



FACULTAD DE QUÍMICA-UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PEDECIBA QUÍMICA  
TESIS DE DOCTORADO

# I+D de análogos del $\alpha$ -tocoferol diseñados como potenciales fármacos para la prevención de la aterosclerosis

Lic. Jorge Rodríguez-Duarte

Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo  
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelAR





AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN



FACULTAD DE  
QUÍMICA



PEDECIBA



COMISIÓN SECTORIAL DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA



Institut Pasteur  
de Montevideo

FACULTAD DE QUÍMICA-UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PEDECIBA-QUÍMICA  
TESIS DE DOCTORADO

## I+D de análogos del $\alpha$ -tocoferol diseñados como potenciales fármacos para la prevención de la aterosclerosis

***Estudiante:*** Jorge Rodríguez Duarte

***Orientadores:*** Virginia López, Q.F., Ph.D.; Carlos Batthyány, M.D., Ph.D.

### ***Laboratorios***

- ***Laboratorio de Biología Vasculare y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo***
- ***Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR***

### ***Tribunal***

- ***Prof. Dr. Pietro Fagiolino; Departamento de Ciencias Farmacéuticas (CIENFAR), Facultad de Química, UdelaR.***
- ***Prof. Dr. Rafael Radi; Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, UdelaR.***
- ***Prof. Agdo. Dr. Marcelo Hill; Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, UdelaR; Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación, Institut Pasteur de Montevideo.***

## ÍNDICE

<b>I) Introducción</b>	5
1.1) Enfermedades crónicas no transmisibles	6
1.2) Aterosclerosis: características generales	6
1.2.1) Factores de riesgo para el desarrollo de Aterosclerosis	9
1.3) Patogenia de la Aterosclerosis: una enfermedad inflamatoria crónica	18
1.3.1) Función endotelial, óxido nítrico y aterogénesis	22
1.3.2) Acumulación de lipoproteínas en el espacio subendotelial	25
1.3.3) Reclutamiento de células inmunes a los focos de lesión	27
1.3.4) Formación de células espumosas: un evento patogénico característico	27
1.3.5) Ruptura de placa, erosión, aterotrombosis y complicaciones agudas de la aterosclerosis como eventos desencadenantes del Infarto Agudo de Miocardio	29
1.4) Ácidos grasos insaturados y nitrados: nitroalquenos endógenos y su posible rol en las enfermedades inflamatorias crónicas	29
1.4.1) Formación de los nitroalquenos endógenos	30
1.4.2) Mecanismo de acción de los nitroalquenos	32
1.4.2a) Inhibición de la vía NF- $\kappa$ B	32
1.4.2b) Activación de la vía de Nrf2	34
1.4.2c) Agonistas de receptores PPAR	36
1.4.2d) Activación de la respuesta dependiente del "Heat Shock Response Element"	37
1.4.2e) Otros blancos subcelulares de los nitroalquenos	38
1.4.3) Principales efectos farmacológicos de los de los ácidos grasos nitrados en modelos animales de patología humana	39
1.4.3a) Metabolismo y "Clearance"	39
1.5) Nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas	40
<b>II) Hipótesis</b>	43
<b>III) Objetivo general</b>	45
3.1) Objetivos específicos para la serie 1	46
3.2) Objetivos específicos para la serie 2	46
<b>IV) Resultados</b>	47
<b>4.1) Resultados serie 1</b>	48
4.1.1) Síntesis de análogos de $\alpha$ -tocoferol-nitroalqueno: NATOH y NATxME	49
4.1.2) Caracterización fisicoquímica de los nitroalquenos análogos del tocoferol	53
4.1.2a) Análisis por espectrofotometría UV-Visible de los nitroalquenos análogos del tocoferol	53
4.1.2b) Reactividad electrofílica de los nitroalquenos análogos del tocoferol	54
4.1.2c) Cinética de la reacción entre los nitroalquenos análogos del tocoferol y tioles de bajo peso molecular	57
4.1.2d) Determinación del pKa de los nitroalquenos análogos del tocoferol	59
4.1.2e) Análisis de las propiedades antioxidantes del NATOH	62
4.1.2f) Incorporación del NATOH a lipoproteínas	63
4.1.3) Estudio de las propiedades biológicas <i>in vitro</i> y posibles blancos moleculares modulados por los nitroalquenos análogos del tocoferol	65
4.1.3a) Citotoxicidad de los nitroalquenos análogos del tocoferol	65
4.1.3b) Efectos biológicos de los nitroalquenos análogos del tocoferol	66
4.1.3.b1) Inhibición de NF- $\kappa$ B	66
4.1.3.b2) Inhibición del inflammasoma NLRP3 por el NATxME	70
4.1.3.b3) Inducción del sistema Nrf2-Keap-1 por los nitroalquenos análogos del tocoferol	71

