) fueron incubados por 15 minutos a  $37^\circ C$  en dPBS, en presencia y ausencia

de 10  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2\text{AA}$ . Luego del tratamiento, las células fueron lavadas y se trataron con FITC-beads por 3h a 37°C en dPBS. Como control positivo de la inhibición, los macrófagos fueron incubados 1 hora a 37°C previo al agregado de FITC-beads con 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor de la fagocitosis citocalasina B [254]. Las células fueron levantadas, lavadas 3 veces por 1 minuto con dPBS para eliminar el exceso de FITC-beads y resuspendidas en buffer dPBS. La fluorescencia intracelular fue medida por citometría de flujo un FACS Calibur (BD Biosciences) ( $\lambda_{\text{ex}}= 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 520 \text{ nm}$ ).

### ***Modelo animal de respuesta inflamatoria inducida por Tioglicolato***

Los efectos ejercidos por el  $\text{NO}_2\text{AA}$  fueron evaluados *in vivo* en un modelo animal de respuesta inflamatoria por tioglicolato. Se estudió la actividad de NOX2 en los macrófagos extraídos de animales tratados con  $\text{NO}_2\text{AA}$  y con tioglicolato. Se utilizaron ratones C57BL/6 machos, los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con tioglicolato (10%v/v) como forma de inducir un proceso inflamatorio agudo [255] (día 0). Para analizar la capacidad protectora del  $\text{NO}_2\text{AA}$ , los animales fueron divididos en tres grupos, los que recibieron de vía forma subcutánea una vez por día durante 3 días, vehículo,  $\text{NO}_2\text{AA}$  (10  $\mu\text{M}$  / día) o AA (10  $\mu\text{M}$  / día) respectivamente. Cada grupo de animales contó con un grupo paralelo de animales control que correspondía al tratamiento recibido (vehículo, AA y  $\text{NO}_2\text{AA}$ ) sin la inyección con tioglicolato. Al cuarto día los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y los macrófagos peritoneales fueron extraídos por inyección con medio de cultivo DMEM frío [255]. Los macrófagos fueron contados y sembrados en placa de 24 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) y activados con PMA (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en dPBS a 37°C. Además fue incluida una condición con DPI (50  $\mu\text{M}$ ) por 15 minutos en dPBS a 37°C previo al PMA. Los macrófagos extraídos de ratón sin tioglicolato no fueron suficientes para la medición de la actividad NOX2. La actividad de la NADPH oxidasa de los macrófagos fue determinada mediante la fluorescencia del Amplex Red en presencia de HRP, como se describió previamente. Todos los procedimientos con animales fueron realizados siguiendo las pautas de la CHEA (Expediente Nro. 070153-000308-16).

## 5.2 Determinación del mecanismo de acción del NO<sub>2</sub>AA sobre la inhibición de NOX2

### *Preparación de fracciones subcelulares*

Para los ensayos de distribución de p47<sup>phox</sup> se realizó la separación de las fracciones subcelulares de membrana y citosólica [256]. Los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>6</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (10 μM) o AA (10 μM) por 15 min a 37°C en dPBS y activados con PMA (3 μg/mL) por 15 min a 37°C en dPBS. Las células fueron levantadas, lavadas y resuspendidas en buffer de fraccionamiento subcelular (250 mM Sacarosa, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA), conteniendo cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Las células fueron lisadas por sonicación y el lisado resultante fue centrifugado a 1000g por 10 minutos para eliminar células enteras. El sobrenadante fue centrifugado a 10000g por 20 minutos reservando el sobrenadante, el cual fue nuevamente centrifugado a 100000g por 1 hora obteniendo las fracciones de membrana (pellet) y fracción citosólica (sobrenadante) [256]. La cuantificación de proteínas se realiza con el ensayo de Bradford [257], y las fracciones fueron conservadas a -20°C.

### *Western blot*

Los estudios de fosforilación y translocación celular de subunidades citosólicas fueron analizados por western blot. Para los estudios de fosforilación de p40<sup>phox</sup>, los macrófagos J774A.1 (1x10<sup>6</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (1-10 μM) por 15 minutos a 37°C con dPBS y fueron activados con PMA (3 μg/mL) por 5 minutos. Luego del tratamiento las células fueron lisadas por sonicación. La cuantificación de proteínas se realiza con el ensayo de Bradford [257]. Para la translocación de subunidades se utilizaron las fracciones subcelulares que fueron preparadas como se describió previamente.

Para todos los casos, las muestras fueron separadas por electroforesis de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en un gel de 10% de poliacrilamida añadiendo un marcador de peso molecular. Las muestras separadas por

electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por método de transferencia semiseca. La transferencia fue verificada mediante la tinción reversible con Rojo Ponceau. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con 5% BSA en PBS e incubada con el anticuerpo primario en agitación overnight a 4°C en PBS con 0.1% tween 20. La membrana fue lavada con buffer PBS 0.1 % tween 20 por 10 minutos por triplicado e incubada por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo o ratón IgG conjugado con IR Dye-800- e IR Dye-680 (Li-cor) o conjugado con HRP (Calbiochem) en PBS con 0.1 % tween 20, dependiendo del método de revelado. Finalmente, la membrana fue lavada por 10 minutos por triplicado y las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas con el sistema de detección de fluorescencia infrarroja (Odyssey, Li-cor Biosciences) o utilizando los sustratos SuperSignal Chemiluminescent (Pierce, USA), respectivamente.

Para los estudios de fosforilación de lisado celular se realizaron western blot usando un anticuerpo policlonal anti-fosfo-40<sup>phox</sup> (Santa Cruz Biotechnology) y se utilizó como control de carga el anticuerpo policlonal anti-actina (Sigma). Para analizar la translocación de las subunidades citosólica a la membrana, fue realizado un western blot de fracciones de membrana y citosol utilizando el anticuerpo monoclonal anti-p47<sup>phox</sup> (Millipore Biotechnologies Inc.). Los controles de carga fueron realizadas con anticuerpos policlonales anti-actina para citosol (Sigma) y anti-gp91<sup>phox</sup> para membrana (Santa Cruz). La cantidad relativa de cada proteína fue determinada a partir del análisis densitométrico de las bandas de cada una de ellas en comparación a un control de carga, utilizando el software ImageJ.

### ***Inmunoprecipitación***

Para estudiar la fosforilación del componente citosólico p47<sup>phox</sup> fue realizado un estudio de inmunoprecipitación. Los macrófagos J774A.1 ( $3 \times 10^6$  células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (1-10  $\mu$ M) por 15 minutos a 37°C con dPBS y activadas con 5 minutos con PMA (3  $\mu$ g/mL) a 37°C en dPBS. La condición control correspondiente a las células sin exposición a PMA fue incluida. Luego, las células fueron levantadas y lisadas con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% tritón x100, 1mM PMSF y 1mM NaF). Las muestras fueron tratadas con suero de conejo por 1 hora a 4°C para precipitar proteínas inespecíficas; se agregó

Protein A/G Agarose (Pierce) y luego las muestras se incubaron por 30 minutos a 4°C bajo agitación seguida de una centrifugación a 10.000g por 15 minutos a 4°C, reservando el sobrenadante. La muestra resultante fue inmunoprecipitada con un anticuerpo policlonal anti-fosfoserina (Santa Cruz Biotechnology) por 90 minutos a 4°C con agitación. Luego se incubó con Protein A/G Agarose (Pierce) durante 4 hs en rotación circular a 4°C y se centrifugó a 10000g por 15 minutos a 4°C, guardando el pellet donde se encuentra el inmunoprecipitado. El inmunoprecipitado fue analizado por western blot como se describió previamente utilizando un anticuerpo policlonal anti-p47<sup>phox</sup> (Millipore Biotechnologies Inc.) y cuantificado por densitometría.

### ***Translocación de p47<sup>phox</sup> por Microscopía confocal***

La translocación subcelular del componente citosólico p47<sup>phox</sup> a la membrana fue estudiado por microscopía confocal [258]. Los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>4</sup> células) sembradas en portaobjetos del Sistema Chamber Slide de 8 pocillos fueron incubados con vehículo, AA (10 µM) o NO<sub>2</sub>AA (10 µM) por 15 minutos a 37°C en dPBS activadas con zimosan conjugado con FITC (Zym-FITC) por 20 minutos a 37°C. Las células fueron fijadas con 3.7 % formaldehído, permeabilizadas con 0.1% de tritón en PBS y bloqueadas con 2% de BSA en PBS. El anticuerpo primario monoclonal anti- p47<sup>phox</sup> (MilliPore Biotechnologies Inc.) fue incubado overnight con 1% de BSA en PBS, luego de dos lavados con PBS fue tratada con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-594 anti-ratón (Invitrogen-Molecular Probes) para detectar su localización intracelular. Las muestras fueron analizadas con un Microscopio confocal TCS SP5 II (Leica Microsystems). En las fotos fue observado p47<sup>phox</sup> en rojo y Zym-FITC en verde y fue realizado el Merge correspondiente a ambos colores en la misma imagen para determinar la colocalización correspondiente al color amarillo.

### 5.3 Análisis de la interacción entre el NO<sub>2</sub>AA y la PDI

#### *Expresión y purificación de la PDI recombinante*

El plásmido para la expresión de la PDI humana recombinante fue cedido por el Dr. Francisco Laurindo del Laboratorio de Biología Vascular de Inco-Faculdade de Medicina, Universidade do Sao Paulo (Brasil). La expresión y purificación de la proteína se realizó de acuerdo a [116]. El gen para la PDI humana se encuentra inserto en un plásmido pET28a (Novagen) que presenta resistencia al antibiótico kanamicina y presenta una His-tag para facilitar su purificación. El plásmido fue transformado en bacterias XL1 blue de *E. coli* que se hicieron competentes con CaCl<sub>2</sub> en frío. Las bacterias fueron sembradas en placa de LB agar con kanamicina (50 µg/mL) a 37°C overnight y el clon correspondiente a las células transformantes fue seleccionado para la realización de un precultivo en medio LB con antibiótico overnight a 37°C con agitación continua. El cultivo fue diluido 100 veces en medio LB con kanamicina y fue cultivado a 37°C con agitación hasta alcanzar densidad celular correspondiente a una absorbancia a 600 nm de 0,6. Posteriormente, las bacterias fueron inducidas con isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG, 0.8 mM) durante 6 horas. Luego las células fueron centrifugadas a 4000g por 20 minutos a 4°C, y el pellet obtenido fue resuspendido en buffer de lisis (8 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) con un inhibidor de proteasas (PMSF). El pellet fue disgregado mediante vortex (1–2 min) y las células fueron lisadas mediante sonicación. El lisado de células fue centrifugado a 20000 g por 25 minutos a 4 °C rescatando el sobrenadante (fracción soluble). La purificación de la proteína fue realizada en una columna de afinidad HiTrap 5mL (Amersham Biosciences) en HPLC y equilibrada con buffer Fosfato de sodio 50 mM pH 7.6, con 10 mM de imidazol y 500mM NaCl, a un flujo de 3 mL/min. La PDI recombinante fue eluida con un gradiente lineal de imidazol (10-500 mM) en buffer fosfato 50 mM pH 7.6 con 500mM de NaCl. El imidazol fue removido usando una columna desalinizadora HiTrap (Amersham Biosciences). La pureza de la proteína así obtenida fue evaluada por SDS-PAGE y teñida con Coomassie Blue. La purificación de la PDI fue confirmada por western blot con un anticuerpo monoclonal anti-PDI. La concentración de proteínas se determinó por el ensayo de Bradford usando BSA como standard [257].

### ***Actividad reductasa de PDI***

La actividad reductasa de la PDI fue medida usando el ensayo de precipitación de la insulina medida por espectrofotometría. La insulina está formada por dos cadenas unidas por enlaces disulfuros que al reducirse por acción de la PDI en presencia de Ditioneitol (DTT) provoca la precipitación de la cadena B que se puede determinar midiendo turbidez a 600 nm [259].

La PDI recombinante (1 $\mu$ M) fue mezclada con 1 $\mu$ M DTT y la reacción iniciada con 1mg/mL insulina (Sigma). La condición con otra proteína, la BSA (10  $\mu$ M) fue incluida como control negativo de la actividad PDI, así como las condiciones sin DTT y sin insulina. El ensayo fue realizado en placa de 96 pocillos. La actividad reductasa de PDI fue determinada siguiendo la precipitación de la insulina midiendo la absorbancia a 600 nm a través del tiempo durante 1h en un lector de placa de absorbancia (Varioskan). La actividad reductasa de PDI fue obtenida de la pendiente inicial del gráfico primario ( $\Delta\text{Abs}_{600\text{nm}}/\Delta t$ ).

Para los ensayos con NO<sub>2</sub>AA, la PDI (1  $\mu$ M) fue incubada con 10  $\mu$ M NO<sub>2</sub>AA, 10  $\mu$ M AA, 10  $\mu$ M de ácido oleico (AO) o vehículo (MeOH) por 15 minutos en buffer fosfato 100 mM pH 7.2, 2 mM EDTA a 25°C. Luego, la actividad fue determinada como se explica más arriba. Además se agregó la condición del nitroalqueno sin agregado de PDI para determinar que no afecta la precipitación de la insulina. Para los ensayos de dosis dependencia del NO<sub>2</sub>AA, la PDI (1  $\mu$ M) fue incubada con concentraciones crecientes de NO<sub>2</sub>AA (1-30 $\mu$ M) por 15 minutos a 37°C mientras que para la dependencia del tiempo de incubación la enzima fue tratada a distintos tiempos de pre-incubación (0-60 min) con 10  $\mu$ M NO<sub>2</sub>AA en buffer fosfato de 100 mM pH 7.2, 2 mM EDTA a 25°C. En todos los casos, luego del tratamiento con el NO<sub>2</sub>AA se midió la actividad reductasa con la insulina.

Para los ensayos con un dador de •NO, la PDI (1  $\mu$ M) fue incubada con 1  $\mu$ M de NOC-7 (Dojindo Molecular Technologies Inc.), con un flujo de •NO de 8  $\mu$ mol de •NO/mmol correspondiente al flujo de •NO liberado por 10  $\mu$ M NO<sub>2</sub>AA/min, e incubado por 15 minutos en buffer Fosfato/EDTA. La medida de actividad reductasa de PDI fue realizada en presencia o ausencia de NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos a 25°C en buffer Fosfato/EDTA. El flujo de liberación de •NO por NOC-7 fue

determinado previamente [221]. El control con NOC-7 en ausencia de PDI fue incluido.

### ***Actividad chaperona de PDI***

La actividad chaperona de PDI fue medida mediante el ensayo de renaturalización de la Proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescence Protein) por la acción chaperona de PDI de acuerdo a [260]. El plásmido de roGFP fue gentilmente cedido por el Dr. Marcelo Comini del Institut Pasteur Montevideo, siendo la roGFP recombinante expresada y purificada en nuestro laboratorio.

Para determinar la actividad chaperona, la GFP fue desnaturalizada por HCl; la GFP desnaturalizada será el sustrato para la reacción de renaturalización. La solución de GFP desnaturalizada por ácido fue preparada con 10  $\mu$ M de roGFP recombinante en buffer desnaturalizante (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.3 mM EDTA, 1 mM DTT) y 125 mM HCl e incubada a temperatura ambiente por 1 minuto (pH= 1.5). La desnaturalización fue confirmada mediante la observación de bajos niveles de fluorescencia de esta condición. La actividad chaperona fue analizada mezclando PDI (2  $\mu$ M) con 5  $\mu$ M GFP desnaturalizada en buffer renaturalizante (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl), y se midió la recuperación de la fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =485 nm,  $\lambda_{em}$ =538 nm) a 25°C por una hora utilizando un lector de placa de fluorescencia (Varioskan). La actividad chaperona fue determinada como la pendiente inicial de los gráficos primarios [260].

Para evaluar el efecto del NO<sub>2</sub>AA, la PDI recombinante humana (2 $\mu$ M) fue incubada con NO<sub>2</sub>AA (10 y 30  $\mu$ M) o con AA (10  $\mu$ M) por 15 minutos a 25 °C en buffer renaturalizante. La condición de nitroalqueno sin PDI fue incluida. Para determinar la dosis dependencia del nitroalqueno sobre la actividad chaperona, la PDI (2 $\mu$ M) fue tratada con diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub>AA (0-30  $\mu$ M) por 15 minutos a 25 °C en buffer renaturalizante. Luego la reacción fue iniciada con el agregado de la solución de GFP desnaturalizada ácida, como se detalló previamente.



### ***Cuantificación de tioles reducidos***

La cuantificación de tioles reducidos se realizó con el reactivo disulfuro 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman), el cual reacciona con un tiolato liberando tionitrobenzoato [261]. La cantidad de tioles reducidos en la enzima PDI luego de la reducción con DTT u oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue determinada mediante la reacción de los tioles reducidos remanentes con DTNB mediante absorbancia a 412 nm. La enzima reducida u oxidada (1-10 μM) fue incubada con 1mM de DTNB y el número de tioles reducidos fue determinado utilizando el coeficiente de absortividad molar  $\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [261].

### ***Ensayo de PEG switch***

Para determinar la formación de un aducto covalente reversible entre NO<sub>2</sub>AA y PDI, hemos utilizado el ensayo de PEG-switch modificado [262]. La PDI recombinante (5μM) fue reducida con DTT en una relación 1:10 por 30 minutos, y el exceso de DTT removido utilizando unidades de filtración por centrifugación (Merck KGaA, Germany). La reducción de la enzima fue confirmada por el ensayo de DTNB. La PDI reducida (5μM) fue tratada con NO<sub>2</sub>AA (relación molar 1:5 o 1:10) por 30 minutos a 37°C en buffer Tris-HCl 100mM, pH 7.4 y los tioles reducidos remanentes que no reaccionaron con el nitroalqueno fueron bloqueados por alquilación con 100mM de N-acetilmaleimida (NEM) por 25 minutos a 50°C en presencia de 1% de SDS. El exceso de NEM fue removido utilizando unidades de filtración por centrifugación. Luego, la PDI fue tratada con β-mercaptoetanol (BME, 500mM) por 60 minutos a 37°C para liberar el nitroalqueno aductado. El exceso de BME fue removido utilizando unidades de filtración por centrifugación. Los tioles liberados fueron marcados con 10mM de metoxipolietilenglicol maleimida (PEG-5000, Sigma) de un peso molecular de 5000 Da, por dos horas en rotación con 0.5% de SDS a 25°C. Las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE seguida de una tinción proteica con Coomassie Blue. Los cambios en la migración de la proteína debido a la alquilación con PEG fue correlacionada utilizando marcadores de peso molecular [262], realizando el gráfico de R<sub>f</sub> vs logPM como curva de calibración.

## ***Espectrometría de masa (MS)***

Para analizar la formación de un aducto covalente entre la PDI y el NO<sub>2</sub>AA se realizaron estudios de espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS), utilizando un espectrómetro de masa triple cuadrupolo con trampa de iones (QTRAP 4500, ABSciex, Framingham, MA) asociado a un HPLC Agilent 1260. La fuente de ionización utilizada en todos los estudios fue de electrospray a presión atmosférica. Para los ensayos de proteína entera, la PDI (5 µM) fue reducida con DTT en una relación 1:10 por 30 minutos a temperatura ambiente, mientras que la oxidación de PDI se realizó por incubación de PDI con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora a 4°C. El exceso de DTT o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue removido con unidades para filtración con centrífuga de 10.000 Da (Merck KGaA, Germany). Las muestras de PDI fueron incubadas con NO<sub>2</sub>AA (1:10) por 30 minutos a 37°C y su exceso también fue eliminado por unidades de filtrado por centrifugación. La PDI tratada fue analizada en modo de ionización positiva utilizando una columna C4 de fase reversa (5 µm, 150 x 1 mm; Grace Vydac). La ionización se realizó con un voltaje de 5 kV y temperatura de 300°C. Los datos adquiridos fueron analizados usando el programa Analyst 1.6.1 (ABSciex, Framingham, MA) y el procesamiento de los mismos mediante el software Peak View (ABSciex, Framingham, MA). Este último nos permitió determinar el peso molecular de la proteína. La formación de aductos covalentes entre la proteína y el nitroalqueno fue determinada como el aumento de la masa de la proteína de 348 Da por cada NO<sub>2</sub>AA [221]

Para detectar el/los residuos de la proteína modificados, la PDI (5 µM) reducida nativa o tratada con NO<sub>2</sub>AA (relación molar 1:10 molar) se incubaron por 16 horas en buffer pirofosfato 50 mM, pH 7.4 a 25°C con tripsina porcina de grado de secuenciación (Promega) en una relación 1:50 (w/w) de enzima:substrato [263]. Los péptidos obtenidos fueron analizados por LC-MS usando el QTRAP4500. Los péptidos fueron separados con una columna de C18 de fase reversa (5 µm, 2.1 x 150 mm, 300 Å, de Grace Vydac). Los análisis de péptidos por MS y MS/MS fue realizada en modo positivo usando un rango de masa/carga (*m/z*) de 100–2000. Los análisis de los péptidos obtenidos así como de las series *y*- y *b*-, para la determinación de los residuos modificados, fueron obtenidos usando el software Peak View. La identidad de la proteína a través de los péptidos obtenidos de la tripsinización fueron identificados utilizando la base de datos MASCOT [263].

## **5.4 Estudio del efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la PDI en macrófagos y su relación con la actividad NOX2**

### ***Expresión de PDI en macrófagos***

Para determinar la cantidad de PDI en macrófagos, las células J774A.1 fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (2 y 10 µM) por 15 minutos en dPBS a 37°C, lavadas dos veces con dPBS por un minuto y activadas con PMA (3µg/mL) como previamente. Se agregó un control con AA (10 µM) y con el nitrolípido sin activar como controles. Las células fueron levantadas y lisadas por sonicación. La presencia de PDI fue evaluada por western blot usando anticuerpo monoclonal anti-PDI (Abcam) y el anticuerpo anti-actina como proteína reportera constitutiva. La cuantificación fue realizada por densitometría de las bandas respecto al control de carga (actina), utilizando el software ImageJ.

### ***Distribución de PDI en los macrófagos***

Para los ensayos de distribución de PDI, los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>4</sup> células) sembradas en un portaobjetos del Sistema Chamber Slide de 8 pocillos fueron incubados con NO<sub>2</sub>AA (10 µM) por 15 minutos o 60 minutos a 37°C en dPBS. Luego las células fueron lavadas con dPBS dos veces por un minuto y fueron activadas con PMA (3 µg/mL) por 15 minutos. El control corresponde a la incubación con 10 µM NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos de las células sin activar. También fue agregada una condición en presencia del inhibidor de PDI, el Tiomuscimol (Tiom, 10 µM) por 15 minutos en dPBS. Las células fueron fijadas, permeabilizadas, bloqueadas como anteriormente, y fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-PDI (Abcam) overnight seguida de la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor-488 (Invitrogen-Molecular Probes) (verde). Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las muestras fueron analizadas con un Microscopio confocal LSM 510 META (Zeiss Microsystems) del Laboratorio de Biología Vascular de Incor-Faculdade de Medicina, USP (Brasil).

Para el análisis de las fibras de actina fue utilizada la faloidina, una toxina que interacciona con gran afinidad a las fibras F de actina por lo que se usa como marcador [264]. Los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>4</sup> células) fueron tratados con 10 µM

NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos a 37°C en PBS y activadas con PMA por 15 minutos como se describió previamente. Las muestras fueron tratadas con anticuerpo primario anti-PDI (Abcam) overnight y anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor-488 (Invitrogen-Molecular Probes). La faloidina conjugada con Alexa Fluor-647 (Invitrogen-Molecular Probes) fue agregada con el anticuerpo secundario y el núcleo fue marcado con DAPI. El marcado fue realizado observando la actina en color violeta, la PDI en verde y los núcleos en color azul.

Para los estudios de colocalización de PDI y p47<sup>phox</sup>, los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>4</sup> células) fueron tratados con 10 µM NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos a 37°C en PBS y activados con PMA por 15 minutos como se describió previamente. Todas las células fueron primero fijadas, permeabilizadas y bloqueadas y se marcó con anticuerpo primario de ratón anti-PDI (Abcam) y anticuerpo primario de conejo anti-p47<sup>phox</sup> (Millipore) overnight, utilizando como anticuerpos secundarios el anti-ratón Alexa Fluor-488 y anti-conejo Alexa Fluor-596. Además los núcleos fueron marcados con DAPI. La PDI fue marcada en verde, la p47<sup>phox</sup> en rojo y los núcleos fueron marcados en azul observados en el Microscopio confocal LSM 510 META (Zeiss Microsystems). El Merge fue realizado por la coincidencia del marcaje de los tres colores observando en amarillo la colocalización de rojo y verde.

### ***Inhibición de PDI en la actividad NOX2***

Para determinar si la inhibición de PDI afecta a la actividad NOX2 se utilizó un inhibidor de PDI (Tiom). Los macrófagos J774A.1 fueron sembrados en placas de 24 pocillos (5x10<sup>5</sup> células/pocillo) y tratados con NO<sub>2</sub>AA (10 µM), Tiom (10 µM) o DPI (50 µM) por 15 minutos a 37°C en buffer dPBS. Además se incluyó la condición de Tiom sin activación celular. Luego las células fueron lavadas y activadas con PMA (3µg/mL) a 37°C. La formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> fue determinada por fluorescencia del Amplex Red (50 µM) en presencia de HRP (4 µg/ml) en un lector de placa de fluorescencia (Varioskan) ( $\lambda_{ex}$ = 515 nm,  $\lambda_{em}$ = 590 nm) [246]. El porcentaje de actividad NOX2 fue determinado según las pendientes iniciales, definiendo como 100% a la condición con PMA.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación de los efectos del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NADPH oxidasa fagocítica (NOX2)

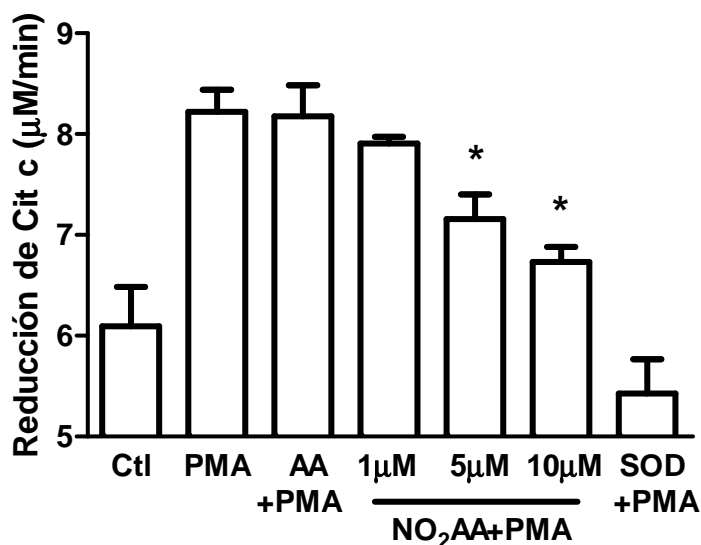
Los efectos protectores reportados para el NO<sub>2</sub>AA [221, 227] sugieren que pueda contribuir a la disminución de respuestas inflamatorias en los macrófagos. Hasta la realización de nuestros estudios, los conocimientos sobre la capacidad de NO<sub>2</sub>AA para regular la producción de especies reactivas del oxígeno en condiciones pro-inflamatorias eran mínimos. Por tanto decidimos evaluar los efectos de NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NOX fagocítica (NOX2) en macrófagos activados, analizando los efectos del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad de la enzima así como sobre la funcionalidad macrofágica, utilizando macrófagos de línea celular y primarios.