4.1.4) Estudio de los efectos <i>in vivo</i> de los nitroalquenos análogos del tocoferol	74
4.1.4a) Detección de NATOH en el plasma y en la fracción de lipoproteínas VLDL/LDL de ratones ApoE knockout	74
4.1.4b) El NATOH se detecta en las aortas ateroscleróticas de ratones ApoE Knockout alimentados con dieta rica en grasas	77
4.1.4c) El NATOH reduce la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, de moléculas de adhesión y la aterosclerosis en ratones ApoE Knockout alimentados con dieta rica en grasa	78
4.1.4d) Efectos del NATOH en un modelo de hipertensión arterial inducida por Angiotensina II	80
4.1.4e) Efectos <i>in vivo</i> del NATxME: NATxME inhibe el reclutamiento de neutrófilos en un modelo <i>in vivo</i> inflamatorio en el pez cebra	81
<b>4.2) Resultados serie 2</b>	83
4.2.1) Antecedentes	85
4.2.2) Liberación de •NO de nitratos orgánicos análogos de tocoferol	85
4.2.3) Actividad vasoactiva de nitratos orgánicos análogos de tocoferol en anillos de aorta	86
4.2.4) Estudios de citotoxicidad en macrófagos y fibroblastos	88
4.2.5) Estudios de mutagenicidad de los compuestos de la serie 2	88
4.2.6) Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> . Test de toxicidad oral aguda y test de Micronúcleos	89
4.2.7) Caracterización fisicoquímica	91
4.2.7a) Desarrollo de técnicas analíticas para la determinación de análogos de $\alpha$ -tocoferol liberadores de óxido nítrico	91
4.2.7b) Estudios de estabilidad en plasma y en soluciones a diferentes pH del NAO14	95
4.2.7c) Estudio de la incorporación <i>in vitro</i> de los compuestos a lipoproteínas humanas	96
4.2.8) Análisis <i>in vivo</i> del efecto NAO14 sobre la presión arterial en ratones C57BL/6	97
<b>V) Discusión</b>	99
<b>VI) Conclusiones</b>	110
<b>VII) Perspectivas</b>	112
<b>VIII) Materiales y métodos</b>	114
<b>8.1) Serie 1</b>	115
8.1.1) Síntesis	115
8.1.2) Caracterización fisicoquímica de los nitroalquenos análogos de tocoferol	118
8.1.3) Estudio de las propiedades biológicas y posibles blancos moleculares modulados por los compuestos híbridos	122
8.1.4) Estudio de los efectos <i>in vivo</i> de los nitroalquenos análogos del $\alpha$ -tocoferol	126
<b>8.2) Serie 2</b>	133
8.2.1) Caracterización fisicoquímica de los derivados del $\alpha$ -tocoferol-liberadores de óxido nítrico	133
8.2.2) Estudios <i>in vivo</i> de NAO14	134
<b>IX) Referencias</b>	136
<b>X) Anexos</b>	151
<b>XI) Anexo I: Manuscrito Nro 1</b>	152
<b>XII) Anexo II: Manuscrito Nro 2</b>	164

# I) INTRODUCCIÓN

## **I) INTRODUCCIÓN**

### **1.1) ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES.**

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) matan a 40 millones de personas cada año, lo que equivale al 70% de las muertes que se producen en el mundo, superando a las enfermedades infecciosas y por accidentes como principales causas de mortalidad mundial [1]. Las ECNT afectan a todos los grupos de edad y a todas las regiones y países. En Uruguay, constituyen la principal causa de morbi-mortalidad, produciendo más del 60% de los fallecimientos entre los 30 y 69 años [1].

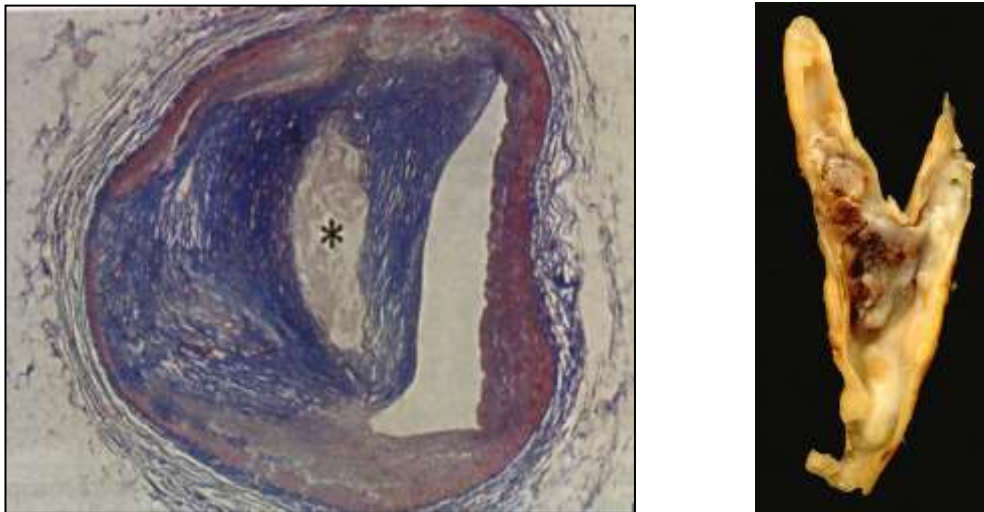
Los principales tipos de ECNT son las enfermedades cardiovasculares (incluyendo infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares), la diabetes, el cáncer y las enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma). Las ECNT tienden a ser de larga duración y resultan de la combinación de factores de riesgo del tipo etarios, genéticos, fisiológicos y/o metabólicos, ambientales y conductuales. Dentro de estos encontramos factores de riesgo modificables, destacándose el tabaquismo, el sedentarismo, malos hábitos higiénico-dietéticos y el alcoholismo. Por otro lado, existen factores de riesgo fisiológicos y/o metabólicos que aumentan el riesgo de las ECNT como son el aumento de la presión arterial (HTA), el sobrepeso y la obesidad, la hiperglicemia (concentraciones elevadas de glucosa en la sangre) y la hiperlipidemia (concentraciones elevadas de colesterol y/o triglicéridos en la sangre) [2].

### **1.2) ATEROSCLEROSIS: Características generales.**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son, a nivel mundial, responsables de casi un tercio del total de las muertes, con aproximadamente 17 millones al año [2]. La aterosclerosis es la patología que subyace a la mayoría de las ECV importantes, incluyendo la enfermedad arterial coronaria (EAC), los accidente cerebrovascular (ACV) y la enfermedad arterial periférica (EAP) [3]. Estas patologías son en su conjunto las responsables de la mayor parte de la morbi-mortalidad cardiovascular en el mundo occidental de hoy. Los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia de la aterosclerosis está aumentando en todo el mundo, debido a la adopción del