#### 6.1.1 Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NOX2 en macrófagos

Se analizó el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en macrófagos murinos J774A.1 de línea celular activados usando dos mediadores químicos que actúan a distintos niveles intracelulares: *i*) el activador sintético PMA que activa directamente a PKC y desencadena el ensamblaje y activación de la NOX2; *ii*) ZOP que son preparados de pared celular de levaduras que son reconocidas por Receptores tipo Toll a la NOX2 mediante la vía fagocítica [241]. La actividad de la NOX2 fue analizada por determinaciones directas de la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> o detectando el producto de dismutación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los ensayos utilizados para la detección directa de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> correspondieron al estudio de la reducción de citocromo c inhibible por SOD (Figuras 14 y 18), mientras que la detección de los derivados del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> fue analizada mediante estudios de luminiscencia del Luminol (Figura 15) y la fluorescencia del Amplex Red (Figura 16).

Primero se estudió la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mediante el ensayo de reducción de citocromo c (cit c) inhibible por SOD en macrófagos incubados con NO<sub>2</sub>AA o AA y activados con PMA (Figura 14). La reducción del cit c (Fe<sup>3+</sup>) por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> genera

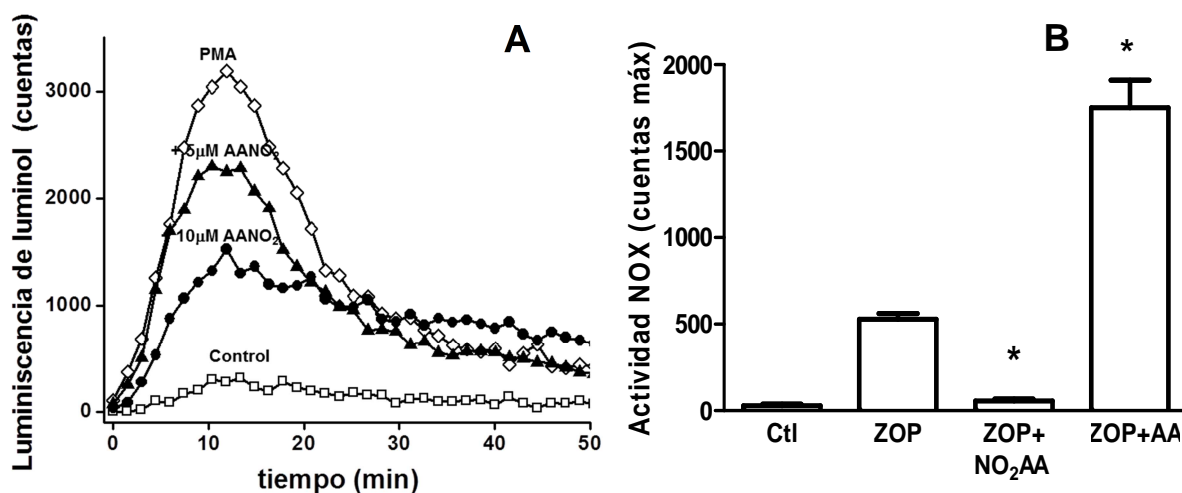
ferrocitocromo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) el cual es detectable por absorbancia a 550 nm. Como pueden estar presentes otras sustancias que reduzcan al cit c, es necesario confirmar la naturaleza del reductor en presencia de la SOD que inhibe la reducción de cit c por competencia por el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [243]. Se observó un aumento de la reducción de cit c en presencia de PMA siendo inhibida en presencia de la enzima SOD, verificando que dicha reducción es debida a la presencia de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Figura 14).



**Figura 14. Inhibición de la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por  $\text{NO}_2\text{AA}$ .** Los macrófagos de línea celular J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) fueron tratados con  $\text{NO}_2\text{AA}$  (1, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ) o AA (10  $\mu\text{M}$ ) por 1 hora en buffer dPBS a 37°C. Las células fueron lavadas y activadas con PMA (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de citocromo c. La reducción de citocromo c fue medida a 550 nm durante una hora ( $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Se incluyó un control con SOD (600 U/ml). Se muestran los valores correspondientes a la pendiente del gráfico primario y corresponden a la media  $\pm$  SD,  $n=3$ . \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición con PMA,  $p < 0.05$ .

El tratamiento con el  $\text{NO}_2\text{AA}$ , previo a la activación con PMA, disminuyó la reducción del cit c implicando una inhibición de la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Dicha disminución aumenta con concentraciones crecientes del nitroalqueno (Figura 14). En cambio, el AA no generó ningún efecto en estas condiciones (Figura 14), por lo que el efecto inhibitorio observado depende de la presencia del grupo nitro en el AA. El efecto de  $\text{NO}_2\text{AA}$  sobre la NOX2 se confirmó por luminiscencia del Luminol [244, 245] (Figura 15). El luminol es oxidado por el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que produce un endoperóxido que se descompone con la liberación de un fotón. A diferencia de los experimentos de reducción de cit c donde lo que se mide es la acumulación del

producto ferrocitocromo c, los experimentos de luminiscencia registran la emisión de cuentas de luz durante la reacción del  $O_2^{\bullet-}$  y el luminol. La luminiscencia obtenida representa la generación de  $O_2^{\bullet-}$  con un máximo de luminiscencia correspondiente al máximo de actividad de la enzima cercano a los 15 minutos en presencia de PMA que corresponde al estallido respiratorio (Figura 15A). La incubación con  $NO_2AA$  presentó una disminución del pico de luminiscencia indicando una inhibición de la actividad NOX2 (Figura 15A). Utilizando el Zimosan osonizado como activador también se observa la disminución en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en presencia del nitroalqueno (Figura 15B), indicando que la inhibición de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  por  $NO_2AA$  es independiente del agonista de la activación macrofágica utilizado. Asimismo, en este caso observamos un aumento de la activación del ZOP con AA, lo cual puede explicarse por los efectos activadores del AA ya reportados [84-86], no observado con PMA posiblemente porque como la activación con PMA es tan potente que la activación por AA no se aprecia.



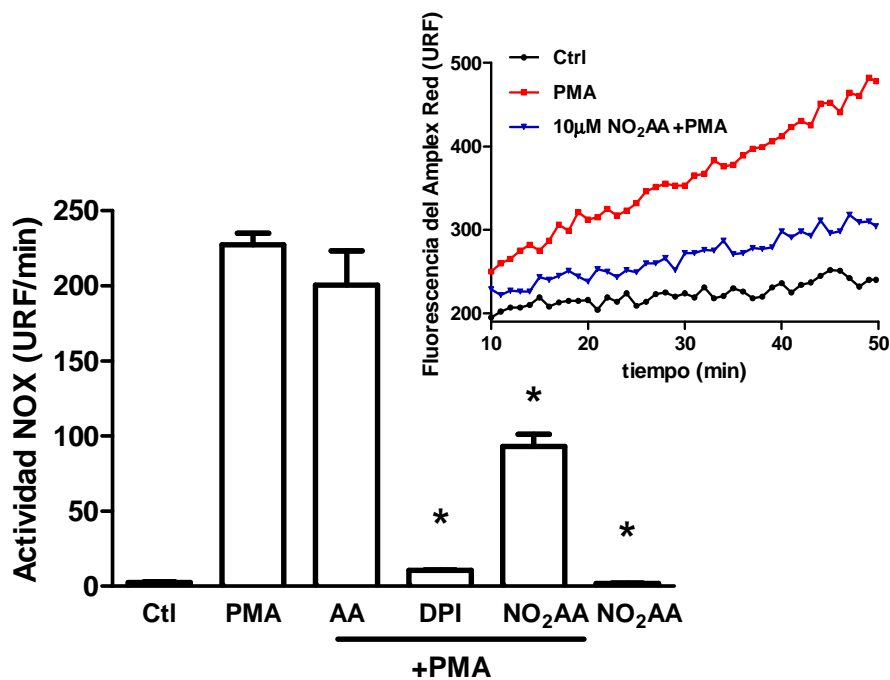
**Figura 15. Inhibición de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  por  $NO_2AA$  analizado por luminiscencia del luminol. (A)** Los macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) se trataron con  $NO_2AA$  (5 y 10  $\mu M$ ,  $\blacktriangle$ - y  $\bullet$ - respectivamente) por 1 hora en buffer dPBS a  $37^\circ C$  y posteriormente los macrófagos fueron activados con PMA (3  $\mu g/mL$ ) ( $\diamond$ -). La condición control sin PMA fue también incluida ( $\square$ -). La formación de  $O_2^{\bullet-}$  fue analizado siguiendo la luminiscencia de la oxidación de luminol (100  $\mu M$ ) en un lector de luminiscencia en placa por 1 hora. El resultado mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. **(B)** Para el ensayo con ZOP como activador, los macrófagos ( $2 \times 10^5$  células) fueron incubados con 50  $\mu M$   $NO_2AA$  o AA por 1 hora, y luego activados con 1,2 mg/ml ZOP. Para cada condición, se determinó el número de cuentas alcanzado en el punto máximo de luminiscencia. Los datos reportados son representativos de cuatro experimentos independientes

(n=3) y corresponden al promedio  $\pm$  SD. \* indica diferencias respecto a la condición de activación con ZOP,  $p < 0.05$ .

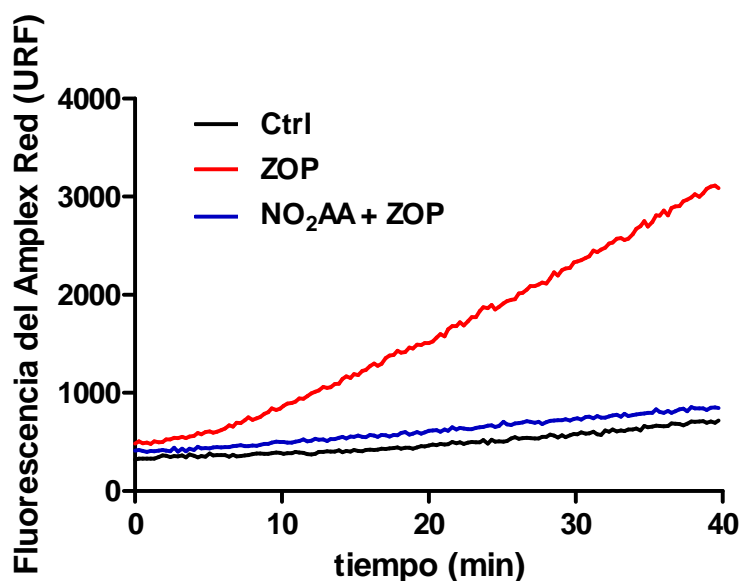
Utilizando la fluorescencia del Amplex Red se estudió la actividad NOX2 mediante la formación del producto de dismutación del  $O_2^{\bullet-}$ , el  $H_2O_2$  [246] (Figura 16). En presencia de PMA se observa un aumento de la fluorescencia en comparación con la condición control, siendo la pendiente del cambio de la fluorescencia en el tiempo correspondiente a la velocidad de producción de  $H_2O_2$  (inset Figura 16). Los macrófagos activados preincubados con  $NO_2AA$  presentaron una menor actividad indicando una inhibición de NOX2 (Figura 16). Como control de la inhibición de la enzima, se utilizó el inhibidor de la NOX2, el DPI [248], observándose como era de esperar una disminución en la formación del  $O_2^{\bullet-}$  por los macrófagos activados (Figura 16). Muy importante, analizamos una condición control en la cual los macrófagos fueron tratados con  $NO_2AA$  en ausencia de PMA, sin observarse efectos en la oxidación del Amplex Red (Figura 16), por lo que el nitroalqueno no activa ni estimula la actividad de la enzima (Figura 15) así como tampoco reacciona con el Amplex Red estimulando su fluorescencia (Figura 16).

El efecto inhibitorio del  $NO_2AA$  fue además testado en macrófagos primarios extraídos de bazo de rata, los cuales se activaron con ZOP (Figura 17). Al igual que para los macrófagos de línea J774A.1, el nitroalqueno también fue capaz de inhibir la actividad NOX2 mediante estudios de fluorescencia del Amplex Red (Figura 17).



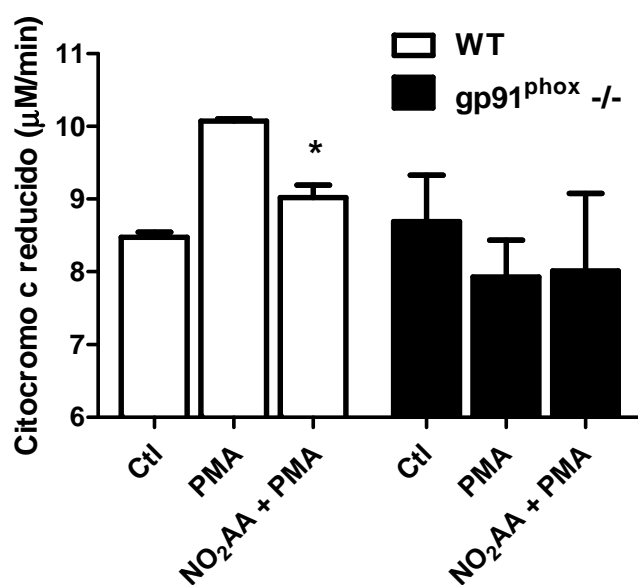


**Figura 16. Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> medida por la fluorescencia del Amplex Red.** Macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (10 µM), AA (10 µM) o DPI (50 µM) por 1 hora a 37°C en buffer dPBS. Luego las células fueron lavadas y activadas con PMA (3µg/mL). La formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> fue determinada indirectamente por la reacción de su producto de dismutación (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con el Amplex Red (50 µM) en presencia de 4 µg/mL HRP. Los cambios en la fluorescencia fue analizada en un lector de placa de fluorescencia ( $\lambda_{ex}$ = 515 nm,  $\lambda_{em}$ = 590 nm). En la Figura se muestran los datos correspondientes a la actividad determinada a partir de las pendientes iniciales de cada condición. Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD representativos de 3 experimentos independientes (n=3). \* respecto a condición activados con PMA,  $p < 0.05$ . En el inset de la figura se muestra un gráfico primario de la fluorescencia a modo de ejemplo con células control (negro), activada con PMA (rojo) y los tratados con 10 µM de NO<sub>2</sub>AA (azul).



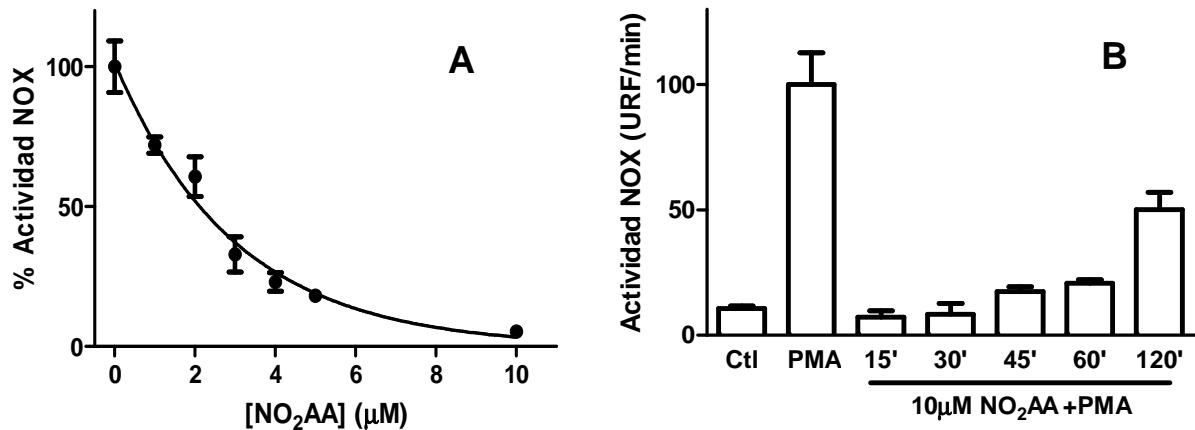
**Figura 17. Inhibición de la actividad NOX2 en macrófagos de bazo de rata.** Macrófagos primarios extraídos de bazo de rata ( $5 \times 10^5$  células) fueron incubados por 1h con NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M), lavados y activados con ZOP (1.2 mg/ml). La formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue evaluado por la fluorescencia de Amplex Red (50  $\mu$ M) con 4  $\mu$ g/mL HRP, como previamente. Se muestra el gráfico primario de fluorescencia vs tiempo. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Para verificar que la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es debido a la actividad de la enzima NOX2, se utilizaron macrófagos extraídos de médula ósea de ratones knockout de NOX2 (gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>). Se analizó la actividad NOX2 mediante estudios de reducción del cit c, comparando la actividad de los macrófagos de ratones gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> con macrófagos extraídos de ratones WT en las mismas condiciones. La actividad NOX2 fue analizada en macrófagos activados con PMA en presencia y ausencia de NO<sub>2</sub>AA (Figura 18). Se demostró que los macrófagos extraídos de ratones WT presentan un aumento de la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en presencia de PMA, en una forma inhibible por NO<sub>2</sub>AA similar a lo observado para macrófagos de línea celular (Figura 18). Como era de esperar, los macrófagos extraídos de ratones gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> no generan O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en presencia de PMA y ni exhiben diferencias con el tratamiento con NO<sub>2</sub>AA (Figura 18). Por lo tanto, estos resultados sugieren que efectivamente el NO<sub>2</sub>AA inhibe la actividad NOX2. Por lo tanto, hemos determinado que el NO<sub>2</sub>AA presenta un efecto inhibitorio sobre la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por tres técnicas distintas (Figuras 14-18).



**Figura 18. Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre de la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en macrófagos primarios de médula ósea por reducción de citocromo c.** Los macrófagos de médula ósea de ratones WT y ratones gp91<sup>phox</sup> -/- (5x10<sup>5</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (10 µM) por 15 minutos en buffer dPBS a 37°C, lavadas y activadas con PMA (3 µg/mL) en presencia de 20 µM de citocromo c. Luego, la reducción de citocromo c fue medida a 550 nm durante una hora. Se muestran los valores correspondientes a la pendiente del gráfico primario y corresponden a la media ± SD, *n*=3. \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición con PMA, *p* < 0.05.

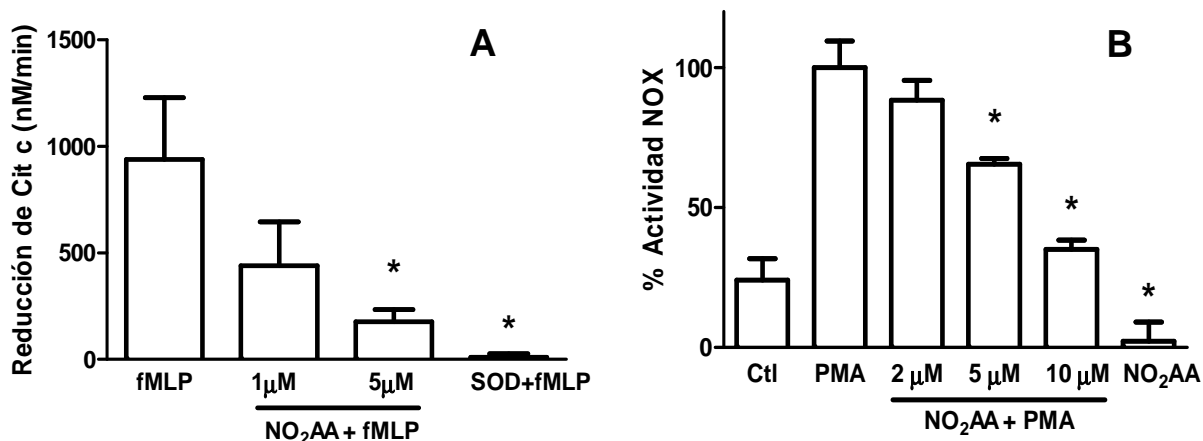
El efecto observado resultó ser dependiente de la concentración del nitroalqueno agregado observándose una concentración inhibitoria 50 % (IC<sub>50</sub>) de 2.1 ± 1.4 µM de NO<sub>2</sub>AA (Figura 19A). Posteriormente analizamos la capacidad del NO<sub>2</sub>AA de inhibir de forma reversible la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Figura 19B). Como se observa en la figura, la inhibición ejercida por el NO<sub>2</sub>AA presenta con un máximo de inhibición entre 15 y 30 minutos. A tiempos de pre-incubación prolongados el efecto inhibitorio disminuye compatible con la idea de un proceso reversible (Figura 19B). Cabe destacar que los resultados reportados en la figura 19B fueron obtenidos por más de una técnica experimental (luminiscencia y fluorescencia) lo que solidifica el resultado obtenido.



**Figura 19. Dependencia de la dosis y tiempo de incubación del NO<sub>2</sub>AA sobre la inhibición de la NOX2.** (A) Macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) fueron tratadas con diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub>AA (0-10 μM) por 15 minutos a 37°C, activados con PMA (3 μg/mL) y la actividad NOX2 analizada por Amplex Red como previamente. Para la obtención del IC<sub>50</sub>, los datos se ajustaron a una exponencial de primer orden, determinando el valor de  $2.1 \pm 1.4$  μM a la concentración en la que se alcanza el 50% de la actividad inicial. Los resultados observados corresponden a la media  $\pm$  SD,  $n=3$  representativos de 4 experimentos independientes. (B) La dependencia del tiempo de incubación del nitroalqueno fue realizado incubando macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) con 10 μM de NO<sub>2</sub>AA a 37°C en dPBS a distintos tiempos de pre incubación (15-120 min). Los macrófagos fueron activados con PMA y la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> analizada por fluorescencia del Amplex Red. Los resultados observados corresponden a la media  $\pm$  SD,  $n=3$  representativos de 4 experimentos independientes.

### 6.1.2 Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NOX2 en neutrófilos

La NOX2 está presente en distintos tipos celulares, principalmente leucocitos como macrófagos y neutrófilos [80]. Para determinar que la inhibición observada no es específica de un tipo celular, estudiamos el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la enzima en neutrófilos humanos (Figura 20). Los neutrófilos fueron activados con PMA o fMLP, y la actividad NOX estudiada por reducción de citocromo c o fluorescencia del Amplex Red. En ambos casos se observa un incremento de la actividad NOX2 en presencia del activador que disminuyó en presencia de NO<sub>2</sub>AA (Figura 20).

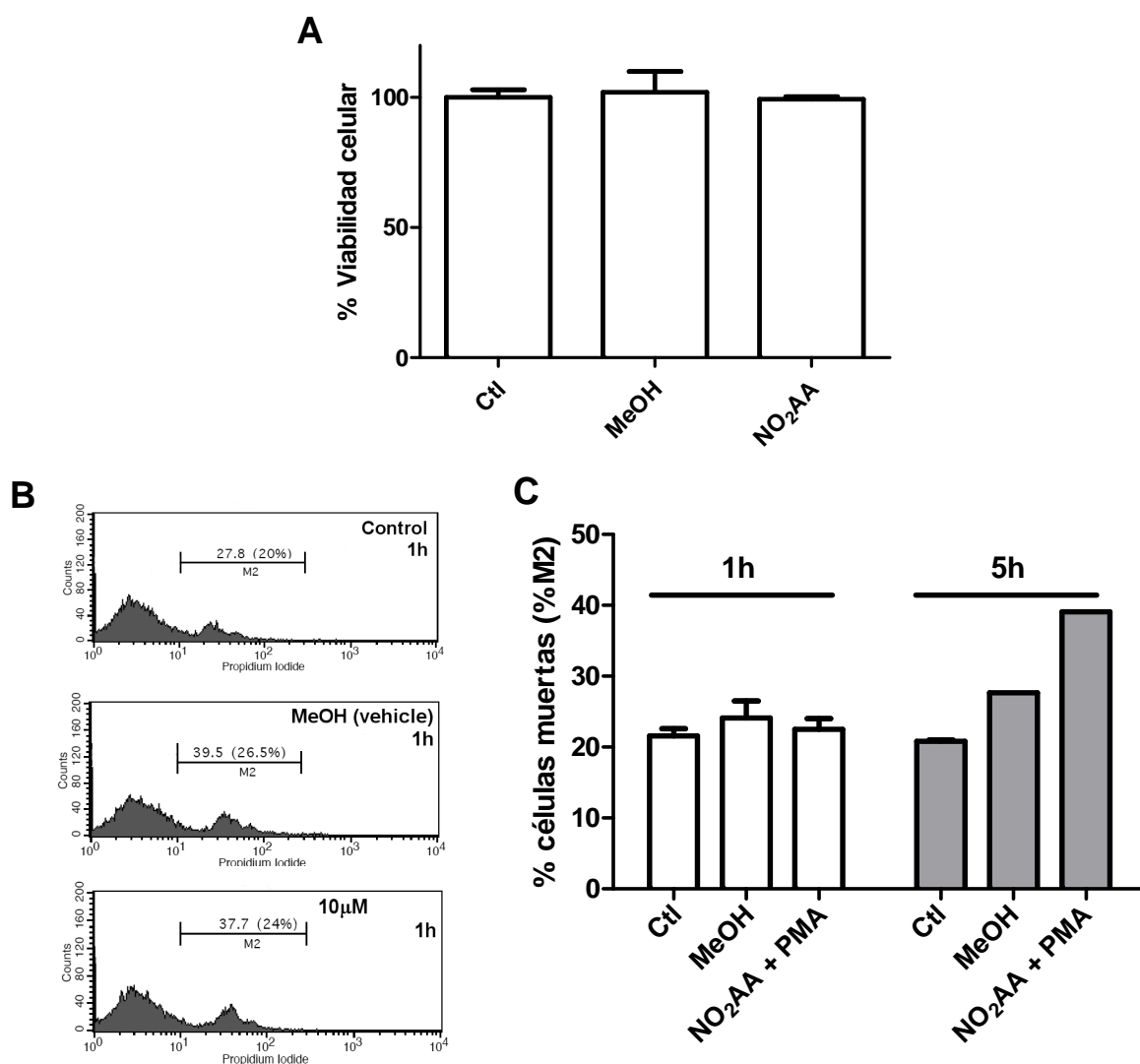


**Figura 20. Inhibición de la actividad NOX2 por NO<sub>2</sub>AA en neutrófilos humanos.** Se determinó la actividad de la NOX2 en neutrófilos humanos por reducción de Citocromo c (**A**) o fluorescencia del Amplex Red (**B**). (**A**) Los neutrófilos ( $5 \times 10^5$  células) fueron incubados con 2-10  $\mu$ M NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos a 37°C y luego activados con fMLP (10  $\mu$ M). El control negativo con SOD fue incluido. La formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> fue medida por reducción de citocromo c. (**B**) las células fueron tratadas con NO<sub>2</sub>AA como en (**A**) y luego activadas con PMA (3  $\mu$ g/mL). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado de la dismutación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en presencia de HRP fue medido por fluorescencia del Amplex Red. Se incluyó el control de neutrófilos en reposo incubados con NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M). En ambos experimentos, la actividad NOX2 fue definida como la pendiente inicial del gráfico primario. Los resultados reportados corresponden a la media  $\pm$  SD,  $n=3$  representativos de 4 experimentos independientes. \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición con PMA.  $p < 0.05$ .

### 6.1.3 Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la funcionalidad del macrófago

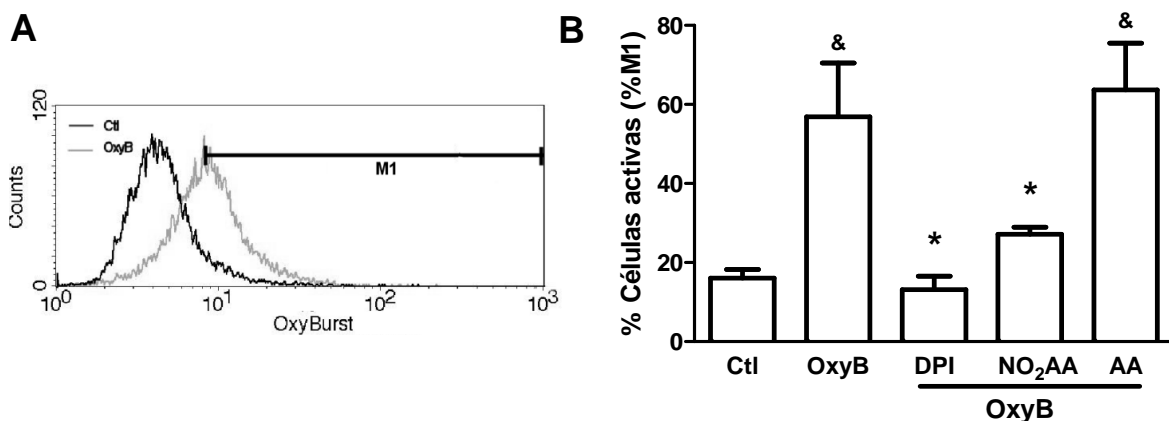
Una posible explicación de los efectos observados por NO<sub>2</sub>AA sobre la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede ser por afectar directamente la viabilidad celular y no la actividad de la enzima. Por lo tanto, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el método de MTT [250] (Figura 21A) y el método de Ioduro de Propidio [251] (Figura 21B y C). En ambos casos no se observaron efectos adversos sobre el número de células viables luego de la incubación con NO<sub>2</sub>AA en las mismas condiciones experimentales utilizadas previamente; solamente se observó una disminución en la viabilidad celular a las 5 hs de incubación con el nitroalquenos (Figura 21), condiciones alejadas de las utilizadas en los diferentes experimentos de nuestro trabajo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la capacidad de NO<sub>2</sub>AA de disminuir la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el fagosoma no es debido a una

disminución de la viabilidad celular y sí sobre la capacidad de la enzima de formar el oxidante.



**Figura 21. Ensayo de viabilidad con NO<sub>2</sub>AA de macrófagos.** La viabilidad celular fue analizada por ensayo de MTT y ensayo de IP. **(A)** Los macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células) fueron incubados con NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M) o vehículo (MeOH) en buffer dPBS a 37°C por 24 h. Las células fueron lavadas y tratadas con solución de MTT (5 mg/mL) con PMS (0.22 mg/mL) por 45 minutos a 37°C; luego de lavadas se agregó DMSO y buffer Sorensen. Las células muertas fueron teñidas de azul y la cantidad determinada por absorbancia a 570 nm. **(B y C)** Los macrófagos J774 ( $1 \times 10^6$  células) fueron incubados con NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M) o vehículo (MeOH) en buffer dPBS a 37°C por 1h o 5 hs. Los macrófagos fueron lavados y tratados con IP por 30 minutos en oscuridad, lavados dos veces y levantados; la fluorescencia del IP fue medida por citometría de flujo ( $\lambda_{ex} = 488\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585\text{nm}$ ). En la figura **B** se muestra un histograma representativo de la fluorescencia de IP con la región M2 correspondiente a células muertas. En **C** se presenta el porcentaje de células en la región M2. Los resultados mostrados correspondientes a la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes  $n=3$ .

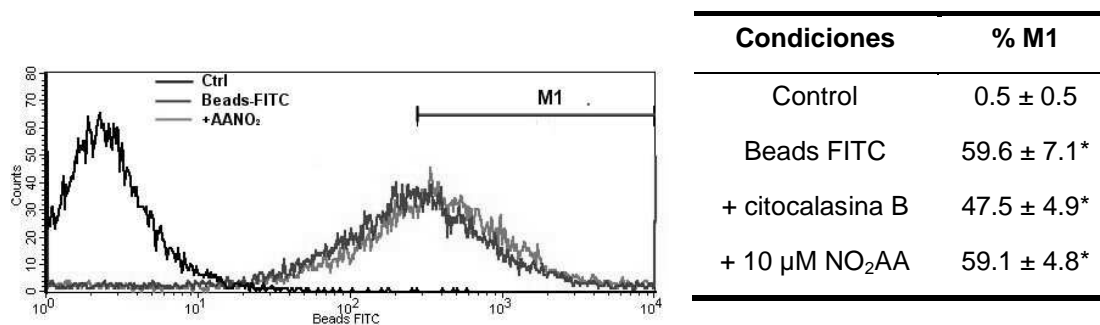
Luego investigamos si la inhibición de NOX2 ejercida por NO<sub>2</sub>AA ocurre en condiciones fisiológicamente relevantes como ser la formación del fagosoma, usando el compuesto Fc-oxyBURST (OxyB). El OxyB consiste en una molécula de BSA unida a una molécula de H<sub>2</sub>DCF y acompañado con anticuerpo IgG anti-BSA. El OxyB es reconocido por el receptor Fc e internalizado; la H<sub>2</sub>DCF se oxida a DCF fluorescente por los oxidantes formados dentro del fagosoma, como el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de la NOX2 [252] (Figura 13) y los cambios en la fluorescencia pueden ser seguidos mediante citometría de flujo. Los macrófagos de línea celular fueron tratados con OxyB observándose un esperado aumento de la fluorescencia por la formación del fagosoma (Figura 22A). En presencia de NO<sub>2</sub>AA el aumento de la fluorescencia fue menor compatible con la disminución de la formación de oxidantes (Figura 22B). Como es esperable, el AA en estas concentraciones no generó una disminución de la fluorescencia de OxyB (Figura 22B). Como control de la inhibición de la producción de especies reactivas, incluimos una condición con DPI, en la cual se observa una disminución en el aumento de la fluorescencia (Figura 22B). Los bajos niveles de oxidación de OxyB en presencia de NO<sub>2</sub>AA fueron observados en macrófagos activados confirmando la inhibición de la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por el nitroalqueno en condiciones fisiológicas.



**Figura 22. Inhibición del NO<sub>2</sub>AA sobre la oxidación del Fc-OxyBURST en macrófagos.** Los macrófagos J774A.1 (1x10<sup>6</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (10 μM), AA (10 μM) o DPI (50 μM) por 60 minutos. Las células fueron lavadas y tratadas con el OxyB (50 μg/mL) por 1h, y la fluorescencia del DCF determinada por citometría de flujo (λ<sub>ex</sub>= 488 nm, λ<sub>em</sub>= 530 nm). En la figura A se muestra un histograma representativo definiendo la región M1 como la población celular de alta fluorescencia (por oxidación de H<sub>2</sub>DCF), mientras que en B se muestra el porcentaje de M1 de las distintas condiciones. Los resultados mostrados corresponden a la media ± SD, n=3. &.indica

diferencias estadísticas comparadas con la condición control,  $p < 0.05$ . \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición con OxyB.  $p < 0.05$ .

La disminución de la fluorescencia de OxyB en presencia del NO<sub>2</sub>AA observada puede deberse también a una disminución en la capacidad de fagocitar por parte de los macrófagos, y no a una disminución de la producción de oxidantes. Por tanto, se estudió si está afectada la fagocitosis de las células en presencia de NO<sub>2</sub>AA usando beads o partículas conjugadas con el fluoróforo FITC (Figura 23). Como control positivo de inhibición se incluyó una condición con citocalasina B, un inhibidor de la fagocitosis [254]. Como se observa en la figura 24, la capacidad fagocítica de los macrófagos no fue afectada con NO<sub>2</sub>AA ya que se observan niveles similares de actividad en presencia y ausencia del nitroalqueno (Figura 23). Esta afirmación además está basada en que el %M1 en presencia del inhibidor de la fagocitosis es menor a las condiciones con beads-FITC en presencia o ausencia de NO<sub>2</sub>AA (Figura 23).

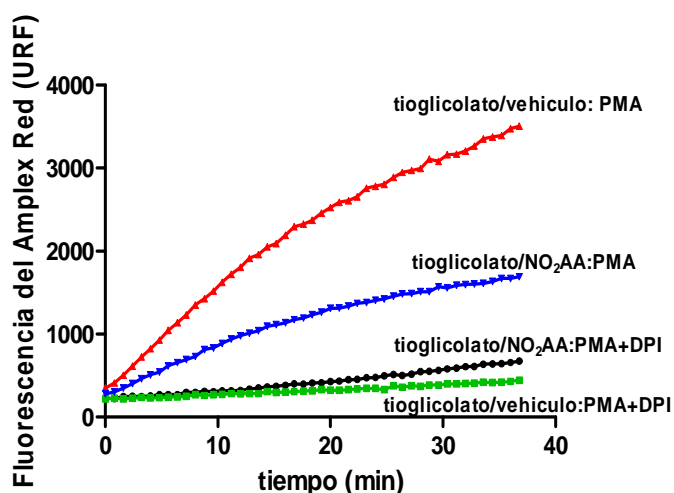


**Figura 23. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la capacidad fagocítica.** Macrófagos J774A.1 ( $1 \times 10^6$  células) fueron incubados con 10 μM NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos a 37°C en dPBS, luego se lavaron y se trataron con FITC-beads por 3h más en dPBS. Las células fueron levantadas, lavadas y resuspendidas en buffer dPBS. También se utilizó una condición tratada con 50 μM de citocalasina B por 1 hora a 37°C previo al agregado de FITC-beads. La fluorescencia fue medida por citometría de flujo ( $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 530 nm). En la figura se muestra un histograma representativo de la fluorescencia de FITC-beads (izquierda) y el porcentaje de M1 correspondiente a la capacidad fagocítica (derecha). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n=3). \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición control  $p < 0.05$ .



#### 6.1.4 Estudio de la inhibición de NOX2 por NO<sub>2</sub>AA *in vivo*

Los datos presentados hasta el momento indican que el NO<sub>2</sub>AA inhibe la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por NOX2 en macrófagos activados. La capacidad del NO<sub>2</sub>AA de inhibir la NOX2 puede generar un macrófago menos activado [13, 14, 71]. En el proceso de inflamación crónica, la nitración de AA puede ocurrir por el incremento del estrés oxidativo/nitrativo [42, 200, 202, 208, 209]. De acuerdo a los datos de la literatura y los presentados en este trabajo, el NO<sub>2</sub>AA puede inhibir enzimas claves inducibles pro-inflamatorias (como NOX2, NOS2 o PGHS2) ayudando a la resolución de la inflamación. Este efecto tiene relevancia fisiológica solo si es posible de producirse *in vivo*. Por tanto decidimos analizar la capacidad del NO<sub>2</sub>AA de modular la NOX2 en un modelo *in vivo*. Para ello utilizamos un modelo animal de inflamación por tratamiento con tioglicolato. La inyección con tioglicolato en el peritoneo es un modelo bien reconocido debido a su capacidad de generar una respuesta inflamatoria luego de 4 días, incrementando el reclutamiento y el número de macrófagos [255]. Los ratones fueron tratados intraperitonealmente con tioglicolato (única inyección de 10% v/v) y se trataron subcutáneamente con vehículo o NO<sub>2</sub>AA (10 µM/día) durante cuatro días. Al cuarto día posterior a la inyección de tioglicolato, se sacrificaron los animales, se extrajeron los macrófagos peritoneales y se estudió la activación de NOX2. Los macrófagos obtenidos de ratones tratados con NO<sub>2</sub>AA presentaron disminuida la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> luego de la activación con PMA comparado con los animales tratados con vehículo (Figura 24). El agregado de DPI a los macrófagos previo al PMA disminuyó la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en todas las condiciones siendo el control positivo del experimento. La disminución de la activación macrofágica en ratones tratados con tioglicolato y NO<sub>2</sub>AA sugiere que el nitroalqueno puede ejercer efectos antiinflamatorios cuando es administrado a dosis farmacológicas *in vivo*.



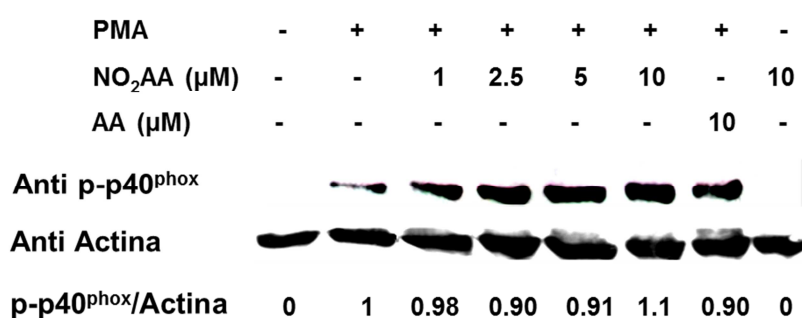
Condición	Actividad NOX2 (%)
Vehículo	25.9 ± 12.8
NO <sub>2</sub> AA	5.7 ± 3.9 <sup>a</sup>
Vehículo + PMA	100 ± 22.6
NO <sub>2</sub> AA + PMA	21.7 ± 10.3 <sup>b</sup>
Vehículo + PMA + DPI	27.1 ± 6.4 <sup>b</sup>
NO <sub>2</sub> AA + PMA + DPI	5.9 ± 1.9 <sup>b</sup>

**Figura 24. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad NOX2 *in vivo*.** Los ratones se trataron con 10% de tioglicolato mediante inyección intraperitoneal. En paralelo, se trataron con inyección subcutánea con vehículo o NO<sub>2</sub>AA como se explica en Materiales y métodos. El día 4 los animales se sacrificaron y se extrajeron los macrófagos peritoneales. Los macrófagos extraídos ( $5 \times 10^5$  células) fueron activados con PMA (3  $\mu$ g/mL) y se incluyó una condición con DPI (50 $\mu$ M) por 30 minutos previo a la activación. La actividad NOX2 fue analizada por fluorescencia del Amplex Red. En la figura se muestra el gráfico primario (izquierda) y la tabla mostrando el % de actividad NOX2 correspondiente a la pendiente inicial del gráfico primario definiéndose como 100% la condición de macrófagos de ratones tratados con vehículo y activados con PMA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD, y corresponde a 3 experimentos independientes n=4. <sup>a</sup> indica diferencias estadísticas compradas con los macrófagos de ratones con vehículos,  $p < 0.05$ . <sup>b</sup> indica diferencias estadísticas compradas con los macrófagos de ratones con vehículos + PMA,  $p < 0.05$ .

## 6.2 Determinación del mecanismo de acción del NO<sub>2</sub>AA sobre la NOX2

Los experimentos reportados en las figuras 14-24 demuestran la capacidad del NO<sub>2</sub>AA de inhibir la actividad de la NOX2; el siguiente paso es determinar el/los mecanismo/s involucrado/s en dicha actividad inhibitoria. Los estudios previos fueron realizados utilizando al PMA como agonista de la activación macrofágica. El PMA activa la PKC, responsable de iniciar las cascadas de fosforilación necesarias para el correcto ensamblaje y la activación de NOX2 en la membrana [90, 265]. Por ende, se sugiere que el NO<sub>2</sub>AA debe actuar “downstream” a partir de la activación

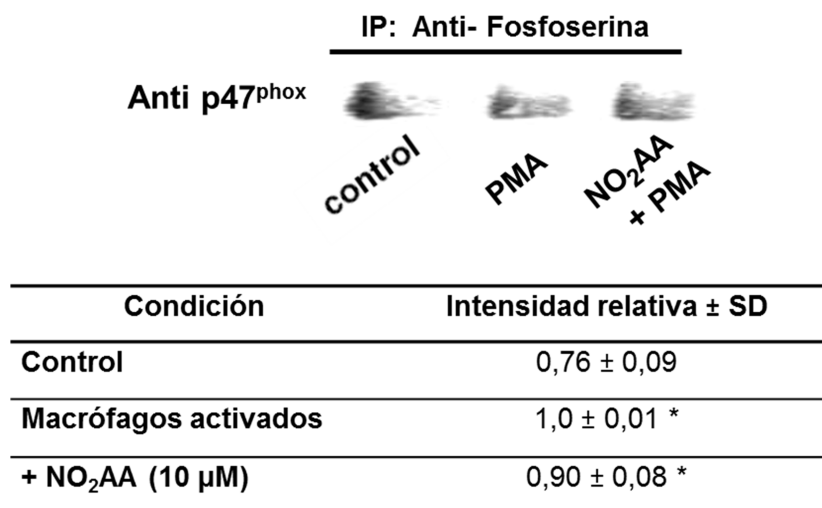
de PKC, es decir entre la fosforilación de las subunidades citosólicas y el ensamblaje de la enzima activa en la membrana. La cascada de fosforilación se inicia con la fosforilación de p47<sup>phox</sup> en múltiples sitios y la subsecuente fosforilación de p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup> que desencadena la migración de los componentes citosólicos a la membrana plasmática junto con Rac2-GTP para generar un complejo activo con los componentes de membrana gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> [90, 112, 266]. Asimismo, nuestro grupo ha reportado recientemente que el NO<sub>2</sub>AA inhibe a la PKC en plaquetas activadas [226], por lo que es posible que también esté inhibida la PKC en este modelo.



**Figura 25. Fosforilación de p40<sup>phox</sup> en presencia de NO<sub>2</sub>AA.** Los macrófagos J774A.1 (1x10<sup>6</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (1-10 μM) por 15 minutos a 37°C con dPBS y luego activados con PMA (3 μg/mL) por 5 minutos. Se incluyó el control con AA y con el NO<sub>2</sub>AA sin activar. Luego del tratamiento las células fueron lisadas, las proteínas separadas por SDS-PAGE y analizadas por western blot usando un anticuerpo anti-fosfo-p40<sup>phox</sup>. Como control de carga se determinó la presencia de actina. La densidad de cada banda fue determinada mediante el software ImageJ y la densidad de las proteínas fosforiladas respecto a la actina analizada. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n=3), no observándose cambios en la relación fosfo-p40<sup>phox</sup>/actina en las condiciones con PMA en ausencia o presencia de NO<sub>2</sub>AA.

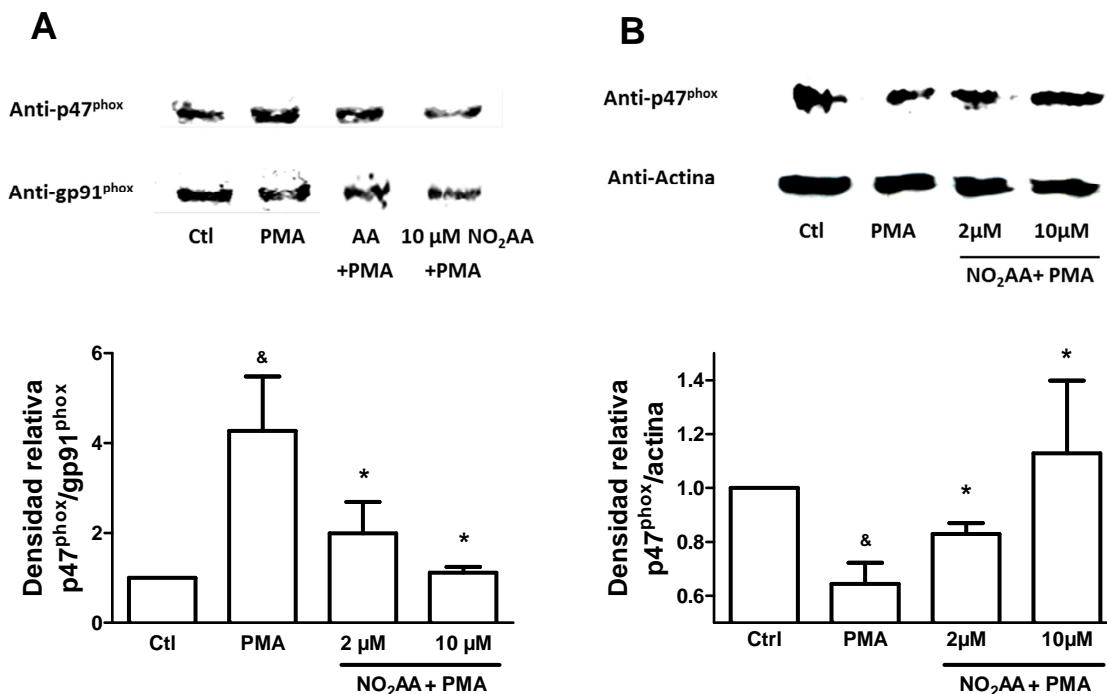
Nuestro primer paso fue estudiar los efectos del NO<sub>2</sub>AA sobre la fosforilación de los componentes citosólicos analizando la presencia de fosfo-p40<sup>phox</sup> en el lisado celular. Cuando los macrófagos fueron estimulados con PMA en presencia de concentraciones crecientes de NO<sub>2</sub>AA (1-10 μM), los niveles de fosfo-p40<sup>phox</sup> fueron similares a los observados en las células activadas en ausencia del nitroalqueno (Figura 25). El rol de p40<sup>phox</sup> depende del estado (status) de fosforilación [123]. Varios reportes sugieren que p40<sup>phox</sup> es un regulador positivo de NOX2 actuando

como una proteína adaptadora que une las subunidades citoplasmáticas del complejo en el fagosoma así como regulando la translocación a la membrana de las mismas [267, 268], mientras que otros artículos asocian a fosfo-p40<sup>phox</sup> como un regulado negativo [123]. Por lo tanto, estudiar p40<sup>phox</sup> puede no ser la subunidad más indicativa de la actividad NOX2, por lo decidimos estudiar la fosforilación de p47<sup>phox</sup>, primera subunidad en ser fosforilada y responsable de iniciar la migración a la membrana. La subunidad es fosforilada en varios residuos de serina necesarios para la activación del complejo enzimático [269]. Como se observa en la figura 26, no existen cambios en los niveles totales de fosforilación de p47<sup>phox</sup> en los macrófagos activados en ausencia o presencia de NO<sub>2</sub>AA, sugiriendo que dicho proceso no es un blanco de acción que explique la inhibición de la NOX2 por el nitroalqueno. Este hecho parece contradictorio con el efecto sobre la PKC observado en plaquetas. Esto puede deberse a que las isoformas de PKC participantes en los distintos tipos celulares sean distintos [80, 89, 270] y además, p47<sup>phox</sup> puede ser fosforilada por otras quinasas [89, 96, 98, 100, 102], lo que explicaría que no se observe el efecto inhibitorio en NOX2.



**Figura 26. Fosforilación de p47<sup>phox</sup> en macrófagos activados en presencia de NO<sub>2</sub>AA.** Los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>6</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (10 μM) por 15 minutos a 37°C y luego activados por 5 min PMA (3 μg/mL). Las células fueron lisadas y las proteínas fosforiladas se inmunoprecipitaron utilizando un anticuerpo anti-fosfoserina seguido de un western blot con anticuerpo anti-p47<sup>phox</sup> (panel superior). En la tabla se muestra el análisis densitométrico de la p47<sup>phox</sup> fosforilada, n=3. \* indica diferencias estadísticas compradas con la condición de no activada (control),  $p < 0.05$ .