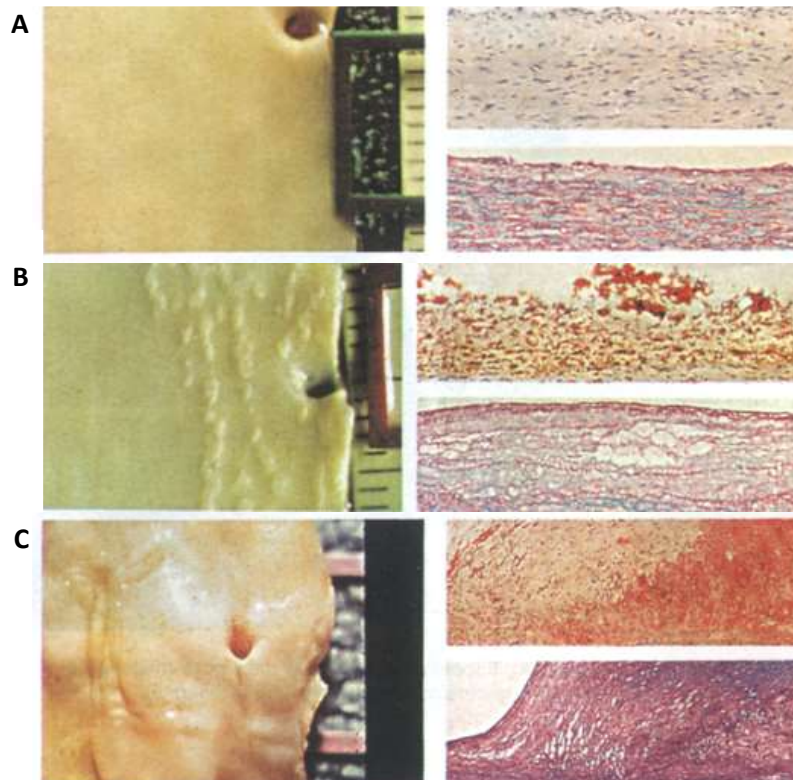
estilo de vida occidental no saludable y, hoy en día, es una patología de proporciones epidémicas [4, 5].

La aterosclerosis está definida como una respuesta focal, fibro-proliferativa e inflamatoria generada en respuesta a múltiples injurias a nivel del endotelio vascular [6]. Se caracteriza por la formación de placas de ateroma (placas fibro-adiposas) que se sitúan en la íntima arterial y que están formadas por células y detritos celulares (células musculares lisas, endoteliales, espumosas, leucocitos, linfocitos, etc.), un núcleo lipídico central (formado fundamentalmente por colesterol, sus ésteres y productos de oxidación) y una cubierta fibrosa [7] (figura 1). De hecho, el término aterosclerosis proviene de las palabras griegas *ἀθήρο*- athéro- ('pasta') y *σκληρός* sklerós ('duro') y fue originalmente propuesto por Albrecht Von Haller en 1755 [8].



**Figura 1. A) Corte transversal de arteria coronaria aterosclerótica. B) Placa aterosclerótica de una pieza de endarterectomía carotídea.** Tomadas de: Erling, F., K.S. Prediman, and V. Fuster, *Patogénesis de la ruptura de la placa*, in *Aterosclerosis y Enfermedad Arterial Coronaria*, V. Fuster, R. Ross, and E.J. Topol, Editors. 1997, Springer-Verlag Ibérica. p. 539-556.

El desarrollo y progresión de una placa de ateroma es un proceso complejo, que empieza en edades tempranas de la vida, pero que puede ser detenido o retardado en su progresión e incluso retroceder [9]. La lesión visible más temprana en el desarrollo de la aterosclerosis es la estría grasa. Esta comprende un área de engrosamiento de la íntima arterial compuesta de macrófagos cargados de lípidos (conocidas como células espumosas), linfocitos, y células musculares lisas.