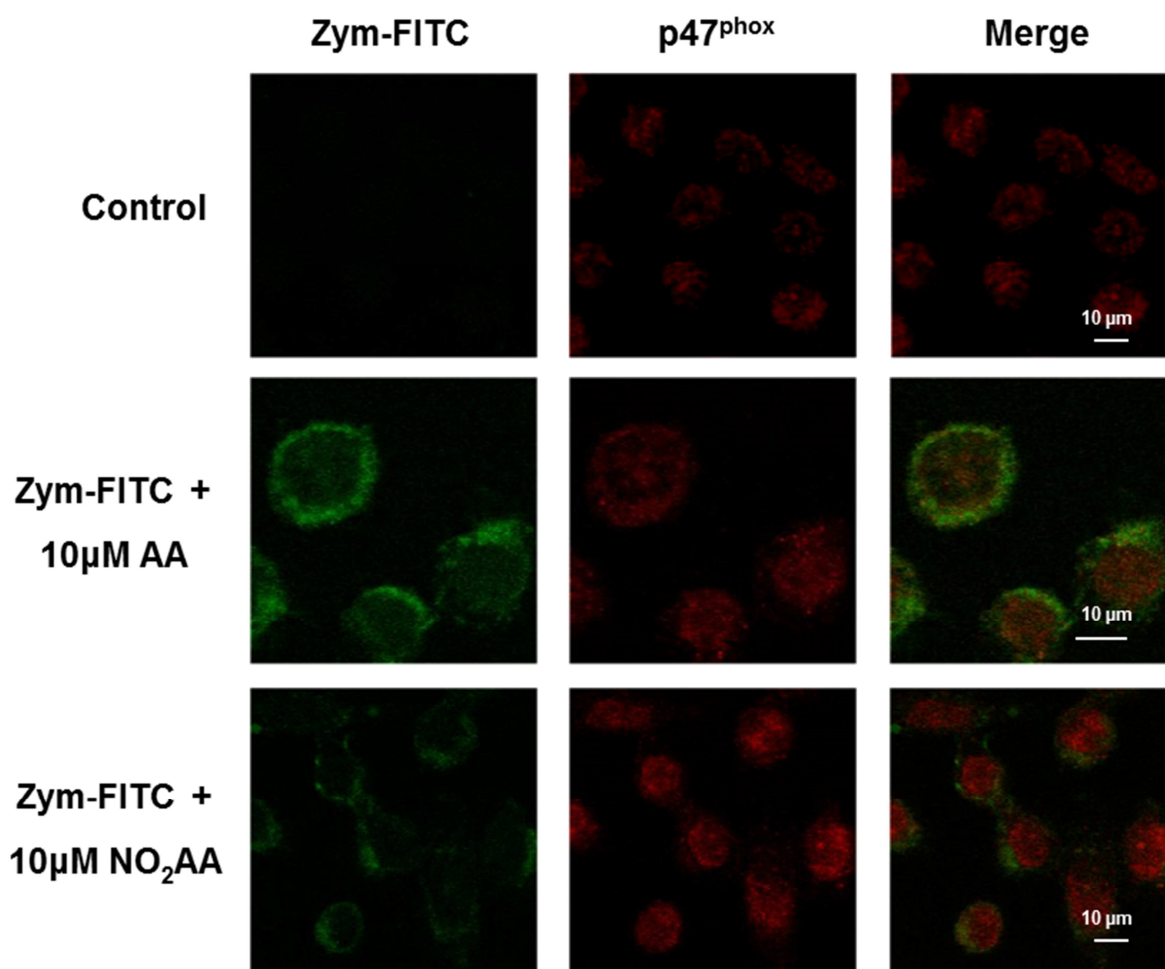
Luego de la fosforilación, las subunidades citosólicas migran a la membrana donde se asocian con gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> logrando la forma activa de la enzima [80, 86, 268]. Por lo tanto, si el NO<sub>2</sub>AA es capaz de afectar la migración de las subunidades citosólicas a la membrana el resultado final sería la inhibición de la actividad NOX2., Esta hipótesis fue testeada, determinando la presencia de p47<sup>phox</sup> en las fracciones citosólicas y de membrana de macrófagos activados mediante western blot. Se observó que al activar los macrófagos con PMA, los niveles de p47<sup>phox</sup> en la membrana aumentan al tiempo que disminuyen en el citosol comparado con la condición sin activar. Resultados similares se obtienen en presencia de AA. Cuando los macrófagos son activados en presencia de NO<sub>2</sub>AA, la cantidad de p47<sup>phox</sup> en la fracción de membrana es menor con respecto a la condición en ausencia del nitroalqueno, sumado a un incremento en la fracción citosólica (Figura 27). Por tanto, el NO<sub>2</sub>AA indujo una disminución de la migración de p47<sup>phox</sup> a la membrana observándose menor nivel de NOX2 activa en la fracción de membrana concomitantemente con un aumento de p47<sup>phox</sup> en el citosol (Figura 27).



**Figura 27. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la migración de p47<sup>phox</sup> de NOX2 a la membrana.** Los macrófagos J774A.1 (5x10<sup>6</sup> células) fueron tratados con NO<sub>2</sub>AA (2 y 10 μM) por 15 minutos, lavadas y activadas con PMA como previamente. Las células fueron levantadas y la fracción de membrana y

citoplásmica fueron separadas por centrifugación diferencial. La presencia de p47<sup>phox</sup> fue detectada por western blot y relacionada a (A) gp91<sup>phox</sup>, como marcador de membrana, y (B) actina como marcador citoplásmico. El control de las células activadas en presencia del precursor no nitrado (AA) fue también incluido. Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  SD,  $n=3$ . & indica diferencias estadísticas comparadas con la condición sin activar,  $p < 0.05$ . \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición activada con PMA,  $p < 0.05$ .

Este resultado fue confirmado por estudios de microscopía confocal utilizando como activador el Zimosan conjugado con fluoresceína (Zym-FITC). Cuando es reconocida por el macrófago, el Zym-FITC activa la vía fagocítica y los fagosomas resultan marcados por fluorescencia verde (Figura 28). Se determinó la migración de los componentes citoplásmicos usando un anticuerpo anti-p47<sup>phox</sup> y observando su colocalización con Zym-FITC. Como se muestra en la figura 28, la condición control sin activar, muestra nula fluorescencia roja (marcación del Zym-FITC). Cuando a las células se les incubaba con Zym-FITC se observa la fluorescencia verde con un aumento de la colocalización (merge) con p47<sup>phox</sup> debido al incremento de la migración de p47<sup>phox</sup> (rojo) hacia la membrana celular esperable para la activación del complejo enzimático NOX2. En la condición con NO<sub>2</sub>AA, se distingue tanto una disminución de la colocalización de la fluorescencia verde y rojo y en particular una disminución de la distribución a nivel de la membrana de la fluorescencia roja correspondiente a la migración del p47<sup>phox</sup> (Figura 28).



**Figura 28. Efecto del NO<sub>2</sub>AA en la migración de los p47<sup>phox</sup> al fagosoma por microscopía confocal.** Los macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^4$  células) fueron tratados con AA (10  $\mu$ M) o NO<sub>2</sub>AA (10  $\mu$ M) por 15 minutos, lavadas y activadas con zimosan conjugado con FITC (Zym-FITC, verde) por 30 minutos a 37°C. Luego las células fueron fijadas, permeabilizadas, bloqueadas y se realizó una inmunofluorescencia marcando p47<sup>phox</sup> (rojo), observando la fluorescencia por microscopía confocal. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n=3).

En conclusión, hemos demostrado que el NO<sub>2</sub>AA inhibe la actividad de la NADPH oxidasa fagocítica (NOX2) tanto en neutrófilos como macrófagos mediante diferentes acercamientos analíticos, presentando una inhibición dependiente de la dosis y el tiempo de incubación, lo que sugiere una modulación reversible de su actividad. Asimismo, se confirma que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> formado se genera por acción de la NOX2 debido al efecto inhibitorio por SOD en la reducción de citocromo c y la falta de detección del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en macrófagos extraídos de ratones gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>. Los

estudios mecanísticos muestran que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de modular la translocación de p47<sup>phox</sup>, evitando la formación del complejo activo de la enzima en la membrana y por lo tanto, inhibiendo la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dependiente de NOX2. En este proceso no se afecta la fosforilación de los componentes citosólicos. Los nitroalquenos son potentes electrófilos que reaccionan reversiblemente con aminoácidos nucleofílicos de proteínas, como por ejemplo residuos de cisteína e histidina [223, 271]. La capacidad de formar estos aductos reversibles covalentes explica muchas de las acciones protectoras de los ácidos grasos nitrados [204, 223-225]. Es posible que el NO<sub>2</sub>AA pueda reaccionar covalentemente con alguna subunidad citosólica (ej. p47<sup>phox</sup>) o de membrana (ej. gp91<sup>phox</sup>) de forma de prevenir el correcto ensamblaje de la enzima activa, y de esta manera inhibir la formación de especies reactivas por parte de la NOX2.

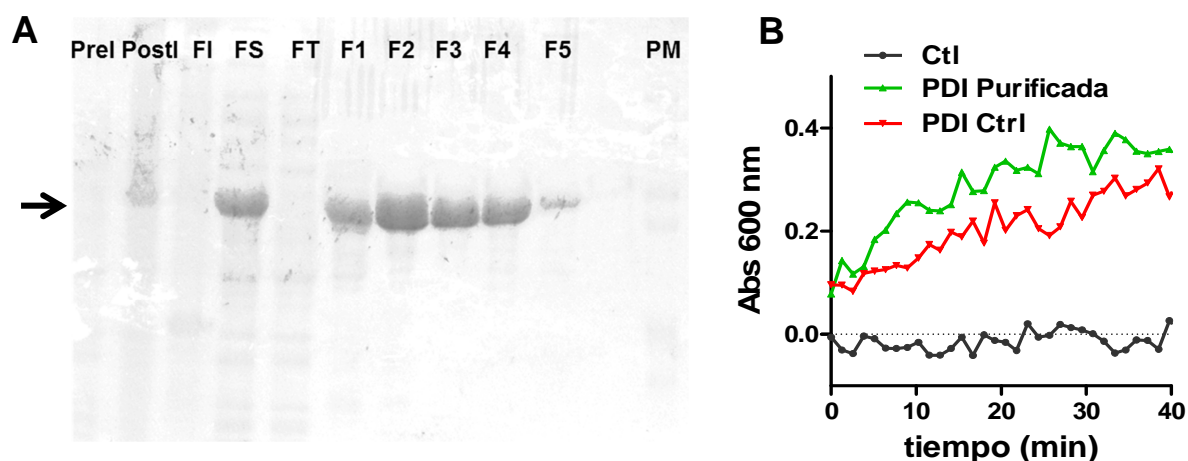
### **6.3 Análisis de la interacción entre el NO<sub>2</sub>AA y la PDI**

Estudios previos de la literatura han mostrado que la PDI intracelular interviene en la regulación de la expresión y actividad de las proteínas de la familia NADPH oxidasa. En particular, se postula que la PDI ejerce un rol regulador de la actividad NOX2 [116, 117, 175, 198, 199, 272]. Teniendo en cuenta que la PDI presenta residuos de cisteína críticos para su actividad reductasa, isomerasa y oxidasa [161], y que los nitroalquenos son capaces de reaccionar covalentemente con ellos, postulamos que la PDI podría ser un blanco de acción del NO<sub>2</sub>AA llevando de esta forma a la inhibición de NOX2 observada en macrófagos activados en presencia de NO<sub>2</sub>AA. Además, la modificación de PDI por NO<sub>2</sub>AA puede alterar su capacidad para ayudar al plegamiento de proteínas apropiado afectando a las cascadas de señalización o vías enzimáticas, ejerciendo de esta forma alguna de las acciones pleiotrópicas reportadas para el NO<sub>2</sub>AA [205, 207, 221, 226, 227, 273]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto del nitroalqueno sobre la enzima PDI.



### 6.3.1 Purificación de la PDI recombinante

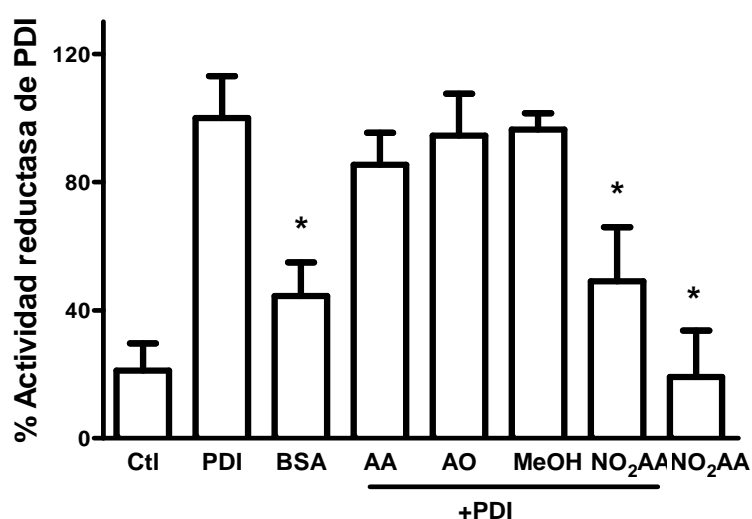
Para los trabajos con PDI *in vitro* se purificó la enzima recombinante humana a partir de un plásmido de la enzima WT, purificado según [116]. La purificación y la pureza del preparado de proteína fue determinada por electroforesis de SDS-PAGE con tinción con Coomassie Blue (Figura 29A) y western blot anti-PDI (datos no mostrados). Como se muestra en la figura, la fracción 4 (F4) corresponde a una de las fracciones de la enzima purificada en nuestro laboratorio de forma exitosa, con un buen rendimiento y pureza, sumada a una alta actividad enzimática determinado por ensayo de reducción de la insulina medido por turbidez a 600nm (Figura 29B).



**Figura 29. Purificación de la PDI recombinante humana.** Se purificó la proteína PDI humana como se describe en Materiales y Métodos. En la figura A se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue para determinar la pureza. Los carriles presentados son alícuotas de: cultivo sin IPTG (Prel), cultivo inducido con IPTG (PostI), Fracción Insoluble (I), Fracción Soluble (S), Flow through (FT) y 5 fracciones del eluido (F1, F2, F3, F4, F5) a modo de ejemplo y un marcador de peso molecular (PM). Se marca con una flecha la banda correspondiente a la PDI. En la figura B se muestra la actividad reductasa de PDI por turbidez de Insulina como se detalla en “Materiales y Métodos”, para determinar la actividad de la enzima purificada en este caso correspondiente a la fracción F4 como ejemplo y se utilizó una PDI recombinante control.

### 6.3.2 Estudio de actividad PDI en presencia de NO<sub>2</sub>AA

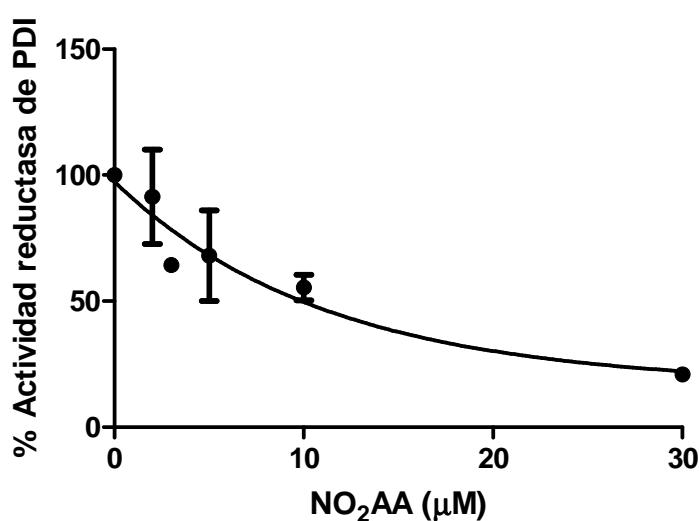
Primero se evaluó la capacidad de NO<sub>2</sub>AA de modular la actividad reductasa de PDI por el método de reducción de insulina en presencia de DTT; la reducción de la insulina libera la cadena B de la misma, la cual precipita y la cantidad liberada se mide por turbidez a 600nm [259, 274]. En presencia de PDI la actividad reductasa de PDI correspondiente a la velocidad de precipitación aumenta respecto al control sin enzima (Figura 30), mientras que la BSA, una proteína no reactiva, no exhibió cambios en la turbidez respecto al control. El tratamiento de la PDI con NO<sub>2</sub>AA presentó una disminución de la actividad reductasa (Figura 31A). Como los detergentes son capaces de inhibir la actividad reductasa de PDI [274], el efecto del NO<sub>2</sub>AA podría deberse a la naturaleza lipídica del nitroalqueno, lo cual se descartó al testear la actividad con otros lípidos como ácido oleico (AO) y AA. El control con vehículo (MeOH), en una concentración final menor al 1% al igual que en todas las condiciones con los compuestos lipídicos utilizados, no presentó ningún efecto sobre la actividad PDI (Figura 31A). Asimismo, el NO<sub>2</sub>AA en ausencia de la enzima no indujo la precipitación de la insulina (Figura 31A), descartando alguna reacción directa del nitroalqueno con la hormona.



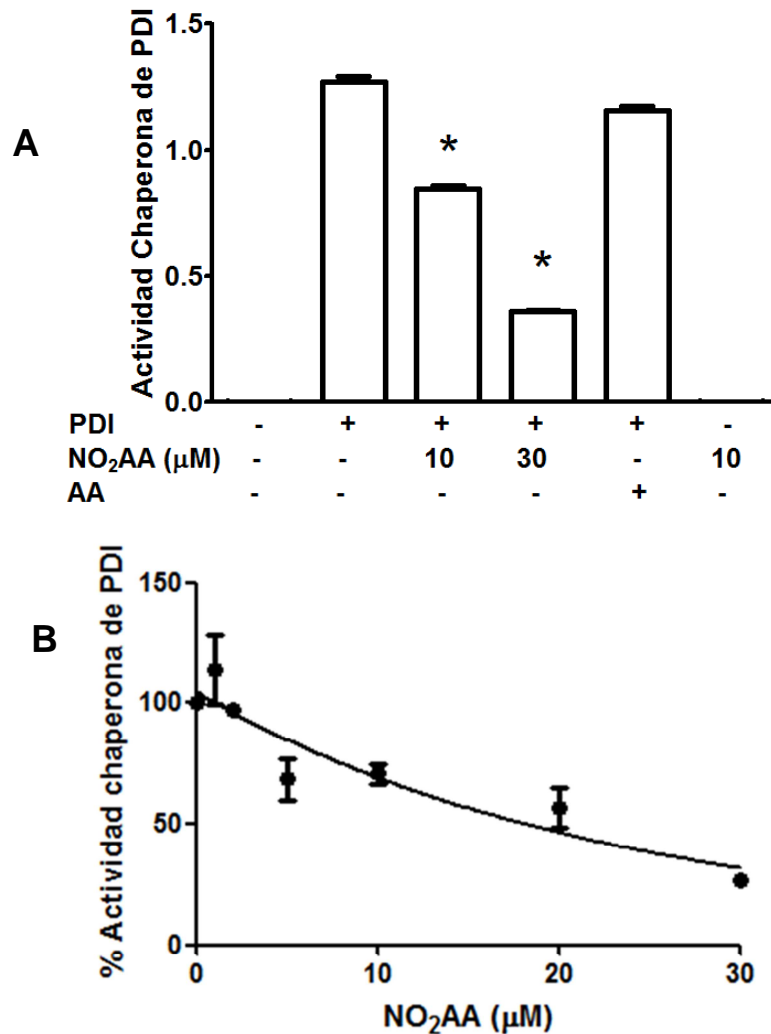
**Figura 30. Inhibición de la actividad reductasa de PDI por NO<sub>2</sub>AA.** La actividad reductasa fue evaluada por el método de la insulina. La PDI recombinante humana (1 $\mu$ M) fue incubada con NO<sub>2</sub>AA (10 $\mu$ M) por 15 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó 1 mM DTT; la reacción fue iniciada por adición de insulina (1mg/mL) y la actividad fue seguida por cambios en la absorbancia a

600 nm. La actividad reductasa de PDI fue determinada de la pendiente inicial del gráfico primario definiendo como 100% a la condición con PMA. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes, y corresponden a la media  $\pm$  SD (n=3). \* indica diferencias significativas respecto a la condición con PDI,  $p < 0.05$ .

La modulación de la actividad reductasa de PDI por NO<sub>2</sub>AA presentó un comportamiento dosis dependiente con un IC<sub>50</sub> de 7.72  $\mu$ M  $\pm$  2.9 de NO<sub>2</sub>AA (Figura 31), la cual se encuentra en el orden del IC<sub>50</sub> del NO<sub>2</sub>AA para la actividad NOX2 (Figura 19).



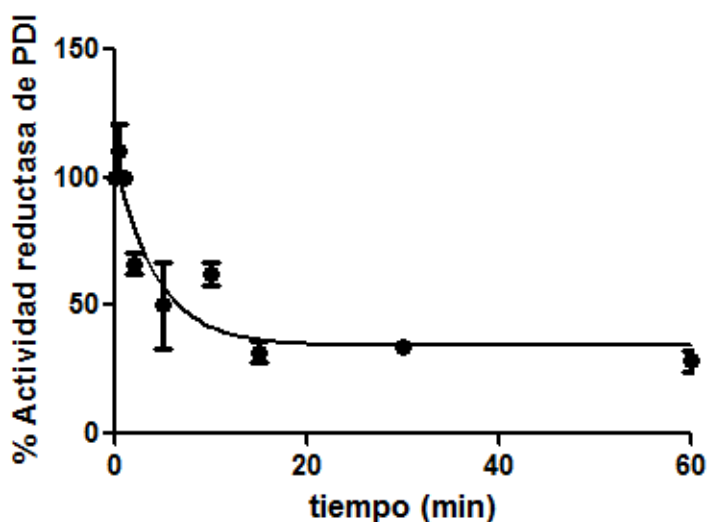
**Figura 31. Inhibición de la actividad reductasa de PDI por NO<sub>2</sub>AA.** La actividad reductasa fue evaluada por el método de la insulina. La PDI (1  $\mu$ M) fue incubada con concentraciones crecientes de 1-30 $\mu$ M de NO<sub>2</sub>AA por 15 minutos a 37°C y se agregó 1 mM DTT; la reacción fue iniciada por adición de insulina (1mg/mL) y la actividad fue seguida por cambios en la absorbancia a 600 nm. La actividad reductasa de PDI fue determinada de la pendiente inicial del gráfico primario como se menciona anteriormente. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes, y corresponden a la media  $\pm$  SD (n=3).



**Figura 32. Inhibición de la actividad chaperona de PDI por NO<sub>2</sub>AA.** La actividad chaperona fue evaluada por el método de renaturalización de GFP. **(A)** La PDI humana recombinante (2 μM) fue tratada con NO<sub>2</sub>AA (10 y 30 μM) o AA (10 μM) por 15 minutos a 37°C. La GFP (5 μM), previamente desnaturalizada por HCl, fue añadida y se determinó la actividad chaperona midiendo la fluorescencia por recuperación de la estructura nativa ( $\lambda_{exc}=485$  nm  $\lambda_{em}=538$ nm). La actividad chaperona de PDI fue obtenida de la pendiente inicial del gráfico primario obtenido para las diferentes condiciones. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes, y corresponden a la media  $\pm$  SD (n=3). \* indican diferencias significativas respecto a la condición con PDI,  $p < 0.05$ . **(B)** La actividad chaperona de la PDI, en presencia de concentraciones crecientes de NO<sub>2</sub>AA (1-30μM) incubadas con la PDI por 15 minutos previos al inicio del estudio de la actividad, fue medida como en **(A)**. En este caso, los resultados mostrados corresponden al porcentaje de actividad chaperona de PDI remanente a la condición en ausencia de NO<sub>2</sub>AA. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes, y corresponden a la media  $\pm$  SD (n=3).

Posteriormente se analizó el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la actividad chaperona de la PDI utilizando el ensayo de recuperación de la fluorescencia de GFP [260]. En la figura 32A se muestra una recuperación de la fluorescencia de GFP debido a la PDI que disminuyó cuando la enzima fue preincubada con el nitroalqueno, no observándose con tratamientos con AA. Se estudió la dependencia de la dosis obteniendo un IC<sub>50</sub> de 15.8 ± 3.75 μM, similar a la de la actividad reductasa (Figura 32B).

Asimismo se determinó una constante observada de la actividad reductasa de PDI con un valor de 13.57 ± 6.34 s<sup>-1</sup> (Figura 33), la cual se encuentra en el orden de la reacción reportada para otros nitroalquenos con grupos tioles [275]. La PDI contiene dos dominios catalíticos ditiolíticos (*a* y *a'*) cuya disposición en el espacio se encuentra bajo regulación redox [180]. Debido a la presencia de cuatro residuos de cisteína críticas para la actividad isomerasa de PDI [154, 157, 167, 180, 276], y como los nitroalquenos son capaces de modificar covalentemente residuos de cisteína en proteínas [223], es posible que la inhibición observada sea debido a la formación de un aducto covalente entre la enzima PDI y el NO<sub>2</sub>AA.

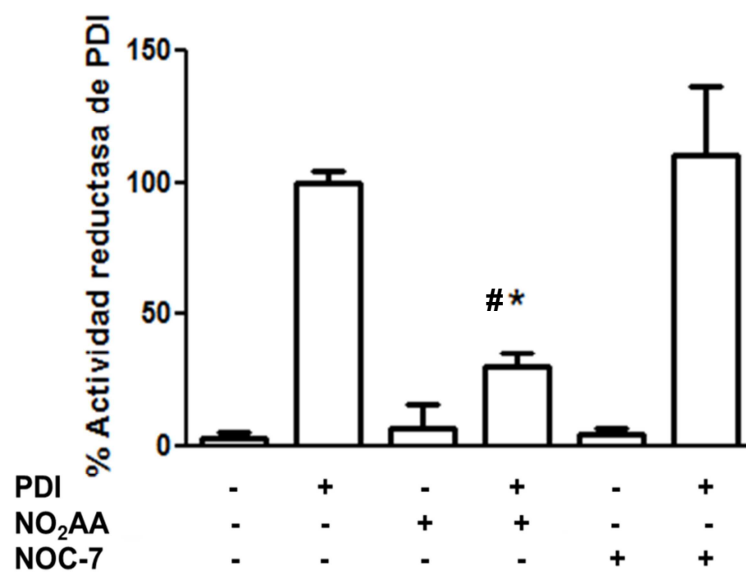


**Figura 33. Determinación de la constante de reacción entre el NO<sub>2</sub>AA y la PDI.** La actividad reductasa fue evaluada por el método de la insulina. La PDI recombinante humana (1μM) fue incubada con 10 μM de NO<sub>2</sub>AA a diferentes tiempos previo al inicio de la reacción. Posteriormente se agregó 1 mM DTT y la reacción fue iniciada por adición de insulina (1mg/mL) y la actividad seguida a 600 nm. El porcentaje de la actividad reductasa de PDI fue determinada de la pendiente inicial del gráfico primario para cada tiempo. El gráfico fue ajustado a una exponencial determinando

una constante observada de  $13.57 \pm 6.34 \text{ s}^{-1}$ . Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes, y corresponden a la media  $\pm$  SD (n=3).

### 6.3.3 Rol del $\bullet\text{NO}$ liberado por $\text{NO}_2\text{AA}$ en la inhibición de la actividad PDI

Está reportado que la S-nitrosilación de los residuos de cisteína de PDI en presencia de  $\bullet\text{NO}$  lleva a la inhibición de la enzima [165, 277]. En medio acuoso el  $\text{NO}_2\text{AA}$  (a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ ) es capaz de liberar  $\bullet\text{NO}$  a un flujo de  $8 \mu\text{mol}$  de  $\bullet\text{NO}/\text{mmol}$  de  $\text{NO}_2\text{AA}/\text{min}$  [221]. Por lo tanto, es posible que la inhibición de la actividad de PDI sea dada por  $\bullet\text{NO}$  liberado por el nitroalqueno que reaccione directamente con la PDI.