**Figura 2. Macroscopía e histología del desarrollo de lesiones ateroscleróticas**

- A. Diapositiva macroscópica de un primer plano de una arteria torácica que no muestra lesiones macroscópicas aparentes y cuya superficie intimal es perfectamente lisa. La tinción con "oil red O" (ORO) para grasas no revela presencia de lípidos microscópicamente discernibles. La tinción con tricrómico de Gomori con aldehído fucsina (GTAF) tampoco evidencia lesiones significativas, a lo sumo un engrosamiento fibroso difuso intimal.
- B. Estrías – placas grasas localizadas y evidentes macroscópicamente. La tinción ORO para grasas muestra múltiples células espumosas y engrosamiento intimal. La tinción con GTAF muestra muchas células espumosas (espacios redondos abiertos y grandes por disolución de los lípidos durante el procesamiento) en un área de confluencia hacia el centro de la lesión. Asimismo, aumento de las fibras de elastina (púrpura) y del colágeno (azul – verde claro).
- C. Macrofotografía que muestra una típica placa fibroadiposa. Microscópicamente el área se tiñe intensamente con ORO. La tinción con GTAF muestra área rica en colágeno y espacios en blanco por disolución de células espumosas. Imágenes tomadas de: Wissler, R.W., L. Hiltcher, and T. Oinuma, *Lesiones de aterosclerosis en el joven*, in *Aterosclerosis y Enfermedad Arterial Coronaria*, V. Fuster, R. Ross, and E.J. Topol, Editors. 1997, Springer-Verlag Ibérica. p. 523-538.

A grandes rasgos, las placas se desarrollan como resultado de la acumulación masiva, no regulada de formas modificadas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial, por macrófagos y células musculares lisas que infiltran dicho espacio; llevando a la formación de células espumosas seguido de una mayor diapédesis de leucocitos [10]. Además, en este proceso se destaca la proliferación de células del músculo liso y producción de tejido conectivo. La trombosis es la etapa final en el proceso de la enfermedad y surge como consecuencia de la



ruptura de la placa y del endotelio vascular y consecuente exposición del contenido subendotelial, protrombótico, a la sangre circulante. La formación en un momento determinado de un trombo intravascular es responsable de los eventos adversos clínicamente observables en las arterias coronarias, cerebrovascular y periféricas, que determinan en muchos casos los infartos de los tejidos subyacentes [11].

### **1.2.1) Factores de riesgo para el desarrollo de Aterosclerosis.**

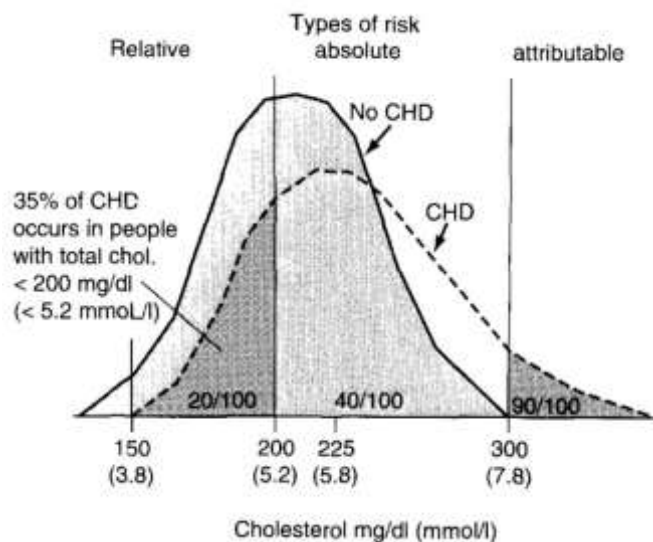
Ciertos rasgos, condiciones o hábitos pueden aumentar el riesgo de contraer esta enfermedad. Estas condiciones se conocen como factores de riesgo. En 1948 y con el objetivo de identificar los factores o características comunes que contribuyen al desarrollo de las ECV, en los EEUU se comenzó con el estudio prospectivo “Framingham Heart Study” [12, 13]. En este estudio se realizó un seguimiento durante un largo periodo de tiempo a tres generaciones de familias, que englobaban, inicialmente alrededor de 5000 personas que aún no habían desarrollado síntomas evidentes de ECV y que no hubiesen sufrido de un infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. De este estudio se concluyó que los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares eran la dislipemia (principalmente la hipercolesterolemia con aumento de LDL y disminución de HDL; y en menor grado la hipertrigliceridemia), la diabetes mellitus (DM), la hipertensión arterial (HTA) y el tabaquismo. De este estudio, no surgieron como factores de riesgo independiente ni la obesidad (poco frecuente en esa época) ni el alto consumo de azúcar refinada, como comentaremos luego.