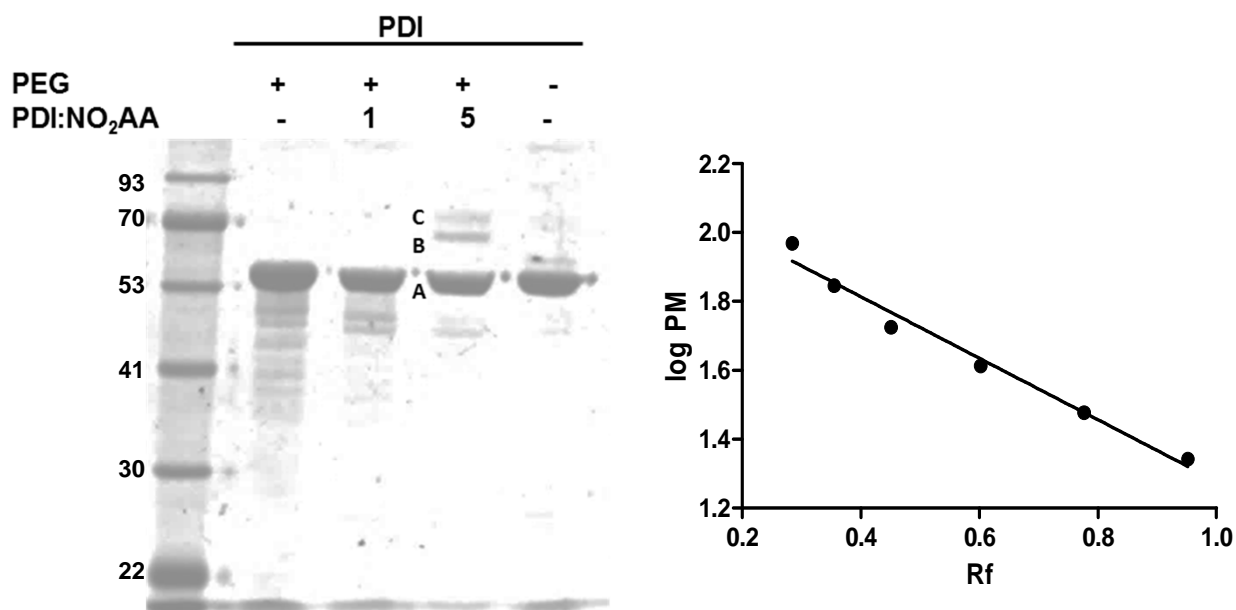
**Figura 34. Rol del  $\bullet\text{NO}$  en la inhibición de la actividad PDI sobre  $\text{NO}_2\text{AA}$ .** Para analizar el rol del  $\bullet\text{NO}$  liberado por  $\text{NO}_2\text{AA}$  sobre la PDI, se utilizó el dador de  $\bullet\text{NO}$ , el NOC-7, a una concentración que liberara al medio un flujo de  $\bullet\text{NO}$  similar a lo reportado por  $\text{NO}_2\text{AA}$  en condiciones acuosas. La PDI fue tratada con  $\text{NO}_2\text{AA}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) o NOC-7 ( $1 \mu\text{M}$ ) por 15 minutos y la actividad reductasa PDI fue evaluada por el método de la insulina. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes, y corresponden a la media  $\pm$  SD (n=3). \*indica diferencias significativas respecto a la condición con PDI,  $p < 0.05$ . # indica diferencias significativas respecto a la condición con PDI con NOC-7,  $p < 0.05$ .

Para determinar si el  $\bullet\text{NO}$  liberado por el  $\text{NO}_2\text{AA}$  es el responsable de la inhibición observada, se evaluó la actividad reductasa de la PDI en presencia del donador de  $\bullet\text{NO}$ , NOC-7. Las condiciones utilizadas fueron compatibles con los flujos de liberación de  $\bullet\text{NO}$  en solución acuosa por parte de  $10\ \mu\text{M}$   $\text{NO}_2\text{AA}$ . La actividad reductasa de PDI no se vio afectada en presencia de NOC-7 comparación con la enzima control (Figura 34). El nitroalqueno, sin embargo, ejerció el mismo efecto inhibitorio exhibido previamente (Figura 34). Es importante destacar que el  $\bullet\text{NO}$  liberado por el NOC-7 no afectó la capacidad inhibitoria del  $\text{NO}_2\text{AA}$  sobre la PDI (dato no mostrado). En suma, podemos indicar que el efecto inhibitorio del  $\text{NO}_2\text{AA}$  no se debe a su capacidad de liberar flujos pequeños de  $\bullet\text{NO}$  en solución acuosa.

#### **6.4.4 Modificación covalente de la PDI por $\text{NO}_2\text{AA}$**

Como la actividad de PDI depende de residuos de cisteína críticos en los sitios activos *a* y *a'* [157], y los nitroalquenos son capaces de modificar covalentemente tioles libres, se evaluó la capacidad del  $\text{NO}_2\text{AA}$  de formar un aducto covalente con la PDI como forma de explicar el efecto inhibitorio observado (Figuras 30-34).

En primer lugar se analizó la formación del aducto mediante el ensayo de PEG-switch [262], el cual permite elucidar la interacción con cisteínas de forma reversible (Figura 35). Este ensayo se basa en que la PDI reducida y tratada con  $\text{NO}_2\text{AA}$  es alquilada con NEM de forma de bloquear los tioles reducidos remanentes que no reaccionaron con el nitroalqueno. Como la unión del  $\text{NO}_2\text{AA}$  es reversible, el nitroalqueno aductado se libera por competencia con  $\beta$ -mercaptoetanol y los tioles ahora liberados se marcan con PEG-maleimida de un peso molecular de 5000 Da, lo que provoca que la PDI que reaccionó con  $\text{NO}_2\text{AA}$  ahora tenga un peso adicional de 5000 Da por cada nitroalqueno que tenía unido. Por lo tanto, la unión del  $\text{NO}_2\text{AA}$  se puede observar por cambios en la migración electroforética de la proteína [262].



Banda	Peso Molecular (Da)	Diferencia de PM respecto a la banda A (Da)	Numero de PEG unidos
A	57.900	0	0
B	66.900	9.100	2
C	72.600	14.700	3

**Figura 35. Formación de aductos reversibles entre PDI y NO<sub>2</sub>AA por ensayo de PEG-switch.** Para estudiar la interacción entre PDI y NO<sub>2</sub>AA, se realizó el ensayo de PEG switch. La PDI reducida fue tratada o no con NO<sub>2</sub>AA (en relación 1:1 y 1:5) por 30 minutos a 37°C. Luego, las muestras fueron alquiladas con NEM seguido por la incubación con BME para liberar el nitroalqueno y los tioles libres fueron marcados con PEG 5000-maleimida. Usando los marcadores de peso molecular se realizó una curva de calibración para determinar los pesos correspondientes de las bandas A, B y C, determinando el número de residuos modificados como se muestra en la tabla inferior. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

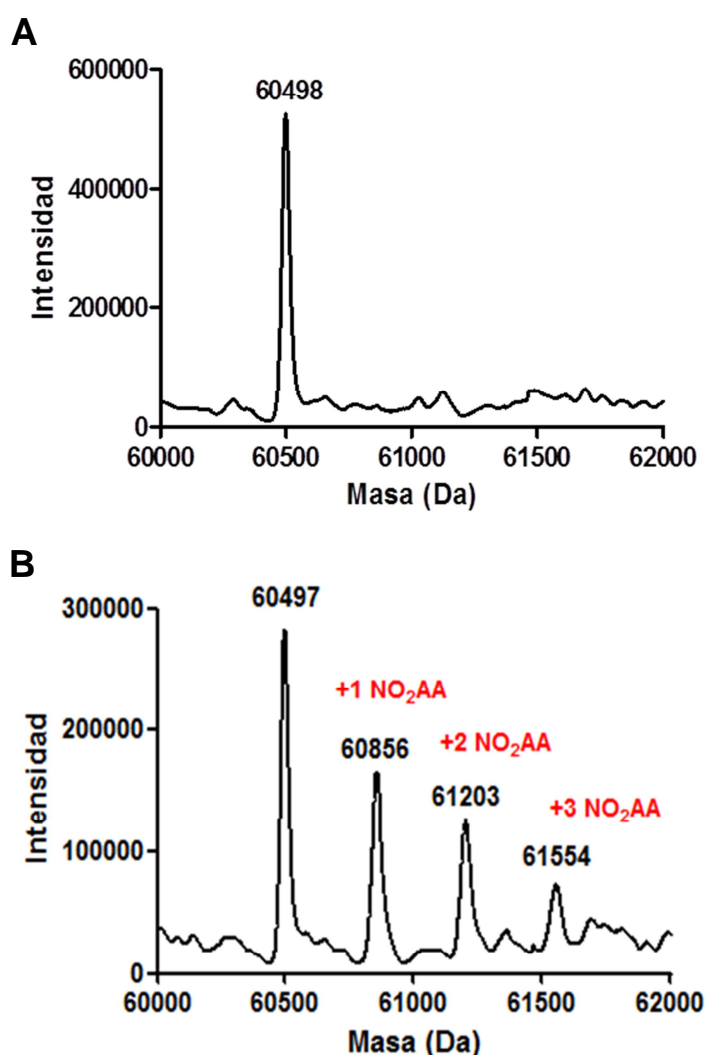
Las muestras de PDI reducida tratada y sin tratar con NO<sub>2</sub>AA fueron resueltas por SDS-PAGE y la proteína teñida con Coomassie Blue (Figura 35). La enzima (A en Figura 35) presentó un cambio en su movilidad electroforética cuando se trató con NO<sub>2</sub>AA en una relación molar 1:5, mostrando un incremento de peso molecular luego del tratamiento con PEG-5000 de aprox. 10 kDa (B en Figura 35) y 15 kDa (C en Figura 35). Estos incrementos de masa se correlacionan con la adición covalente reversible de 2 o 3 moléculas de NO<sub>2</sub>AA, respectivamente (Figura 35). Como la PDI está implicada en la activación de la NOX2, la PDI aductada puede actuar como una señal, previniendo la formación del complejo activo de la enzima y evitando la producción de oxidantes indeseables.



Para confirmar la formación del aducto NO<sub>2</sub>AA-PDI, se realizaron estudios de espectrometría de masa. La proteína PDI recombinante reducida exhibió un peso molecular de 60498 Da (figura 36A), con un peso molecular mayor al esperado. La PDI presenta 508 aminoácidos con un peso de 57.1 kDa teóricamente incluyendo la secuencia señal de 17 aminoácidos. La diferencia de peso puede ser por la presencia del His-tag, aunque se espera que tenga entre 12 residuos de histidina sumarian al peso 1860 Da. Creemos que la diferencia está dada por agregado de bases nitrogenadas en los extremos de la secuencia de la proteína durante la construcción del plásmido de expresión.

La identidad de la PDI humana recombinante fue confirmada por tripsinización de la proteína analizada por LC-MS/MS, obteniendo una cobertura de secuencia de la proteína con la biblioteca de MASCOT del 79%, que junto con los ensayos de actividad (Figura 30B) verifican la identidad de la PDI.

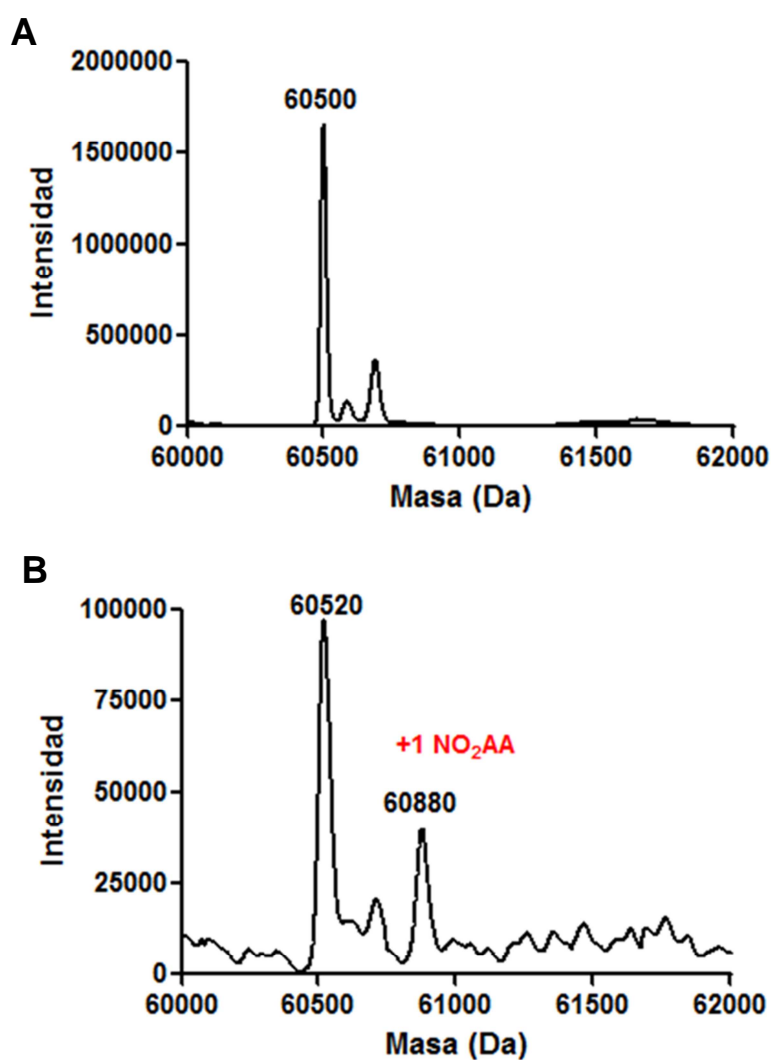
La formación del aducto covalente entre PDI y NO<sub>2</sub>AA fue confirmada mediante estudios de MS. Dado que los cambios redox de la PDI pueden regular la actividad NOX2 [116], es importante evaluar cómo el estado redox de la PDI pueden llevar a efectos diferenciales sobre la interacción de NO<sub>2</sub>AA con PDI. Asimismo, teniendo en cuenta que los residuos de cisteína deben de estar en su estado reducido para la reacción de adición de Michael con los nitroalquenos [204, 210, 223], se realizaron estudios de reducción y oxidación de la PDI previo a la incubación con el NO<sub>2</sub>AA. Para verificar el estado de reducción de la PDI se midieron los tioles libres mediante DTNB confirmando que estaban reducidos (datos no mostrados). La PDI reducida se incubó con NO<sub>2</sub>AA en una relación molar de 1:10, la cual mostró por espectro MS la presencia del ion correspondiente a la PDI (60498 Da) con tres iones adicionales (60856 Da, 61203 Da y 61554 Da), correspondiente a un incremento de masa compatible con la adición de uno, dos y tres moléculas de NO<sub>2</sub>AA (aumento de 348 Da cada una), respectivamente (Figura 36B). Estos datos confirman la formación del aducto covalente entre el NO<sub>2</sub>AA y la PDI reducida observada en el ensayo de PEG-switch (Figura 35).



**Figura 36. Nitroalquilación de PDI por NO<sub>2</sub>AA.** La formación de un aducto covalente entre el nitroalqueno y los residuos nucleofílicos de PDI fue analizada por LC/MS. (A) La PDI fue reducida y separada por HPLC en fase reversa y analizada por MS, determinando un pico de 60498 Da. (B) La PDI reducida fue incubada con NO<sub>2</sub>AA por 30 minutos a 37°C, en una relación 1:10 PDI: NO<sub>2</sub>AA. La muestra fue separada por HPLC en fase reversa y analizada por MS, exhibiendo un pico correspondiente a la PDI nativa y 3 picos adicionales correspondientes a la adición de 1 a 3 moléculas de NO<sub>2</sub>AA por PDI como se indica. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

La PDI oxidada tratada con el NO<sub>2</sub>AA presentó un ion correspondiente a la nitroalquilación de PDI con un nitroalqueno (Figura 37). Debido a la capacidad de los nitroalquenos para reaccionar con tioles reducidos, no es esperable observar aductos. Este efecto puede deberse a que no todos los residuos de cisteína pueden estén totalmente oxidados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al momento de incubarse con NO<sub>2</sub>AA

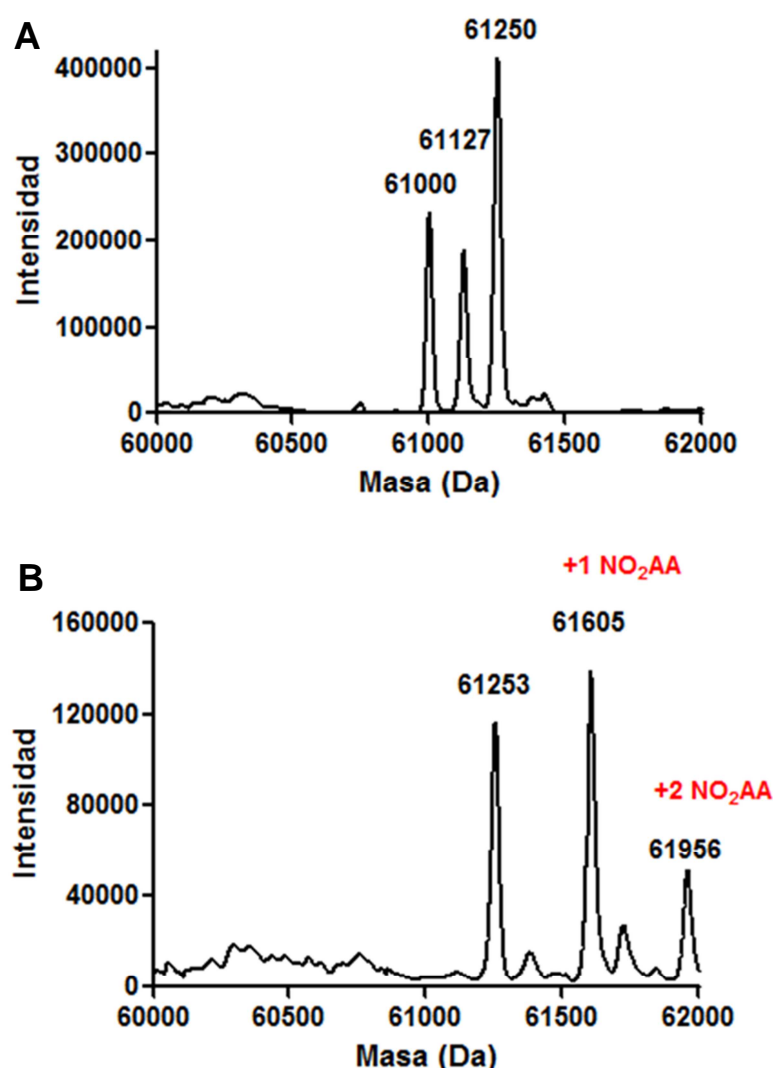
o que algunos de ellos se pueden reducir durante el tiempo de incubación, lo que explica la aparición de una PDI nitroalquilada.



**Figura 37. Reactividad de la PDI oxidada con NO<sub>2</sub>AA.** La PDI recombinante previamente oxidada se trató con NO<sub>2</sub>AA en relación 1:10 PDI: NO<sub>2</sub>AA por 30 minutos a 37°C. La muestra fue separada por HPLC en fase reversa y analizada por MS, donde observamos en (A) a la PDI oxidada sin tratar con un pico de 60500 Da. (B) En presencia del nitroalqueno, se observa, además de la PDI sin reaccionar, la presencia de un compuesto con una masa de 60880 Da compatible con la unión de una molécula de NO<sub>2</sub>AA. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Como los nitroalquenos también pueden alquilar residuos de histidina [223], no se puede descartar que el NO<sub>2</sub>AA reaccione con otros residuos nucleofílicos de la enzima así como con la cola de histidina presente en la proteína recombinante.

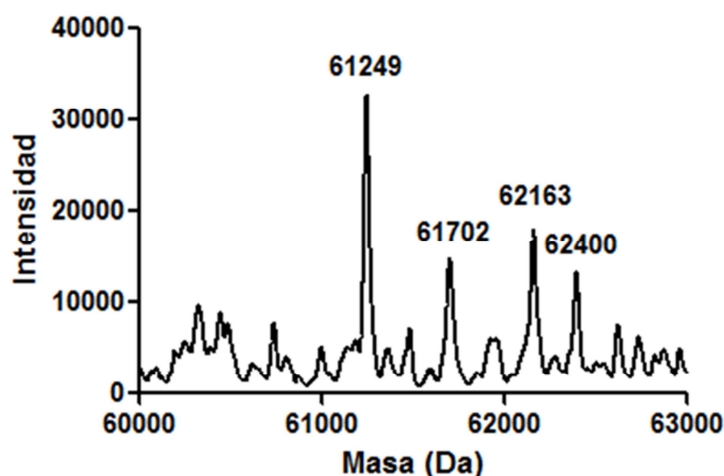
Para examinar esta cuestión, realizamos experimentos utilizando PDI reducida bloqueada previamente con NEM. En este caso, observamos que la PDI reducida tiene la habilidad de reaccionar con NEM en 4 a 6 residuos de cisteína (Figura 38A). Cuando la PDI fue tratada con NO<sub>2</sub>AA después de la incubación con NEM, hasta dos moléculas de nitroalqueno reaccionaron con la enzima (Figura 38B), lo que sugiere que no se puede descartar que el NO<sub>2</sub>AA también pueda estar reaccionando con residuos de histidinas.



**Figura 38. Capacidad del NO<sub>2</sub>AA de unirse a la PDI alquilada con NEM.** La PDI recombinante previamente reducida fue bloqueada con NEM (A) o bloqueada con NEM y luego tratada con NO<sub>2</sub>AA en una relación 1:10 PDI: NO<sub>2</sub>AA por 30 minutos a 37°C (B). La muestra fue separada por HPLC en fase reversa y analizada por MS. La figura A muestran 3 picos de 61000, 61127 y 61250 Da correspondientes a PDI unido a 4, 5 y 6 moléculas de NEM, respectivamente. En la figura B se muestran 3 picos de 61253, 61605 y 61956 Da correspondientes a PDI unido a 6 moléculas de

NEM, 6 moléculas de NEM más uno y dos NO<sub>2</sub>AA, respectivamente. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Asimismo, la nitroalquilación de residuos de cisteínas por el NO<sub>2</sub>AA fue evaluada bloqueando los tioles reducidos luego del tratamiento con NO<sub>2</sub>AA (Figura 39), para poder determinar el número de cisteínas de PDI involucradas en la interacción con el nitroalqueno. La PDI tratada con NO<sub>2</sub>AA (relación 1:10) y posteriormente bloqueada con NEM, presentó 4 iones a los cuales se determinó que sus masas podrían corresponder a i) la unión de 6 moléculas de NEM (61249 Da); ii) la unión de 2-4 moléculas de NO<sub>2</sub>AA distribuidas de la siguiente forma: a) 61702 Da, dos NO<sub>2</sub>AA y 4 moléculas de NEM; b) 62163 Da, tres NO<sub>2</sub>AA y 5 moléculas de NEM; y c) 62400 Da, 4 de NO<sub>2</sub>AA y 4 moléculas de NEM (Figura 39). Teniendo en cuenta que la PDI presenta 7 residuos de cisteínas libres, estos datos estarían indicando que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de reaccionar con un máximo tres moléculas del nitroalqueno. Cabe destacar que el espectro obtenido presenta mayor ruido y menor intensidad que el resto de los espectros.

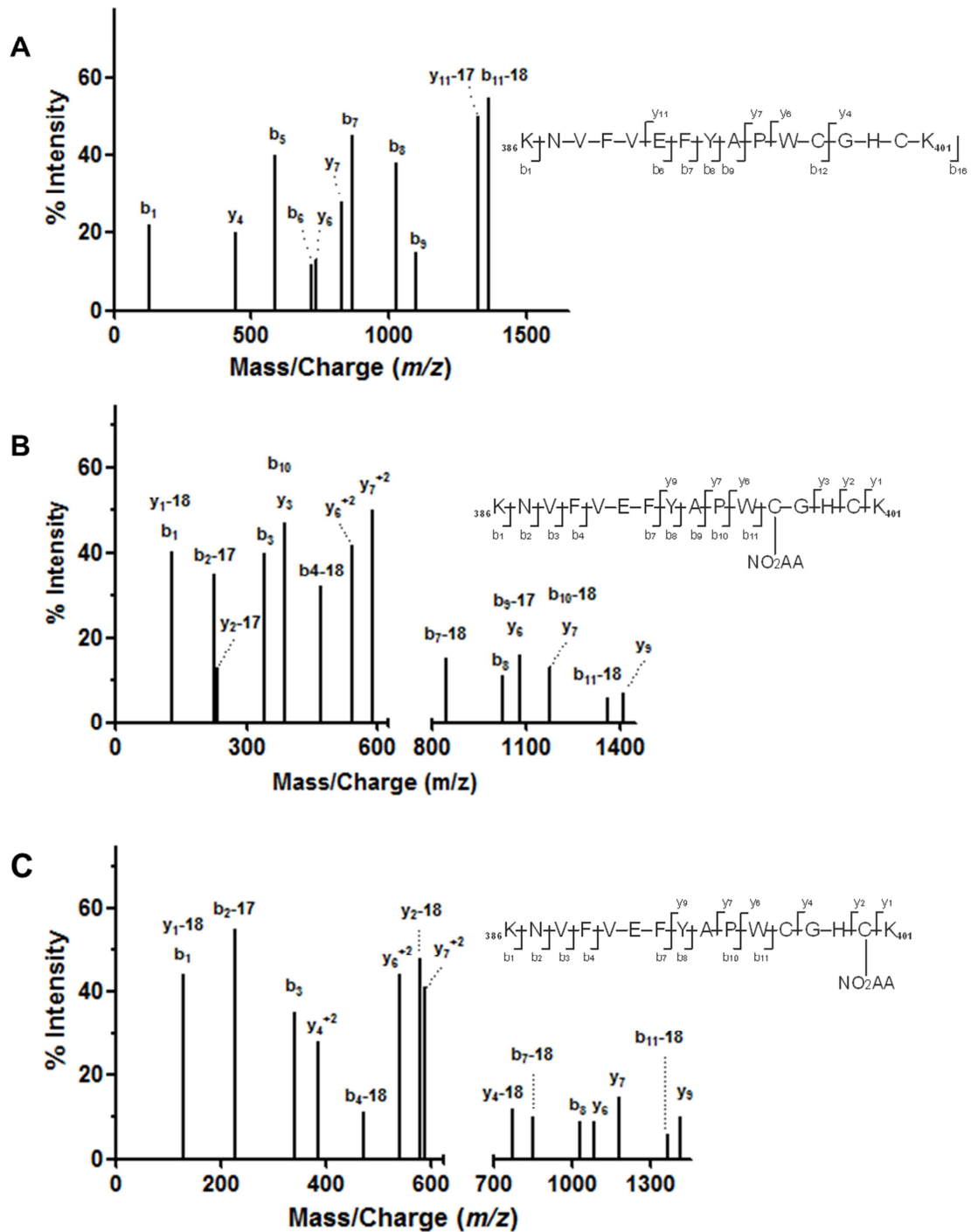


**Figura 39. Alquilación con NEM de PDI previamente nitroalquilada.** La PDI recombinante previamente reducida fue incubada con NO<sub>2</sub>AA (relación 1:10) y posteriormente con NEM por 30 minutos a 37°C. La muestra fue separada por HPLC en fase reversa y analizada por MS. El espectro obtenido presenta 4 picos de 61249, 61702, 62163 y 62400 Da. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Finalmente, para determinar el o los sitios de reactividad del NO<sub>2</sub>AA con la PDI se realizó la digestión con tripsina de la PDI tratada con NO<sub>2</sub>AA seguido del

análisis por LC-MS/MS (Figura 40). Se determinaron que cuatro residuos de cisteína diferentes se encuentran modificados por el nitroalqueno. La figura 40 muestra los espectros de las series *y*- y *b*- de los péptidos conteniendo la cisteína del sitio activo *a'* (<sub>386</sub>KNVFVEFYAPWCGHCK<sub>401</sub>). Los espectros muestran la presencia de fragmentos compatibles con la adición de una molécula de NO<sub>2</sub>AA en la cisteína 397 (Figura 41B, fragmento *y*6) y o en la cisteína 400 (Figura 40C, fragmento *y*2). No se pudo detectar el péptido con ambos residuos aductados así como la modificación de las cisteínas del sitio activo *a* (datos no mostrados). Se observaron otras dos cisteínas aductadas en el dominio *b'* (Cys312 y Cys343) (datos no mostrados).

La PDI está formada por 4 dominios estructurales tipo tiorredoxina, dos de los cuales contienen el motivo catalítico ditiol CGHC que le permite a la proteína ejercer las actividades reductasa e isomerasa así como la actividad oxidasa del ditiol [154, 157, 167, 180, 276]. Nuestros resultados muestran que dos cisteínas del motivo CGHC del dominio *a'* (Cys397 y Cys400) resultan modificadas covalentemente por el NO<sub>2</sub>AA, lo que puede explicar la inhibición de la actividad reductasa de PDI observada (Figura 40). Asimismo, las alquilaciones de los residuos de cisteína en el dominio *b'* podrían explicar los efectos sobre la actividad chaperona de PDI, pero como el efecto no depende de residuos de cisteína para su actividad [278], la inhibición podría ser debida por un posible cambio conformacional de la PDI que genere una disminución de la actividad chaperona.



**Figura 40. Identificación de los residuos de cisteína modificados por NO<sub>2</sub>AA en la PDI.** La PDI recombinante previamente reducida fue incubada con NO<sub>2</sub>AA (relación 1:10) y la proteína digerida overnight con tripsina (relación 1:50). Luego, las muestras se analizaron por LC-MS/MS como se explica en materiales y métodos. Los espectros muestran las series *y*- y *b*- de las muestras no tratadas (**A**) o tratadas (**B**, **C**) con NO<sub>2</sub>AA correspondientes al péptido <sup>386</sup>KNVFEFYAPWCGHCK<sub>401</sub>. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

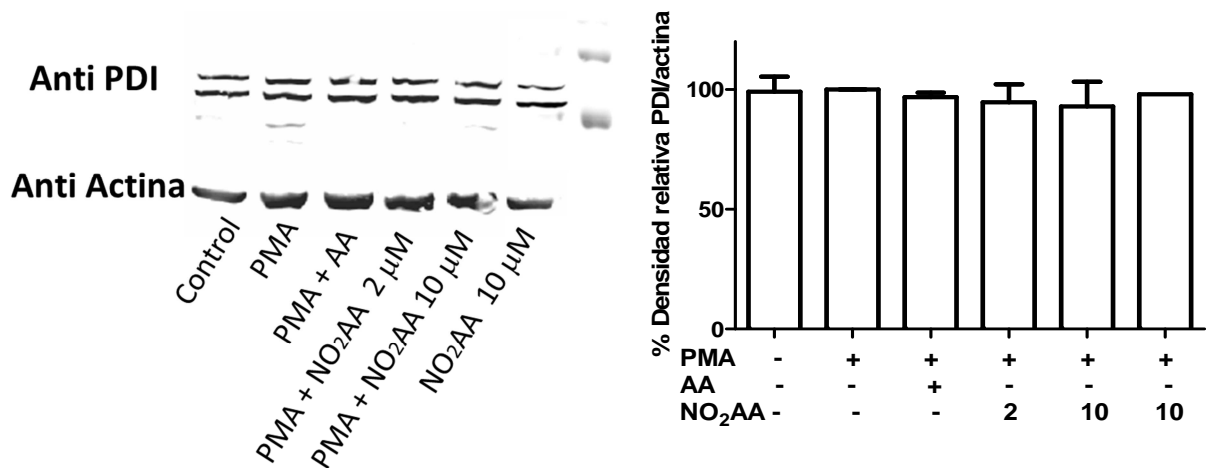
## **6.4 Estudio el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la PDI en macrófagos y su relación con la actividad NOX2**

Hasta el momento, hemos demostrado que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de inhibir la actividad NOX2, impidiendo la migración de los componentes citosólicos a la membrana y asimismo el NO<sub>2</sub>AA es capaz de inhibir a la PDI mediante la formación de aductos covalentes con las cisteínas de la PDI. Como fue propuesto previamente, dada la participación de la PDI en la activación de la NOX2 [116], el efecto inhibitorio de NO<sub>2</sub>AA sobre la NOX2 puede deberse a su capacidad de inhibir la PDI y no sobre el complejo enzimático. Para evaluar esta hipótesis, se estudió el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la PDI en macrófagos activados con PMA, condiciones en las cuales el nitroalqueno inhibe la actividad NOX2. Para ello se realizaron estudios analizando el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la expresión de la PDI, su distribución celular así como sobre la actividad NOX.

### **6.4.1 Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la expresión de la PDI en macrófagos**

Primero, se estudió el efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la cantidad intracelular de PDI en macrófagos activados mediante estudios de western blot (Figura 41). Macrófagos tratados con NO<sub>2</sub>AA o AA y activados con PMA, fueron lisados y la presencia de la enzima analizada por western blot utilizando un anticuerpo anti-PDI. La activación macrofágica no genera cambios significativos en la cantidad intracelular de la PDI con respecto a las células en reposo (Figura 41), ni la adición de NO<sub>2</sub>AA, descartando un efecto sobre la cantidad de enzima.



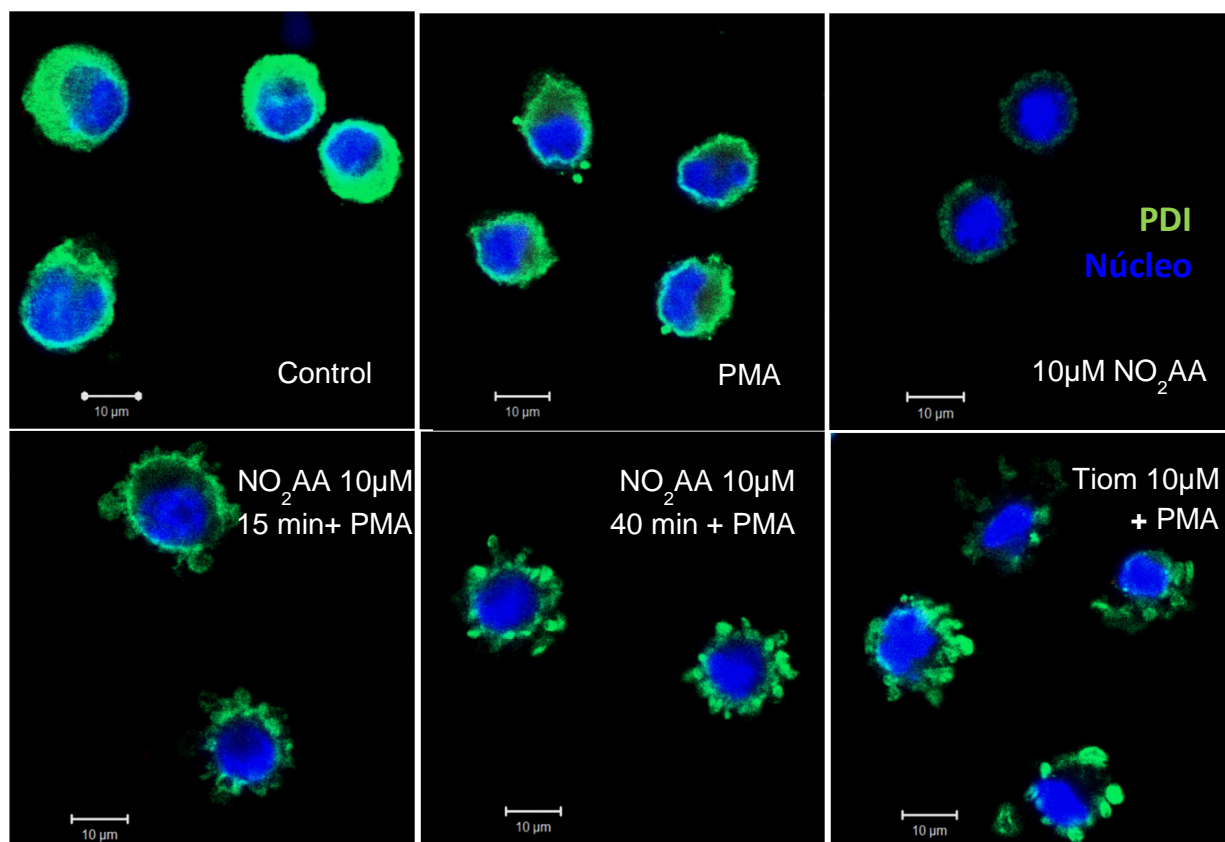


**Figura 41. Determinación de la cantidad intracelular de PDI en macrófagos activados por Western blot.** Los macrófagos J774A.1 ( $1 \times 10^6$  células) fueron tratados o no con NO<sub>2</sub>AA (2 y 10 μM) o AA (10 μM) por 15 minutos y posteriormente activados por 15 min con PMA (3 μg/mL). Las células fueron levantadas y lisadas por sonicación. En las condiciones con tratamiento, las células fueron incubadas con la presencia de PDI fue evaluada por western blot usando anticuerpo anti-PDI. En la figura se muestra el western blot del lisado celular anti-PDI y anti-actina como proteína reportera constitutiva (izquierda) y se presenta la cuantificación por densitometría respecto a la actina (derecha). Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  SD,  $n=3$ .

### 6.4.2 Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la distribución de PDI en los macrófagos activados

Posteriormente se estudió la distribución de PDI en macrófagos activados con PMA mediante estudios de microscopía confocal. Los macrófagos no activados presentaron una distribución citosólica de la PDI la cuál cambia en presencia de PMA, localizándose preferentemente cerca de las membranas (fluorescencia verde, Figura 42) lo que estaría de acuerdo con su participación en la activación de la NOX2. Cuando las células fueron tratadas con 10 μM de NO<sub>2</sub>AA y luego activadas con PMA se observó un cambio conformacional de los macrófagos con formación de estructuras esféricas en la superficie celular donde se observó la concentración del contenido de la PDI (Figuras 42 y 44). Muy importante, estos cambios no se observaron en los macrófagos en reposo tratados con el nitroalqueno (Figuras 42 y 44). El precursor no nitrado, el AA, no generó diferencias con respecto al control (dato no mostrado). El efecto del NO<sub>2</sub>AA parece ser más notorio cuando aumentan

los tiempos de tratamiento, por ejemplo comparando los datos a 15 y 40 minutos de tratamiento (Figura 42).

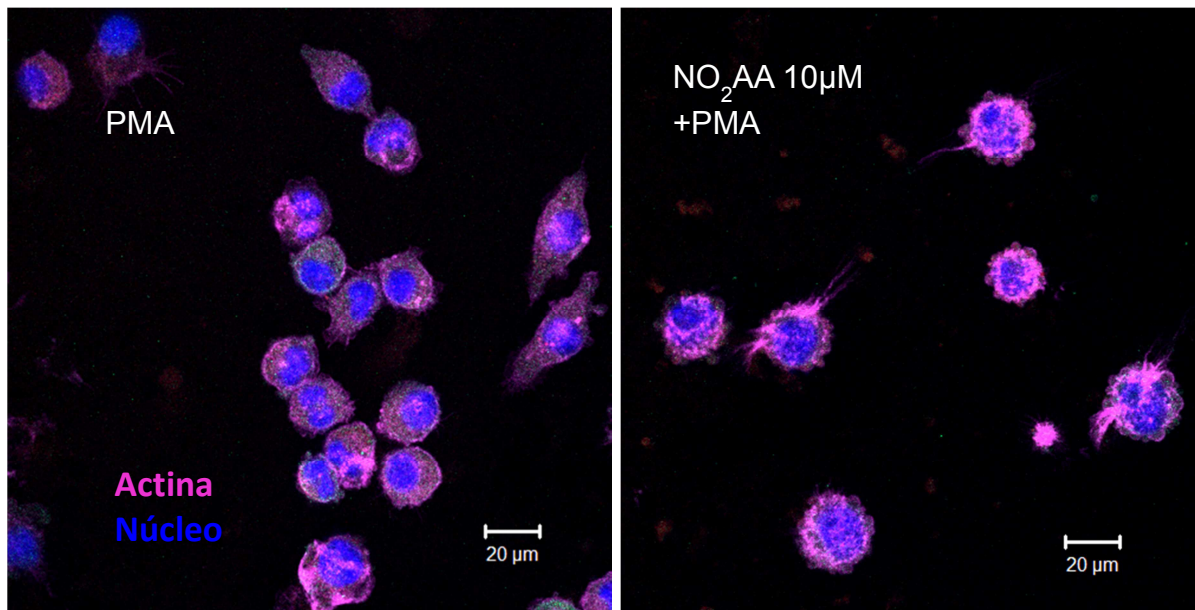


**Figura 42. Efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la distribución de PDI en macrófagos activados.** La distribución intracelular de PDI en macrófagos fue estudiada por microscopia confocal. Los macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^4$  células) (condición control) fueron activados con PMA (3 µg/mL) por 15 minutos a 37°C (condición PMA). En paralelo, se incubaron macrófagos con 10 µM NO<sub>2</sub>AA por 15 o 40 minutos o con el inhibidor de la PDI, Tiom (10 µM). Luego, las células fueron lavadas y activadas con PMA (3 µg/mL) por 15 minutos a 37°C. Las células se fijaron, permeabilizaron y bloquearon y se marcó la PDI mediante un anticuerpo primario anti-PDI y con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con FITC (verde) y los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal de fluorescencia (Zeiss). Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Cuando se realizaron estos estudios en presencia de un inhibidor de la PDI, el tiomusimol [279, 280], se observa un cambio morfológico similar indicando que la inhibición de PDI provoca estos fenómenos (Figura 42). De esta forma, nuestros datos sugieren que el cambio conformacional observado es debido a la inhibición

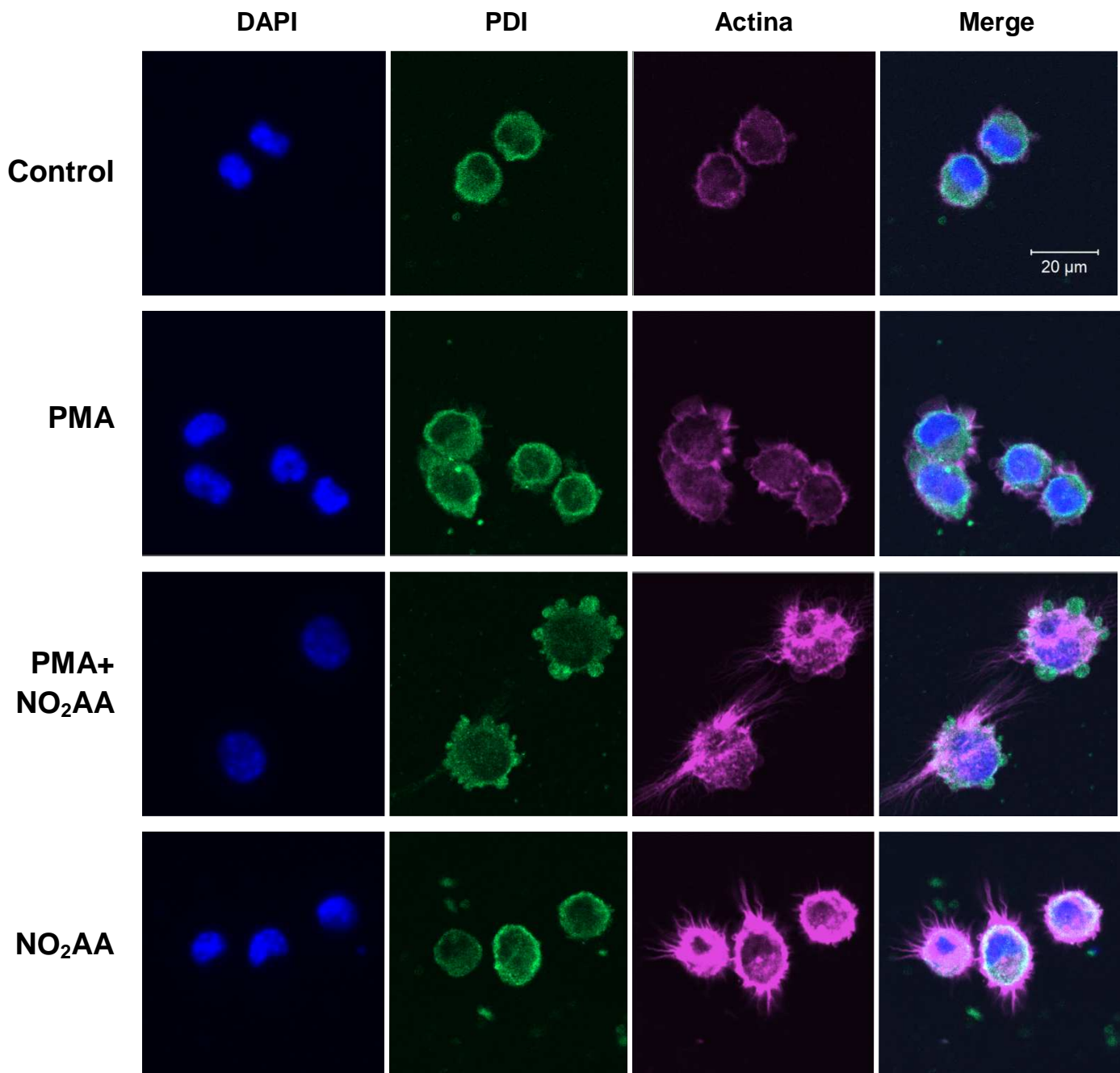
de la PDI. Posteriormente se estudió si estas estructuras están rodeadas por actina, lo cual indicarian que podrían ser podosomas. Los podosomas son estructuras esféricas altamente dinámicas, ricas en actina que se encuentran en células derivadas de monocitos, tales como macrófagos, osteoclastos y células dendríticas [281]. Por lo tanto, se estudió el efecto del nitroalqueno sobre las actina utilizando la faloidina conjugada con un flouorforo para su detección. La faloidina es una toxina del hongo *Amanita phalloides*, que se une a los filamentos de actina con alta afinidad y los estabiliza previniendo la depolarización de las fibras [282]. Su afinidad por las fibras de actina F permite ser utilizado como marcador de la actina [264, 272, 283]. Los estudios de microscopía confocal mostraron que las fibras de actina están alteradas en las células activadas tratadas con NO<sub>2</sub>AA, así como la morfología celular, en comparación a los macrófagos activados en ausencia del nitroalqueno (Figura 43). En condiciones tratadas con NO<sub>2</sub>AA se observó la presencia de fibras de estrés de actina con largas estructuras filamentosas marcadas con faloidina (Figuras 43 y 44), no observada en las células activadas con PMA o en condiciones de reposo con el NO<sub>2</sub>AA (Figura 44).

Durante la activación, p47<sup>phox</sup> se une con el citoesqueto [89, 110, 112, 114] mediante la unión entre el dominio PX de p47<sup>phox</sup> y la moesina, la cual pertenece a la familia de proteínas de unión a actina [113]. El efecto preciso de la asociación entre el citoesqueleto y los componentes de la NOX2 es desconocido pero se sugiere que la interacción de moesina-PX puede ser responsable de la translocación de p47<sup>phox</sup> [90, 115]. Por lo tanto, las alteraciones observadas sobre la actina podría actuar también sobre esta interacción afectando la translocación de p47<sup>phox</sup> hacia la membrana celular.



**Figura 43. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre las fibras de actina en macrófagos activados con PMA.** Los macrófagos de línea celular J774A.1 ( $5 \times 10^4$  células) activados con PMA (izquierda) fueron incubados previamente con 10  $\mu$ M NO<sub>2</sub>AA (derecha) por 40 minutos a 37°C en PBS. Las células fueron primero fijadas, permeabilizadas y bloqueadas y se marcó la actina con faloidina (violeta) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Las células luego fueron observadas por microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

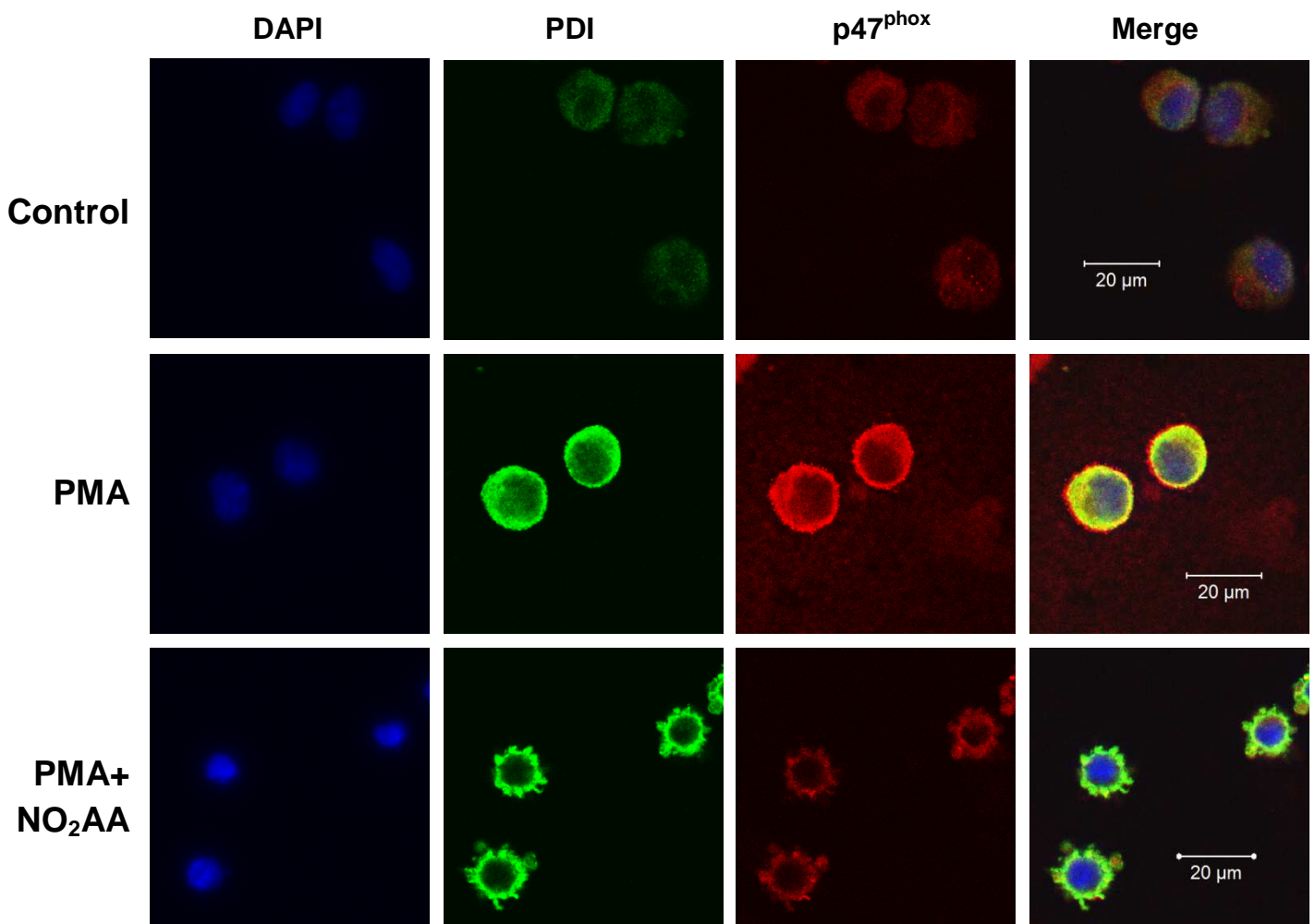
Realizando el mismo experimento pero marcando al mismo tiempo la PDI, se observó que las estructuras esféricas donde se encuentra la mayor intensidad de fluorescencia verde correspondiente a la enzima (Figura 44) no presentan el core de F-actina característico de los podosomas [284-286]. Estos resultados sugerirían que la PDI no se distribuye en podosomas. De todas formas, y muy importante para continuar nuestro trabajo, las imágenes obtenidas nos permiten confirmar un notorio cambio conformacional debido a la presencia del nitroalqueno.