### **Hipercolesterolemia, lipoproteínas y metabolismo del $\alpha$ -tocoferol en la aterogénesis.**

El colesterol es una molécula presente en todas las células del cuerpo humano, que es necesaria para el normal funcionamiento del organismo y que puede ser sintetizada por cualquier célula nucleada del mismo, pero no degradado [14]. Por ejemplo, es indispensable para la fabricación de hormonas sexuales y esteroideas, para formación de los ácidos biliares (necesarios para la digestión de las grasas), vitamina D, entre otras biomoléculas de gran relevancia [14]. La mayor parte del colesterol se produce en el hígado pero también una parte proviene de la dieta. Sin embargo, hoy en día sabemos que el manejo de una hipercolesterolemia (niveles de

colesterol total en sangre en el adulto superiores a 200 mg/dL) a partir de modificaciones en la dieta es altamente insatisfactorio. La hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular, con un claro papel causal en el inicio y progresión de la aterosclerosis. La aterosclerosis y la ECV tienen una relación directa con los niveles de colesterol sanguíneo: concentraciones séricas elevadas de colesterol total (CT), LDL-colesterol (LDL-c) y concentraciones séricas bajas de HDL-colesterol (HDL-c) se correlacionan con el aumento de estas lesiones ateroscleróticas [15-21].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 60 % de las enfermedades coronarias y el 40 % de los accidentes cerebrovasculares isquémicos en países desarrollados, son debido a niveles elevados de colesterol en sangre, por encima del nivel mínimo teórico (3.8 mmol/L) [22]. Sin embargo, el 50% de los infartos agudos de miocardio ocurren en sujetos con cifras relativamente normales de colesterol total, evidenciando que individuos con un mismo valor de colesterol y LDL pueden estar expuestos a niveles muy diferentes de riesgo de desarrollar la enfermedad [7, 23, 24] (figura 3).

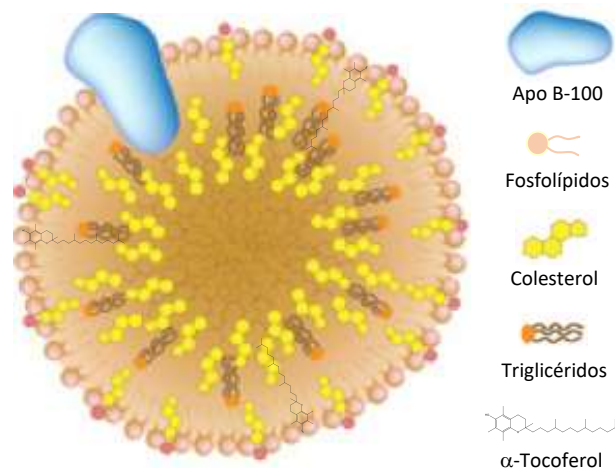


**Figura 3. Incidencia del Infarto de miocardio en relación con los niveles de colesterol total en el estudio Framingham, 26 años de seguimiento (tomada de: Castelli W. P, *Atherosclerosis* 1996, 124, S1-S9.)**

Más aún, de estos estudios también se desprende que el colesterol es un elemento imprescindible, pero que no es el único determinante del desarrollo de la enfermedad.