**Figura 44. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre las fibras de actina y PDI en macrófagos activados con PMA.** Los macrófagos de línea celular J774A.1 ( $5 \times 10^4$  células) fueron tratadas con 10  $\mu$ M NO<sub>2</sub>AA y PMA como se describió previamente. Todas las células fueron primero fijadas, permeabilizadas y bloqueadas y se marcó la PDI (verde), la actina con faloidina conjugada (violeta) y los núcleos con DAPI (azul). El análisis de las células fue realizado mediante estudios de microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

La PDI se postula que actúa como un organizador redox de NOX2 en leucocitos por asociación con p47<sup>phox</sup> y controlando su reclutamiento hacia la membrana plasmática, un paso esencial para el montaje de la enzima activa [116], observando la colocalización de p47<sup>phox</sup> y PDI por microscopia confocal en

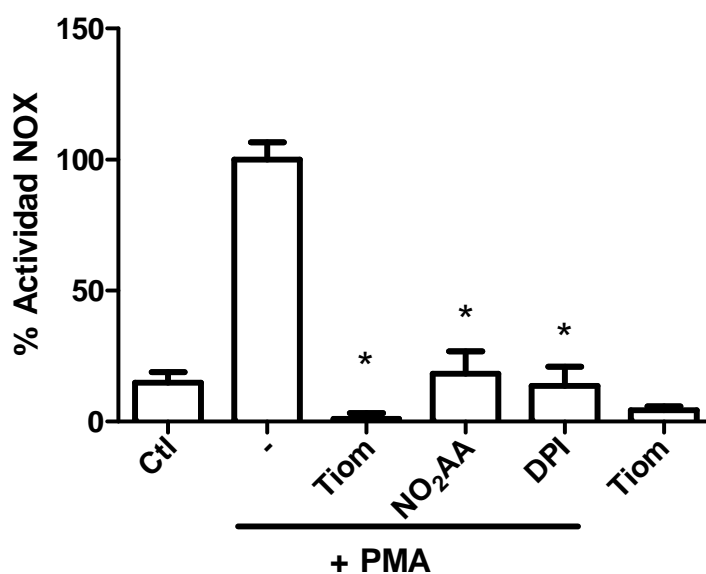
neutrófilos activados [116]. Es posible que el NO<sub>2</sub>AA, al alquilar a la PDI pueda afectar la interacción con p47<sup>phox</sup> y de esta manera explicar la inhibición observada para la NOX2. Se realizaron entonces estudios de microscopía confocal marcando la PDI y p47<sup>phox</sup> para determinar si está afectada la colocalización mencionada (Figura 45). La activación celular con PMA indujo un incremento de la colocalización de ambas proteínas, determinado por un aumento de la fluorescencia amarilla. Cuando la activación es realizada en macrófagos tratados con NO<sub>2</sub>AA, sugiriendo una disminución en la colocalización (Figura 45). De esta forma, la presencia del nitroalqueno afectaría a la interacción p47<sup>phox</sup>-PDI, efecto que explicaría la inhibición de la NOX2.



**Figura 45. Efecto de NO<sub>2</sub>AA sobre la colocalización PDI y p47<sup>phox</sup> en macrófagos activados.** Los macrófagos J774A.1 ( $5 \times 10^4$  células) fueron tratados como en la figura 33. Luego de que las células fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas utilizando anticuerpos anti-PDI (verde), anti-p47<sup>phox</sup> (rojo) y DAPI para los núcleos (azul), fueron observados por microscopía confocal. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

### 6.4.3 Efecto de la inhibición de PDI en actividad NOX2

Previamente se reportó que el silenciamiento de PDI en macrófagos J774 es capaz de disminuir la producción de  $O_2^{\bullet-}$  por la NOX2, mientras que la sobreexpresión de la PDI aumenta su actividad [117]. Por ende, la inhibición de la PDI por  $NO_2AA$  podría explicar la inhibición de la formación de  $O_2^{\bullet-}$  por NOX2. Para probarlo realizamos un ensayo de actividad NOX2 utilizando el Tiomuscimol para determinar si es capaz inhibir la actividad NOX2, mediante la oxidación de Amplex Red en presencia de HRP (Figura 46). Se observó una disminución de la oxidación del Amplex Red en presencia del tiomuscimol similar a la observada para el  $NO_2AA$  y al DPI.



**Figura 46. Efecto del tiomuscimol sobre la actividad NOX2 en macrófagos activados.** Los macrófagos J774A.1 ( $2 \times 10^5$  células) fueron tratados con  $NO_2AA$  ( $10 \mu M$ ), Tiom ( $10 \mu M$ ) o DPI ( $50 \mu M$ ) por 15 minutos a  $37^\circ C$  en buffer dPBS. Luego las células fueron lavadas y activadas con PMA ( $3 \mu g/mL$ ). Como control se incluyó la condición de Tiom en ausencia de PMA. La formación de  $O_2^{\bullet-}$  se midió por fluorescencia del Amplex Red como previamente en un lector de placa de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 515 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ ). En la Figura se muestra el grafico de las pendientes iniciales de cada condición. \* indica diferencias estadísticas comparadas con la condición con PMA,  $p < 0.05$ . ( $n=3$ )

Es importante tener en cuenta que el tiomuscimol es un agonista del receptor GABA [280, 287] por lo que no es un inhibidor específico de PDI.

Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la NOX2 podría ser por inhibición de PDI por NO<sub>2</sub>AA pero es necesario realizar más estudios para poder demostrar el efecto de la inhibición de PDI sobre la NOX2 y el blanco del nitroalqueno.



## 7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

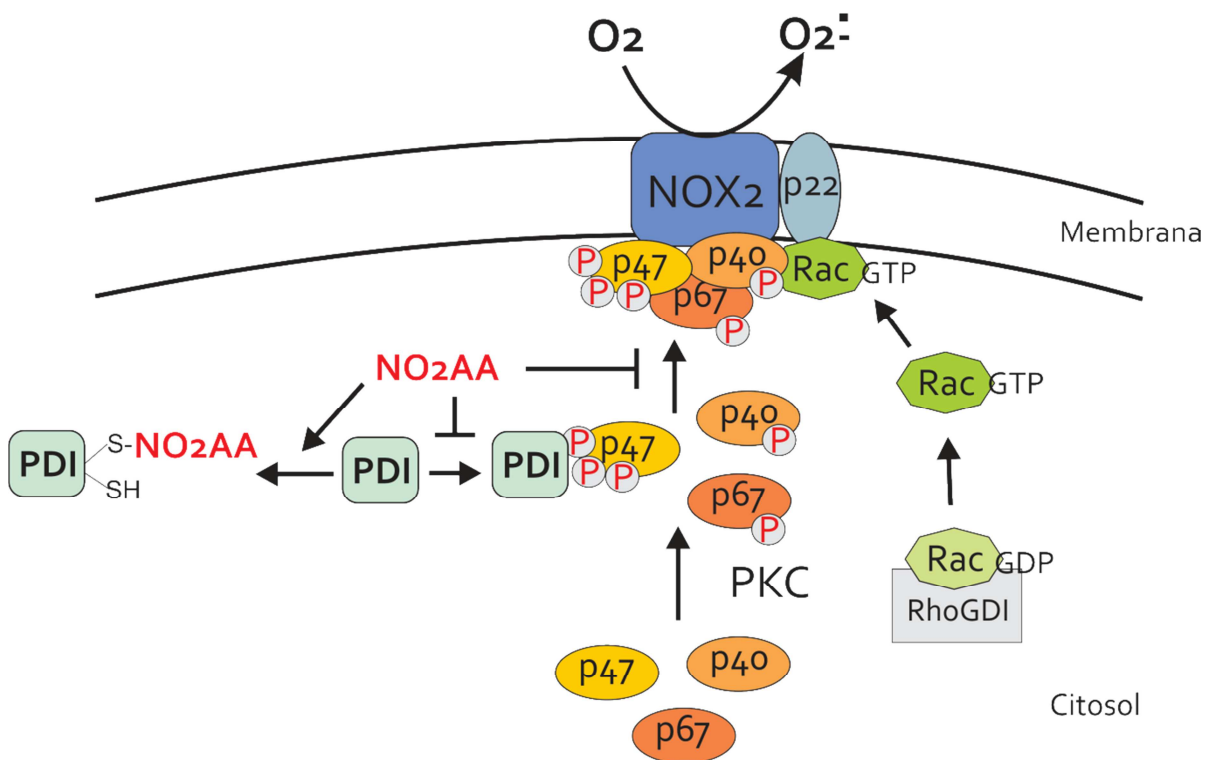
En este trabajo hemos determinado que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de inhibir a la actividad NOX2 en macrófagos primarios y de línea celular así como neutrófilos humanos activados utilizando varias metodologías de detección de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> mediante estudios de absorbancia, fluorescencia y luminiscencia. Dicha inhibición es dependiente de la dosis de NO<sub>2</sub>AA (IC<sub>50</sub> de 2.1 ± 1.4 μM) y con una dependencia del tiempo de incubación presentando menor inhibición a través del tiempo lo que permite concluir que el efecto es reversible. La inhibición observada por el NO<sub>2</sub>AA también ocurre dentro del fagosoma afectando la producción de oxidantes, sin alterar la fagocitosis así como la viabilidad celular. La inhibición de la actividad NOX2 en macrófagos activado se debe a una disminución de la migración de p47<sup>phox</sup> a la membrana y la formación del complejo activo, sin afectar la fosforilación de los componentes citosólicos (Figura 48). El mecanismo exacto de esta inhibición aún no está dilucidado.

En vista de la relación entre la PDI con la activación de la NOX2 en neutrófilos [116] la cual presenta cisteínas críticas para su actividad, se estudió si el NO<sub>2</sub>AA afecta a la PDI de forma de modificar la actividad NOX2. Hemos determinado que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de inhibir dosis dependiente a la actividad reductasa (IC<sub>50</sub> de 7.72 ± 2.9 μM) y chaperona (IC<sub>50</sub> de 15.8 ± 3.75 μM) de PDI *in vitro*, y dependiente del tiempo de incubación, el cual es independiente de la formación de •NO. El mecanismo posible podría ser debido a la formación de aductos de Michael entre el NO<sub>2</sub>AA y la PDI, como blanco preferencial por la presencia de cisteínas esenciales para su función. La formación de aductos covalentes reversibles entre NO<sub>2</sub>AA y residuos de cisteínas del sitio activo de la PDI fue confirmado mediante el ensayo de PEG switch y estudios de MS, siendo blanco preferencial la forma reducida de la enzima.

En estudios de microscopia confocal de macrófagos activados, determinamos que el NO<sub>2</sub>AA modifica la morfología celular afectando la distribución de la PDI intracelular y la estructura de actina. El inhibidor de PDI, el tiomuscimol, presenta efectos similares a los observados por NO<sub>2</sub>AA en la morfología celular y en la actividad NOX2. De esta forma, determinamos que la inhibición de la PDI por

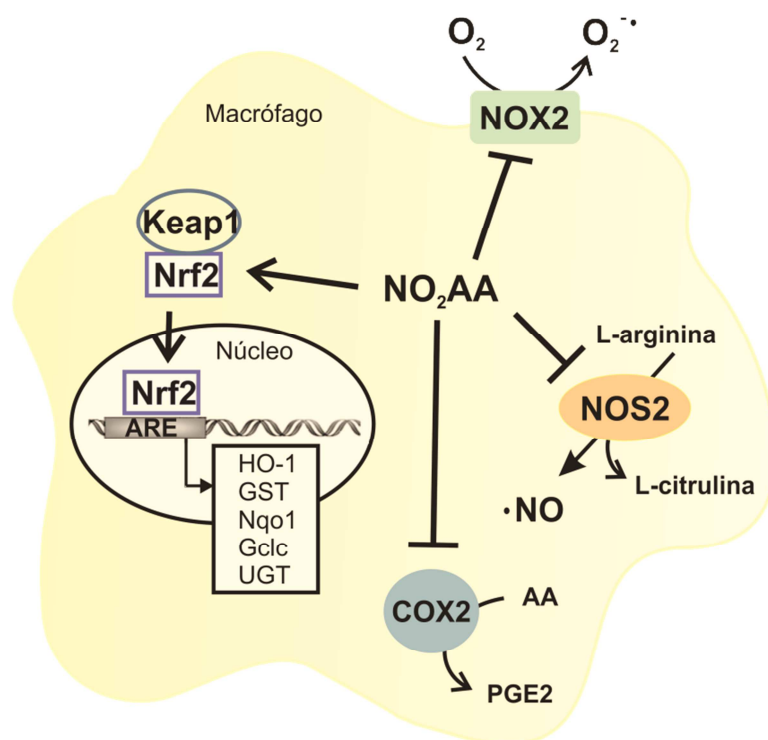
NO<sub>2</sub>AA en macrófagos activados podría ser la explicación de la inhibición observada de la NOX2. Está reportado que la PDI es un organizador redox que interacciona con p47<sup>phox</sup> para la migración a la membrana [116]. Observamos que en presencia del nitroalqueno la colocación de p47<sup>phox</sup> con PDI esta disminuida lo que la presencia del NO<sub>2</sub>AA afecta la interacción.

Por lo tanto, concluimos que la PDI es una proteína blanco del nitroalqueno, implicando la formación de un aducto covalente con las cisteínas del sitio activo de PDI que provocaría la disminución de la interacción de PDI con p47<sup>phox</sup> y disminuiría la actividad de NOX2 evitando la migración de p47<sup>phox</sup> a la membrana. Como PDI presenta otras funciones celulares, es posible que la nitroalquilación de PDI pueda afectar otras funciones, explicando los efectos observados previamente, por ejemplo, la inhibición de la agregación plaquetaria por NO<sub>2</sub>AA [167, 288], donde también participa PDI activamente (Figura 48).



**Figura 48. Esquema del efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre la PDI y NOX2.** El NO<sub>2</sub>AA es un inhibidor de actividad NOX2 mediante la prevención de la translocación de los componentes citosólicos a la membrana, mediante la formación de un aducto covalente con la PDI. Esto provoca que la PDI pueda interactuar con p47<sup>phox</sup>, lo que es necesario para la migración y formación del complejo activo.

Hasta el momento, los estudios realizados han sido mediante ensayos con enzimas aisladas o con cultivos celulares pero no se han demostrado de forma sistémica los efectos antiinflamatorios del NO<sub>2</sub>AA *in vivo*. En este trabajo se realizaron estudios *ex vivo* con macrófagos peritoneales extraídos de ratones tratados con tioglicolato, un agente quimioatrayente de leucocitos, y con el NO<sub>2</sub>AA por inyección subcutánea, donde se observó que los macrófagos presentaban menor activación que los extraídos de ratones control. Este resultado nos permitió concluir que el NO<sub>2</sub>AA es capaz de ser absorbido y distribuido de forma de afectar la funcionalidad del macrófago.



**Figura 49. Esquema del efecto del NO<sub>2</sub>AA sobre enzimas claves en macrófagos.** En el esquema se ilustran las acciones inhibitorias del NO<sub>2</sub>AA sobre las enzimas NOX2, NOS2 y COX2, así como la activación de la vía Nrf-2, que es capaz de migrar al núcleo y activar la expresión de enzimas antioxidantes [221, 222, 226, 227, 289]. Adaptado de [218].

En suma con los resultados obtenidos en otros trabajos y en esta tesis, determinamos que el NO<sub>2</sub>AA es un modulador de la funcionalidad macrofágica, inhibiendo enzimas claves en los procesos inflamatorios en macrófagos como NOX2, NOS2 y PGHS-2 [221, 226, 227, 289] y estimulando la expresión de

enzimas antiinflamatorias (como la vía de Nrf2) [222] de forma de generar un macrófago más con un fenotipo menos inflamatorio (Figura 49).

Como perspectivas del trabajo se plantea la continuación de los ensayos enzimáticos utilizando fracciones celulares (membrana y citosol) de forma de determinar qué componentes están involucrados en la inhibición de NOX2, así como el rol de PDI nitroalquilada en la actividad NOX2, esperando ver una disminución con agregados de PDI preincubada con el nitroalqueno. Asimismo, se plantea dilucidar los efectos de NO<sub>2</sub>AA en un modelo animal de inflamación así como las vías involucradas, lo que nos permitiría avanzar en el entendimiento de las acciones del NO<sub>2</sub>AA así como sus propiedades como posible fármaco.

## 8 AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a:

A la ANII, a Facultad de Química y a PEDECIBA Química que sin su apoyo no hubiera sido posible esta tesis.

A mis orientadores, por su apoyo en todo este proceso. Al Trocha, por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por las discusiones de resultados, por el respeto y la paciencia, por enseñarme a hacer “una cosa a la vez” y por el apoyo que siempre me ha brindado desde el primer día haciendo que me sienta muy valorada. A Homer, por muchas cosas, por los consejos, los chistes, el apoyo, por escucharme y por enseñarme a ver la “big picture”, que a veces se me pierde.

A Francisco Laurindo y su gente que me han enseñado mucho en su Laboratorio y me han hecho sentir como en casa.

A Rafa, por los consejos y por aceptarme en el CEINBIO, un espacio de trabajo excelente para ciencia, por su gran calidad científica y humana.

A mis compañeros de Laboratorio que hacen que sea un lugar increíble para trabajar donde todos están dispuestos a ayudar sin querer nada a cambio, con mucho compañerismo y pasión por lo que hacen. A los “juniors” que ya no son tan juniors, mis amigos del lab, que tanto compartimos y que hacen más lindo trabajar en Ciencia.

A Ceci, Ale, Mosko, Bea, Dami, Gabi, Madia, Lu P. y Nati Romero que me han ayudado y enseñado distintas técnicas, lo que ha sido fundamental para muchos experimentos de la tesis.

A Pao, que tanto hace por nosotros en el CEINBIO.

A Mauri, por los experimentos de MS, las discusiones e incluso los chistes malos.

A Noel, que es una mentora para mí. Por todo lo que me ha enseñado (no solo de ciencia).

A Carito, gracias por toda la ayuda, el apoyo, los consejos y por todo lo que compartimos: los macrófagos, las listas, los viajes, y mucho más. Esto no hubiera sido lo mismo sin ella.

A mis amigos de la vida, de la carrera, del 10, del CECIEN, de la LBH, que siempre me han acompañado en todo lo que me he propuesto.

A mi familia, por el apoyo incondicional, aunque no siempre entiendan lo que hago. En especial, a mi padre, que hoy no está pero es gran responsable que yo esté aquí haciendo esto.

A Rolo, por todo.

## 9 REFERENCIAS

1. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
2. Libby, P., *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. Nutr Rev, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S140-6.
3. Fujiwara, N. and K. Kobayashi, *Macrophages in inflammation*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 281-6.
4. Middleton, J., et al., *Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium*. Blood, 2002. **100**(12): p. 3853-60.
5. Kawai, T. and S. Akira, *Pathogen recognition with Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(4): p. 338-44.
6. Lien, E. and R.R. Ingalls, *Toll-like receptors*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Supp): p. S1-S11.
7. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
8. Radi, R., et al., *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(2): p. 481-7.
9. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 820-32.
10. Hibbs, J.B., Jr., et al., *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(1): p. 87-94.
11. Klebanoff, S.J., *Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes*. Ann Intern Med, 1980. **93**(3): p. 480-9.
12. Patel, R.P., et al., *Biological aspects of reactive nitrogen species*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 385-400.
13. Pizzolla, A., et al., *Reactive oxygen species produced by the NADPH oxidase 2 complex in monocytes protect mice from bacterial infections*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 5003-11.
14. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
15. Sbarra, A.J. and M.L. Karnovsky, *The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes*. J Biol Chem, 1959. **234**(6): p. 1355-62.
16. Brand, M.D., et al., *Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 755-67.
17. Kuppusamy, P. and J.L. Zweier, *Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation*. J Biol Chem, 1989. **264**(17): p. 9880-4.

18. Gardner, P.R., *Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling*. Biosci Rep, 1997. **17**(1): p. 33-42.
19. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 197-223.
20. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 662-80.
21. Jourdain, D., et al., *Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28799-805.
22. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
23. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen peroxide sensing and signaling*. Mol Cell, 2007. **26**(1): p. 1-14.
24. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes*. Science, 1970. **169**(3950): p. 1095-7.
25. Ignarro, L.J., *Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990. **30**: p. 535-60.
26. Denicola, A., et al., *Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching*. Arch Biochem Biophys, 1996. **328**(1): p. 208-12.
27. Cooper, C.E., *Nitric oxide and iron proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 290-309.
28. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
29. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
30. Hibbs, J.B., Jr., R.R. Taintor, and Z. Vavrin, *Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite*. Science, 1987. **235**(4787): p. 473-6.
31. Stuehr, D.J. and C.F. Nathan, *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1543-55.
32. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
33. Stuehr, D.J., *Mammalian nitric oxide synthases*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 217-30.
34. Vodovotz, Y., et al., *Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2914-25.
35. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
36. Xie, Q.W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan, *Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4705-8.



37. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4003-8.
38. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. Arch Biochem Biophys, 1995. **324**(1): p. 15-25.
39. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
40. Spencer, J.P., et al., *Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(7): p. 1039-50.
41. Whiteman, M., et al., *Hypochlorous acid-induced DNA base modification: potentiation by nitrite: biomarkers of DNA damage by reactive oxygen species*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(2): p. 572-6.
42. Rubbo, H. and R. Radi, *Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1318-24.
43. Schopfer, F.J., P.R. Baker, and B.A. Freeman, *NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(12): p. 646-54.
44. Nagy, G., et al., *Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity*. Immunol Lett, 2007. **111**(1): p. 1-5.
45. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
46. Metodiewa, D. and C. Koska, *Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview*. Neurotox Res, 2000. **1**(3): p. 197-233.
47. Trostchansky, A., et al., *Peroxynitrite flux-mediated LDL oxidation is inhibited by manganese porphyrins in the presence of uric acid*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(10): p. 1293-300.
48. Seeds, M.C. and D.A. Bass, *Regulation and metabolism of arachidonic acid*. Clin Rev Allergy Immunol, 1999. **17**(1-2): p. 5-26.
49. Lewis, R.A., K.F. Austen, and R.J. Soberman, *Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases*. N Engl J Med, 1990. **323**(10): p. 645-55.
50. Rouzer, C.A. and L.J. Marnett, *Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases*. Chem Rev, 2003. **103**(6): p. 2239-304.
51. Smith, W.L. and I. Song, *The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 115-28.

52. Kroetz, D.L. and D.C. Zeldin, *Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(3): p. 273-83.
53. Landino, L.M., et al., *Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15069-74.
54. Moore, K.P., et al., *Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite*. *Circ Res*, 1995. **77**(2): p. 335-41.
55. Tilley, S.L., T.M. Coffman, and B.H. Koller, *Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(1): p. 15-23.
56. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 145-82.
57. Di Rosa, M., et al., *Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1996. **54**(4): p. 229-38.
58. Trostchansky, A., et al., *Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: a free radical mechanism of inactivation*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(7): p. 1029-38.
59. Goodwin, D.C., et al., *Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(15): p. 8903-9.
60. Goodwin, D.C., L.M. Landino, and L.J. Marnett, *Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis*. *FASEB J*, 1999. **13**(10): p. 1121-36.
61. O'Donnell, V.B., et al., *Catalytic consumption of nitric oxide by prostaglandin H synthase-1 regulates platelet function*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(49): p. 38239-44.
62. Sakuma, S., et al., *The effects of nitric oxide and peroxynitrite on the formation of prostaglandin and arachidonoyl-CoA formed from arachidonic acid in rabbit kidney medulla microsomes*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003. **68**(5): p. 343-9.
63. Salvemini, D., M.G. Currie, and V. Mollace, *Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(11): p. 2562-8.
64. Upmacis, R.K., R.S. Deeb, and D.P. Hajjar, *Regulation of prostaglandin H2 synthase activity by nitrogen oxides*. *Biochemistry*, 1999. **38**(38): p. 12505-13.
65. Salvemini, D., et al., *Nitric Oxide Activates the Cyclooxygenase Pathway in Inflammation*. *Am J Ther*, 1995. **2**(9): p. 616-619.
66. Salvemini, D., et al., *Nitric oxide and the cyclooxygenase pathway*. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 1995. **23**: p. 491-3.
67. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. *Cell Mol Life Sci*, 2002. **59**(9): p. 1428-59.

68. Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte, *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.* J Clin Invest, 1973. **52**(3): p. 741-4.
69. Banfi, B., et al., *A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes.* J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37594-601.
70. Suh, Y.A., et al., *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1.* Nature, 1999. **401**(6748): p. 79-82.
71. Sareila, O., et al., *NOX2 complex-derived ROS as immune regulators.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(8): p. 2197-208.
72. Teahan, C., et al., *The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245.* Nature, 1987. **327**(6124): p. 720-1.
73. Cheng, G., et al., *Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5.* Gene, 2001. **269**(1-2): p. 131-40.
74. Geiszt, M., et al., *Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8010-4.
75. Shiose, A., et al., *A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney.* J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1417-23.
76. De Deken, X., et al., *Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family.* J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23227-33.
77. Dupuy, C., et al., *Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas.* J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37265-9.
78. Ehrt, S., et al., *Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase.* J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1123-40.
79. Ungvari, Z., et al., *Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system.* Am J Pathol, 2004. **165**(1): p. 219-26.
80. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
81. Cathcart, M.K., *Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 23-8.
82. Zhao, X., K.A. Carnevale, and M.K. Cathcart, *Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex.* J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40788-92.
83. Griending, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.* Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
84. Bromberg, Y. and E. Pick, *Unsaturated fatty acids as second messengers of superoxide generation by macrophages.* Cell Immunol, 1983. **79**(2): p. 240-52.

85. Matono, R., et al., *Arachidonic acid induces direct interaction of the p67(phox)-Rac complex with the phagocyte oxidase Nox2, leading to superoxide production.* J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 24874-84.
86. Shiose, A. and H. Sumimoto, *Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase.* J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13793-801.
87. Park, H.S., et al., *Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity.* Biochem J, 2001. **358**(Pt 3): p. 783-90.
88. Waite, K.A., et al., *Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase.* J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15569-78.
89. El-Benna, J., et al., *p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases.* Exp Mol Med, 2009. **41**(4): p. 217-25.
90. Groemping, Y. and K. Rittinger, *Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective.* Biochem J, 2005. **386**(Pt 3): p. 401-16.
91. Ago, T., et al., *Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase.* J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33644-53.
92. Yuzawa, S., et al., *A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase.* Genes Cells, 2004. **9**(5): p. 443-56.
93. Ago, T., et al., *Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4474-9.
94. Swain, S.D., et al., *Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence spectroscopy.* J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29502-10.
95. Fontayne, A., et al., *Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation.* Biochemistry, 2002. **41**(24): p. 7743-50.
96. Kawakami, N., et al., *Indication of a protein kinase C-independent pathway for NADPH oxidase activation in human neutrophils.* Arch Biochem Biophys, 1998. **349**(1): p. 89-94.
97. Reeves, E.P., et al., *Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils.* Biochem J, 1999. **344 Pt 3**: p. 859-66.
98. Dewas, C., et al., *The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils.* J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5238-44.
99. El Benna, J., et al., *Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein*

- kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996. **271**(11): p. 6374-8.
100. El Benna, J., et al., *Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **334**(2): p. 395-400.
  101. Knaus, U.G., et al., *Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors*. *Science*, 1995. **269**(5221): p. 221-3.
  102. Hoyal, C.R., et al., *Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5130-5.
  103. Benna, J.E., et al., *Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(27): p. 17204-8.
  104. Bouin, A.P., et al., *p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30097-103.
  105. Dusi, S. and F. Rossi, *Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox*. *Biochem J*, 1993. **296 ( Pt 2)**: p. 367-71.
  106. Someya, A., et al., *Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase*. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(5): p. 851-7.
  107. Leto, T.L., A.G. Adams, and I. de Mendez, *Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(22): p. 10650-4.
  108. Sumimoto, H., et al., *Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(12): p. 5345-9.
  109. Kanai, F., et al., *The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(7): p. 675-8.
  110. El Benna, J., et al., *P40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox*. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(6): p. 1014-20.
  111. el Benna, J., J.M. Ruedi, and B.M. Babior, *Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6729-34.
  112. Nauseef, W.M., et al., *Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(9): p. 5911-7.
  113. Wientjes, F.B., et al., *The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(2): p. 382-8.

114. Woodman, R.C., et al., *Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils*. J Clin Invest, 1991. **87**(4): p. 1345-51.
115. Zhan, Y., et al., *p47(phox) PX domain of NADPH oxidase targets cell membrane via moesin-mediated association with the actin cytoskeleton*. J Cell Biochem, 2004. **92**(4): p. 795-809.
116. de, A.P.A.M., et al., *Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(4): p. 799-810.
117. Santos, C.X., et al., *Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of Leishmania chagasi promastigotes by macrophages*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 989-98.
118. Kami, K., et al., *Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p*. EMBO J, 2002. **21**(16): p. 4268-76.
119. Ito, T., et al., *Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions*. EMBO J, 2001. **20**(15): p. 3938-46.
120. Nakamura, R., et al., *The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase*. Eur J Biochem, 1998. **251**(3): p. 583-9.
121. Dusi, S., M. Donini, and F. Rossi, *Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox*. Biochem J, 1996. **314** ( Pt 2): p. 409-12.
122. Cross, A.R., *p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558)*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 1): p. 113-7.
123. Lopes, L.R., et al., *Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase*. Biochemistry, 2004. **43**(12): p. 3723-30.
124. Bokoch, G.M. and T. Zhao, *Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1533-48.
125. Koga, H., et al., *Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25051-60.
126. Lapouge, K., et al., *Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 899-907.
127. Biberstine-Kinkade, K.J., et al., *Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox)*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31105-12.
128. Babior, B.M. and R.S. Kipnes, *Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement*. Blood, 1977. **50**(3): p. 517-24.
129. Doussiere, J., et al., *Critical assessment of the presence of an NADPH binding site on neutrophil cytochrome b558 by photoaffinity and immunochemical labeling*. Biochemistry, 1993. **32**(34): p. 8880-7.

130. Doussiere, J., G. Buzenet, and P.V. Vignais, *Photoaffinity labeling and photoinactivation of the O<sub>2</sub>(-)-generating oxidase of neutrophils by an azido derivative of FAD*. *Biochemistry*, 1995. **34**(5): p. 1760-70.
131. Kleinberg, M.E., et al., *Characterization of a phagocyte cytochrome b558 91-kilodalton subunit functional domain: identification of peptide sequence and amino acids essential for activity*. *Biochemistry*, 1992. **31**(10): p. 2686-90.
132. Koshkin, V. and E. Pick, *Superoxide production by cytochrome b559. Mechanism of cytosol-independent activation*. *FEBS Lett*, 1994. **338**(3): p. 285-9.
133. Nisimoto, Y., H. Otsuka-Murakami, and D.J. Lambeth, *Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(27): p. 16428-34.
134. Rotrosen, D., et al., *Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase*. *Science*, 1992. **256**(5062): p. 1459-62.
135. Sumimoto, H., et al., *Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **186**(3): p. 1368-75.
136. Huang, J., N.D. Hitt, and M.E. Kleinberg, *Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558*. *Biochemistry*, 1995. **34**(51): p. 16753-7.
137. Yu, L., L. Zhen, and M.C. Dinauer, *Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(43): p. 27288-94.
138. Doussiere, J., J. Gaillard, and P.V. Vignais, *Electron transfer across the O<sub>2</sub>- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component*. *Biochemistry*, 1996. **35**(41): p. 13400-10.
139. Isogai, Y., T. Iizuka, and Y. Shiro, *The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(14): p. 7853-7.
140. Koshkin, V., O. Lotan, and E. Pick, *Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1319**(2-3): p. 139-46.
141. Nisimoto, Y., et al., *The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558)*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 22999-3005.
142. Cifuentes-Pagano, E., et al., *Bridged tetrahydroisoquinolines as selective NADPH oxidase 2 (Nox2) inhibitors*. *Medchemcomm*, 2013. **4**(7): p. 1085-1092.
143. Pollock, J.D., et al., *Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production*. *Nat Genet*, 1995. **9**(2): p. 202-9.
144. Segal, A.W. and O.T. Jones, *Neutrophil cytochrome b in chronic granulomatous disease*. *Lancet*, 1979. **1**(8124): p. 1036-7.
145. Thrasher, A.J., et al., *Chronic granulomatous disease*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1227**(1-2): p. 1-24.
146. Segal, A.W., *The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease*. *Mol Med Today*, 1996. **2**(3): p. 129-35.

147. Ding, C., et al., *High-level reconstitution of respiratory burst activity in a human X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) cell line and correction of murine X-CGD bone marrow cells by retroviral-mediated gene transfer of human gp91phox*. *Blood*, 1996. **88**(5): p. 1834-40.
148. Curnutte, J.T., *Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease*. *Immunodefic Rev*, 1992. **3**(2): p. 149-72.
149. Ambruso, D.R., et al., *Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4654-9.
150. Alvarez, M.N., et al., *Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(8): p. 6627-40.
151. Alvarez, M.N., M. Trujillo, and R. Radi, *Peroxyntirite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide*. *Methods Enzymol*, 2002. **359**: p. 353-66.
152. Mabley, J.G., et al., *Part II: beneficial effects of the peroxynitrite decomposition catalyst FP15 in murine models of arthritis and colitis*. *Mol Med*, 2002. **8**(10): p. 581-90.
153. Mapp, P.I., et al., *Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(7): p. 1534-9.
154. Clissold, P.M. and R. Bicknell, *The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins*. *Bioessays*, 2003. **25**(6): p. 603-11.
155. Ellgaard, L. and L.W. Ruddock, *The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties*. *EMBO Rep*, 2005. **6**(1): p. 28-32.
156. Schwaller, M., B. Wilkinson, and H.F. Gilbert, *Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(9): p. 7154-9.
157. Wilkinson, B. and H.F. Gilbert, *Protein disulfide isomerase*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1699**(1-2): p. 35-44.
158. Marcus, N., et al., *Tissue distribution of three members of the murine protein disulfide isomerase (PDI) family*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1309**(3): p. 253-60.
159. Noiva, R., *Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Semin Cell Dev Biol*, 1999. **10**(5): p. 481-93.
160. Ferrari, D.M. and H.D. Soling, *The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds*. *Biochem J*, 1999. **339** ( Pt 1): p. 1-10.
161. Hatahet, F. and L.W. Ruddock, *Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(11): p. 2807-50.
162. Benham, A.M., *The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **16**(8): p. 781-9.
163. Hoozemans, J.J., et al., *Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **354**(3): p. 707-11.



164. Severino, A., et al., *Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(11): p. 1029-37.
165. Uehara, T., et al., *S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 513-7.
166. Unterberger, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(4): p. 348-57.
167. Laurindo, F.R., L.A. Pescatore, and C. Fernandes Dde, *Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(9): p. 1954-69.
168. Imaoka, S., *Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **290**: p. 121-66.
169. Kemmink, J., et al., *The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 239-45.
170. Sitia, R. and S.N. Molteni, *Stress, protein (mis)folding, and signaling: the redox connection*. Sci STKE, 2004. **2004**(239): p. pe27.
171. Gross, E., et al., *Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(2): p. 299-304.
172. Cai, H., C.C. Wang, and C.L. Tsou, *Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24550-2.
173. McLaughlin, S.H. and N.J. Bulleid, *Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase with type X collagen during intra-cellular folding and assembly*. Biochem J, 1998. **331 ( Pt 3)**: p. 793-800.
174. Maattanen, P., et al., *Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(5): p. 500-11.
175. Laurindo, F.R., et al., *Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(6): p. 1101-13.
176. Alanen, H.I., et al., *Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(4): p. 367-74.
177. Freedman, R.B., et al., *Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulphide-isomerase*. Biol Chem, 1998. **379**(3): p. 321-8.
178. Denisov, A.Y., et al., *Solution structure of the bb' domains of human protein disulfide isomerase*. FEBS J, 2009. **276**(5): p. 1440-9.
179. Wang, C., et al., *Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(1): p. 36-45.
180. Wang, C., et al., *Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1139-49.
181. Ali Khan, H. and B. Mutus, *Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles*. Front Chem, 2014. **2**: p. 70.

182. Edman, J.C., et al., *Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin*. Nature, 1985. **317**(6034): p. 267-70.
183. Koch, G.L., *Reticuloplasmins: a novel group of proteins in the endoplasmic reticulum*. J Cell Sci, 1987. **87 ( Pt 4)**: p. 491-2.
184. Yoshimori, T., et al., *Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal*. J Biol Chem, 1990. **265**(26): p. 15984-90.
185. Popescu, N.I., C. Lupu, and F. Lupu, *Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure*. Blood, 2010. **116**(6): p. 993-1001.
186. Reinhardt, C., et al., *Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1110-22.
187. Keller, M., et al., *Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion*. Cell, 2008. **132**(5): p. 818-31.
188. Freedman, R.B., T.R. Hirst, and M.F. Tuite, *Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(8): p. 331-6.
189. Haefliger, S., et al., *Protein disulfide isomerase blocks CEBPA translation and is up-regulated during the unfolded protein response in AML*. Blood, 2011. **117**(22): p. 5931-40.
190. Park, B., et al., *Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing*. Cell, 2006. **127**(2): p. 369-82.
191. Essex, D.W., et al., *Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation*. Biochemistry, 2001. **40**(20): p. 6070-5.
192. Cho, J., et al., *A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1123-31.
193. Flaumenhaft, R., *Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target*. Trends Cardiovasc Med, 2013. **23**(7): p. 264-8.
194. Raturi, A. and W. Ruf, *Effect of protein disulfide isomerase chaperone activity inhibition on tissue factor activity*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(8): p. 1863-5.
195. Bi, S., et al., *Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(26): p. 10650-5.
196. Goplen, D., et al., *Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9895-902.
197. Jain, S., L.W. McGinnes, and T.G. Morrison, *Thiol/disulfide exchange is required for membrane fusion directed by the Newcastle disease virus fusion protein*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2328-39.
198. Fernandes, D.C., et al., *Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA*

- expression: effects of nitrosothiol exposure.* Arch Biochem Biophys, 2009. **484**(2): p. 197-204.
199. Janiszewski, M., et al., *Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40813-9.
  200. O'Donnell, V.B., et al., *Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion.* Chem Res Toxicol, 1999. **12**(1): p. 83-92.
  201. 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.
  202. Trostchansky, A. and H. Rubbo, *Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties.* Free Radic Biol Med, 2008. **44**(11): p. 1887-96.
  203. Baker, P.R., et al., *Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11577-82.
  204. Cui, T., et al., *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators.* J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
  205. Ferreira, A.M., et al., *Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate.* Biochem J, 2009. **417**(1): p. 223-34.
  206. Ferreira, A.M., et al., *Nitro-fatty acids as novel electrophilic ligands for peroxisome proliferator-activated receptors.* Free Radic Biol Med, 2012. **53**(9): p. 1654-63.
  207. Ferreira, A.M., et al., *Nitroalkenes: synthesis, characterization, and effects on macrophage activation.* Methods Enzymol, 2008. **441**: p. 33-51.
  208. Schopfer, F.J., et al., *Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor.* J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19289-97.
  209. Trostchansky, A. and H. Rubbo, *Lipid nitration and formation of lipid-protein adducts: biological insights.* Amino Acids, 2007. **32**(4): p. 517-22.
  210. Bonacci, G., et al., *Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration.* J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44071-82.
  211. Salvatore, S.R., et al., *Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine.* J Lipid Res, 2013. **54**(7): p. 1998-2009.
  212. Tsikas, D., A.A. Zoerner, and J. Jordan, *Oxidized and nitrated oleic acid in biological systems: analysis by GC-MS/MS and LC-MS/MS, and biological significance.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 694-705.
  213. Tsikas, D., et al., *Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study.* Lipids, 2009. **44**(9): p. 855-65.
  214. Baker, P.R., et al., *Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands.* J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 42464-75.

215. Freeman, B.A., et al., *Nitro-fatty acid formation and signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15515-9.
216. Lim, D.G., et al., *Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 15941-6.
217. Schopfer, F.J., et al., *Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2340-5.
218. Trostchansky, A., et al., *Nitro-fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(11): p. 1257-65.
219. Vitturi, D.A., et al., *Modulation of nitro-fatty acid signaling: prostaglandin reductase-1 is a nitroalkene reductase*. J Biol Chem, 2013. **288**(35): p. 25626-37.
220. Lima, E.S., et al., *Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(4): p. 532-9.
221. Trostchansky, A., et al., *Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate*. Biochemistry, 2007. **46**(15): p. 4645-53.
222. Diaz-Amarilla, P., et al., *Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation*. Free Radic Biol Med, 2016. **95**: p. 112-120.
223. Batthyany, C., et al., *Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20450-63.
224. Ishii, T., et al., *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16023-9.
225. Villacorta, L., et al., *Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H770-6.
226. Bonilla, L., et al., *Regulation of protein kinase C by nitroarachidonic acid: impact on human platelet activation*. Arch Biochem Biophys, 2013. **533**(1-2): p. 55-61.
227. Trostchansky, A., et al., *Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 12891-900.
228. Malkowski, M.G., et al., *The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase*. Science, 2000. **289**(5486): p. 1933-7.
229. Blanco, F., et al., *6-Methylnitroarachidonate: a novel esterified nitroalkene that potently inhibits platelet aggregation and exerts cGMP-mediated vascular relaxation*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(3): p. 411-8.
230. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(9-10): p. 1302-14.
231. de Cavanagh, E.M., F. Insera, and L. Ferder, *Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria?* Cardiovasc Res, 2011. **89**(1): p. 31-40.

232. Sun, L., et al., *p66Shc mediates high-glucose and angiotensin II-induced oxidative stress renal tubular injury via mitochondrial-dependent apoptotic pathway*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **299**(5): p. F1014-25.
233. Sanchez-Calvo, B., et al., *Nitro-Arachidonic Acid Prevents Angiotensin II-Induced Mitochondrial Dysfunction in a Cell Line of Kidney Proximal Tubular Cells*. *PLoS One*, 2016. **11**(3): p. e0150459.
234. Clement, A.M., et al., *Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. *Science*, 2003. **302**(5642): p. 113-7.
235. Ralph, P. and I. Nakoinz, *Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line*. *Nature*, 1975. **257**(5525): p. 393-4.
236. Nakamura, K., et al., *Lymph node macrophages, but not spleen macrophages, express high levels of unmasked sialoadhesin: implication for the adhesive properties of macrophages in vivo*. *Glycobiology*, 2002. **12**(3): p. 209-16.
237. Choi, K.D., M. Vodyanik, and Slukvin, II, *Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells*. *Nat Protoc*, 2011. **6**(3): p. 296-313.
238. Marim, F.M., et al., *A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15263.
239. Coles, B., et al., *Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 5832-40.
240. Inanami, O., et al., *Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 9539-43.
241. Wolf, H.M., et al., *Phagocytosis of serum-opsonized zymosan down-regulates the expression of CR3 and FcRI in the membrane of human monocytes*. *J Immunol*, 1988. **141**(10): p. 3537-43.
242. Becker, E.L., M. Sigman, and J.M. Oliver, *Superoxide production induced in rabbit polymorphonuclear leukocytes by synthetic chemotactic peptides and A23187*. *Am J Pathol*, 1979. **95**(1): p. 81-97.
243. Iio, M., et al., *Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1986. **32**(6): p. 635-42.
244. Heinle, H. and J. el Dessouki, *Luminol-enhanced chemiluminescence after reaction of hydroperoxides with opsonized zymosan*. *J Biolumin Chemilumin*, 1995. **10**(2): p. 71-6.
245. Radi, R., et al., *Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates*. *Free Radic Biol Med*, 1990. **8**(2): p. 121-6.
246. Votyakova, T.V. and I.J. Reynolds, *Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation*. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **431**(1): p. 138-44.
247. Radi, R., et al., *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **30**(5): p. 463-88.

248. Cross, A.R. and O.T. Jones, *The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase.* Biochem J, 1986. **237**(1): p. 111-6.
249. Doussiere, J. and P.V. Vignais, *Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation.* Eur J Biochem, 1992. **208**(1): p. 61-71.
250. Twentyman, P.R. and M. Luscombe, *A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity.* Br J Cancer, 1987. **56**(3): p. 279-85.
251. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.* J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
252. Kaur, I., et al., *Changes in neutrophil functions in astronauts.* Brain Behav Immun, 2004. **18**(5): p. 443-50.
253. Shimizu, K., et al., *Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells.* Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 2105-18.
254. Hoffmann, E.K., L. Rasmussen, and E. Zeuthen, *Cytochalasin B: aspects of phagocytosis in nutrient uptake in Tetrahymena.* J Cell Sci, 1974. **15**(2): p. 403-6.
255. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages.* Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14 1.
256. Birnie, G.D., *Subcellular components: preparation and fractionation.* 2nd ed. 1972, London, Baltimore,: Butterworth; University Park Press. 12 , 320 p.
257. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
258. Li, J.M. and A.M. Shah, *Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19952-60.
259. Lundstrom, J. and A. Holmgren, *Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity.* J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9114-20.
260. Mares, R.E., S.G. Melendez-Lopez, and M.A. Ramos, *Acid-denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as model substrate to study the chaperone activity of protein disulfide isomerase.* Int J Mol Sci, 2011. **12**(7): p. 4625-36.
261. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups.* Arch Biochem Biophys, 1959. **82**(1): p. 70-7.
262. Burgoyne, J.R., O. Oviosu, and P. Eaton, *The PEG-switch assay: a fast semi-quantitative method to determine protein reversible cysteine oxidation.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2013. **68**(3): p. 297-301.
263. Schoneich, C. and V.S. Sharov, *Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species.* Free Radic Biol Med, 2006. **41**(10): p. 1507-20.
264. Hagan, I.M., *Staining Fission Yeast Filamentous Actin with Fluorescent Phalloidin Conjugates.* Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(6): p. pdb prot091033.

265. Cannon, G.J. and J.A. Swanson, *The macrophage capacity for phagocytosis*. J Cell Sci, 1992. **101 ( Pt 4)**: p. 907-13.
266. Ambruso, D.R., N. Cusack, and G. Thurman, *NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation*. Mol Genet Metab, 2004. **81(4)**: p. 313-21.
267. Ueyama, T., et al., *Cooperation of p40(phox) with p47(phox) for Nox2-based NADPH oxidase activation during Fcγ receptor (FcγR)-mediated phagocytosis: mechanism for acquisition of p40(phox) phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) binding*. J Biol Chem, 2011. **286(47)**: p. 40693-705.
268. Ueyama, T., et al., *A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox*. Mol Biol Cell, 2007. **18(2)**: p. 441-54.
269. Chen, Q., et al., *Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils*. J Immunol, 2003. **170(10)**: p. 5302-8.
270. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2009. **102(2)**: p. 248-57.
271. Schopfer, F.J., et al., *Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives*. Free Radic Biol Med, 2009. **46(9)**: p. 1250-9.
272. Pescatore, L.A., et al., *Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation*. J Biol Chem, 2012. **287(35)**: p. 29290-300.
273. Ischiropoulos, H. and A.B. al-Mehdi, *Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications*. FEBS Lett, 1995. **364(3)**: p. 279-82.
274. Watanabe, M.M., F.R. Laurindo, and D.C. Fernandes, *Methods of measuring protein disulfide isomerase activity: a critical overview*. Front Chem, 2014. **2**: p. 73.
275. Baker, L.M., et al., *Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction*. J Biol Chem, 2007. **282(42)**: p. 31085-93.
276. Zhou, J., et al., *The C-terminal CGHC motif of protein disulfide isomerase supports thrombosis*. J Clin Invest, 2015. **125(12)**: p. 4391-406.
277. Nakamura, T. and S.A. Lipton, *Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64(13)**: p. 1609-20.
278. Tian, G., et al., *The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites*. Cell, 2006. **124(1)**: p. 61-73.
279. Hoffstrom, B.G., et al., *Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins*. Nat Chem Biol, 2010. **6(12)**: p. 900-6.
280. Xu, S., S. Sankar, and N. Neamati, *Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy*. Drug Discov Today, 2014. **19(3)**: p. 222-40.
281. Lehto, V.P., et al., *Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages*. Lab Invest, 1982. **47(4)**: p. 391-9.

282. Estes, J.E., L.A. Selden, and L.C. Gershman, *Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin*. *Biochemistry*, 1981. **20**(4): p. 708-12.
283. Wulf, E., et al., *Fluorescent phalloidin, a tool for the visualization of cellular actin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4498-502.
284. Linder, S. and M. Aepfelbacher, *Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(7): p. 376-85.
285. Linder, S., et al., *Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages*. *J Cell Sci*, 2000. **113 Pt 23**: p. 4165-76.
286. Van Goethem, E., et al., *Macrophage podosomes go 3D*. *Eur J Cell Biol*, 2011. **90**(2-3): p. 224-36.
287. Krogsgaard-Larsen, P., et al., *Dihydromuscimol, thiomuscimol and related heterocyclic compounds as GABA analogues*. *J Neurochem*, 1979. **32**(6): p. 1717-24.
288. Flaumenhaft, R., B. Furie, and J.I. Zwicker, *Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(1): p. 16-23.
289. Gonzalez-Perilli, L., et al., *Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages*. *Free Radic Biol Med*, 2013. **58**: p. 126-33.



## 10 PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES

### Artículos publicados en revistas arbitradas

“Nitroarachidonic acid (NO<sub>2</sub>-AA) inhibits Protein Disulfide Isomerase (PDI) through reversible covalent adduct formation with critical cysteines”. González-Perilli L, *Mastrogiovanni M, Fernandes DC, Rubbo H, Laurindo FR, Trostchansky A*. *Biochemical Journal* 2016 (en revisión).

“The Nitroxide 4-Hydroxy-2,2',6,6'-tetramethylpiperidine 1-oxyl (Tempol) Inhibits Reductase Activity of Protein Disulfide Isomerase via Covalent Binding to the Cys400 Residue”. *Santos GB, González-Perilli L, Mastrogiovanni M, Cerdeira CD, Trostchansky A, Brigagão MR*. *Free Radic Biol Med*. 2016 (en revisión).

“Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages”. González-Perilli L, *Álvarez MN, Prolo C, Radi R, Rubbo H, Trostchansky A*. *Free Radic Biol Med*. 2013 May;58:126-33.

“Nitro-fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential”; *Trostchansky A, Bonilla L, González-Perilli L, Rubbo H*. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Oct 10;19(11):1257-65.

### Capítulos de libro

“Nitro-arachidonic acid downstream signaling actions and therapeutics”; *Rubbo H, González-Perilli L, Mastrogiovanni M, Sánchez-Calvo B, Trostchansky A*. Capítulo en "Biochemistry of Oxidative Stress" publicado por Springer New York (en prensa).

### Presentaciones en congresos

**2015** “Phagocytic NADPH oxidase inhibition by Nitroarachidonic acid in activated macrophages: covalent adduct formation with Protein Disulfide Isomerase”. González-Perilli L, *Mastrogiovanni M, Rubbo H, Laurindo F, Trostchansky A*. Poster en el “23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)” y “44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)” (Foz do Iguaçu, Brasil, Agosto 2015).

- 2014** “Rol de la Proteín Disulfuro Isomerasa (PDI) en la inhibición por el Ácido Nitroaraquidónico (NO<sub>2</sub>AA) de la NADPH oxidasa fagocítica en macrófagos activados”. González-Perilli L, *Rubbo H, Laurindo F, Trostchansky A*. Poster en las “IX<sup>th</sup> Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB)”, (Piriápolis, Setiembre 2014).
- 2014** “Protein Disulfide Isomerase (PDI) participates in Nitroarachidonate (NO<sub>2</sub>-AA) mediated- NOX2 inhibition in activated macrophages”. González-Perilli L, *Rubbo H, Laurindo F, Trostchansky A*. Poster en las “Gordon Conference: NOX Family NADPH Oxidases” y presentación oral en el “Gordon Research Seminar: NOX Family NADPH Oxidases” previo al congreso (Lucca, Italia, Mayo 2014).
- 2013** “Efecto del ácido Nitroaraquidónico (NO<sub>2</sub>AA) sobre la Proteín disulfuro isomerasa (PDI) en macrófagos activados”. González LI; *Laurindo F; Rubbo H y Trostchansky A*. Póster en las “8as Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM), (Montevideo, Setiembre 2013).
- 2012** “Posibles mecanismos de regulación negativa de la NADPH oxidasa por Ácido Nitroaraquidónico durante la activación macrofágica”. González LI; *Laurindo F; Rubbo H y Trostchansky A*. Poster en las “XIII<sup>th</sup> Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB)”, (Piriápolis, Mayo 2010).
- 2011** “Modulation of phagocytic cells activation by Nitroarachidonic acid”. González LI; *Álvarez MN; V.B. O`Donnell; Rubbo H and Trostchansky A*. Presentación oral en las “7as Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (Montevideo, Noviembre 2011). Primer premio a Presentación en Simposio de las Jornadas.
- 2011** “Modulation of phagocytic cells activation by Nitroarachidonic acid”. González LI; *Álvarez MN; V.B. O`Donnell; Rubbo H and Trostchansky A*. Poster en “VII Meeting of the SFRBM-South American Group 2011” (Sao Paulo, Brasil, Agosto 2011).
- 2010** “Posibles mecanismos de regulación negativa de la NADPH oxidasa por Ácido Nitroaraquidónico durante la activación macrofágica”. González LI; *Álvarez MN; Rubbo H y Trostchansky A*. Poster en las “XIII<sup>th</sup> Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB)”, (Piriápolis, Mayo 2010).
- 2009** “Regulación de la NADPH oxidasa en macrófagos activados por el ácido nitroaraquidónico”. González LI; *Álvarez MN; Rubbo H y Trostchansky A*. Presentación oral en las “6as Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM), (Montevideo, Noviembre 2009).
- 2009** “Down-regulation of NADPH oxidase in activated macrophages by nitroarachidonic acid”. González LI; *Álvarez MN; Rubbo H y Trostchansky A*. Poster en “Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009, VI Meeting of SFRBM South American Group”, (Santiago de Chile, Chile 2009).