Las lipoproteínas son grandes complejos macromoleculares que transportan lípidos hidrofóbicos (principalmente colesterol, sus ésteres y triglicéridos) a través de la sangre. Consisten de un núcleo hidrofóbico lipídico central (compuesto por triglicéridos y ésteres de colesterol) rodeado por una capa de lípidos hidrofílicos (fosfolípidos y colesterol sin esterificar) y proteínas [25]. Las lipoproteínas plasmáticas están clasificadas en 5 clases dependiendo de su densidad relativa: quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y HDL (lipoproteínas de alta densidad). La densidad de las lipoproteínas está determinada por la relación lípido/proteína de cada partícula. Las proteínas asociadas a lipoproteínas, apolipoproteínas, son requeridas para el ensamblado, estructura y función de las lipoproteínas ya que activan enzimas, median la transferencia de lípidos y actúan como ligando para los receptores de superficie celular [25, 26]

Las partículas de LDL son las principales transportadoras de colesterol y vitamina E en el organismo [27, 28]. Cada partícula contiene ésteres de colesterol (1600 moléculas) y triglicéridos (170 moléculas) formando un núcleo lipofílico central, separado del entorno acuoso por una monocapa de fosfolípidos (700 moléculas, principalmente fosfatidilcolina), moléculas de colesterol libre (600 moléculas) y su único componente proteico, la apolipoproteína B-100 (apoB-100) [25, 26] (figura 4).

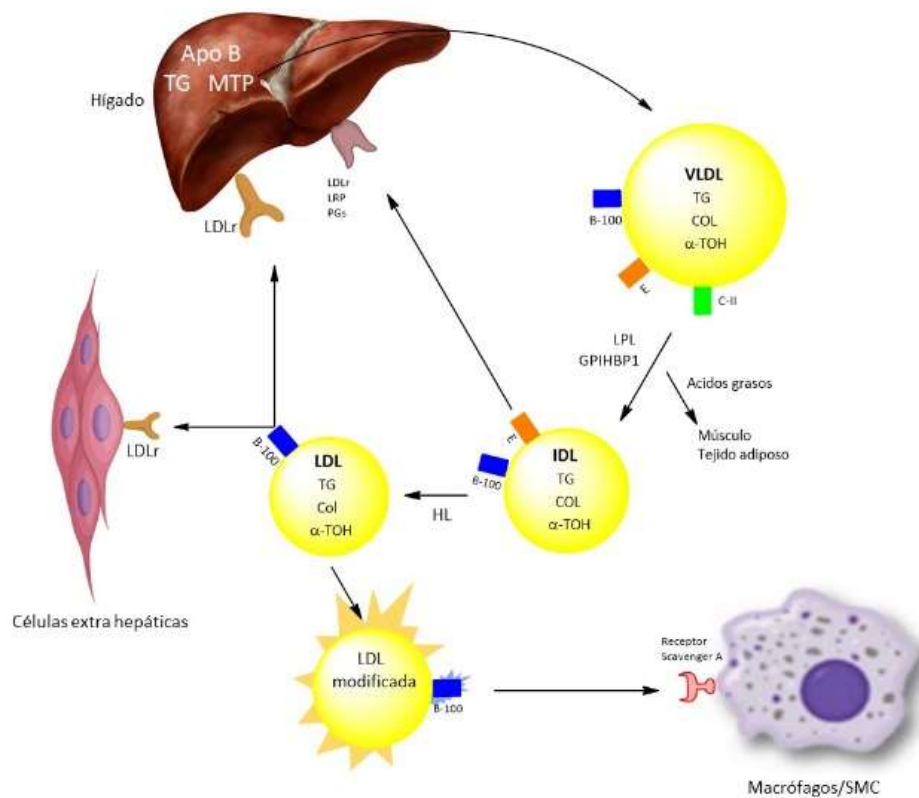


**Figura 4. Estructura de la lipoproteína de baja densidad (LDL)** (adaptado de <https://www.alamy.com/stock-photo-lipoproteins-of-the-blood-ldl-and-hdl-structure-50925232.html>).

Del total de moléculas de ácido graso presentes en los distintos lípidos de la LDL, aproximadamente el 50% son ácidos grasos insaturados y por tanto susceptibles a la oxidación

[26]. La LDL posee diversos antioxidantes como componentes naturales, destacándose el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH, principal isoforma de la vitamina E) por su concentración (~11.6 nmol/mg proteína; 6 moléculas por partícula). La vitamina E pertenece a la familia de compuestos isoprenoides y en estado natural está compuesta por ocho isómeros diferentes: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos ellos poseen un anillo cromanol y una cadena isoprenoide. Si dicha cadena es saturada, los isómeros se denominan tocoferoles, y si es insaturada, se denominan tocotrienoles (figura 6).

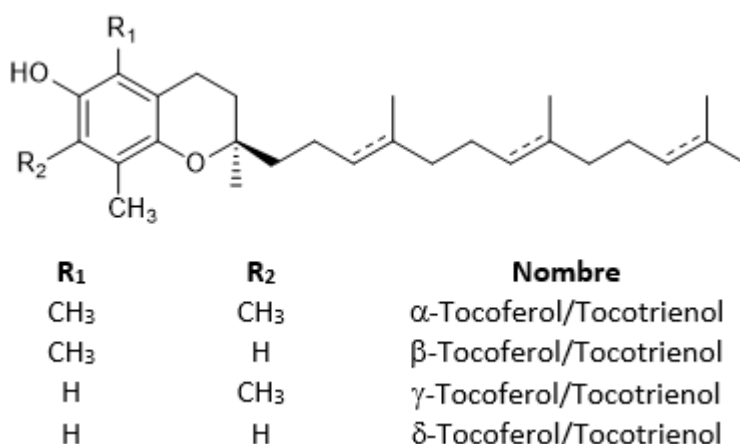
El  $\alpha$ -TOH se absorbe de manera preferencial a nivel intestinal y es incorporado a las lipoproteínas por la acción específica de diferentes enzimas para finalmente ser selectivamente cargado en la futura LDL, debido a la presencia del cromanol y a la acción de la proteína transferidora de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP) a nivel hepático [29].



**Figura 5. Metabolismo LDL.** La LDL deriva de la lipólisis de TG de la VLDL, la cual es secretada por el hígado. La tasa de producción de VLDL así como la lipólisis de los sus TGs influyen los niveles plasmáticos de colesterol LDL (LDL-c). Sin embargo, el determinante más importante de la [LDL-c] en plasma es la tasa de catabolismo de LDL en el hígado y por las células nucleadas de la periferia. Esto está primariamente influenciado por la abundancia y actividad de los receptores de LDL (LDLr) en los hepatocitos y en el resto de las células. El LDLr está regulado por el contenido intracelular de colesterol tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. Altos niveles de LDL-c son generalmente resultado de una expresión reducida del LDLr debido a factores genéticos, ambientales o ambos.

De esta manera, el metabolismo del  $\alpha$ -TOH está íntimamente relacionado al de las lipoproteínas en general y al de las LDL en particular, ya que son éstas las encargadas de aportarles esta vitamina a todas las células nucleadas del organismo (figura 5).

Los demás antioxidantes de la LDL ( $\gamma$ -tocoferol, carotenoides y ubiquinol-10) están presentes en menor cantidad, no habiendo antioxidantes en concentraciones significativas a nivel del núcleo hidrofóbico de la partícula [26].



**Figura 6: Componentes naturales de la Vitamina E.** Los tocoferoles tienen la cola fitilo saturada, mientras que los tocotrienoles presentan insaturaciones.

**Tabaquismo:** El tabaquismo es otro de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y es la principal causa de enfermedad y muerte evitable en la mayoría de los países. De acuerdo a la OMS se estima que en el mundo mueren 5.4 millones de personas prematuramente al año debido al uso de tabaco [30] y si se mantiene la tendencia de los últimos años subirá a 10 millones para el año 2025 [31, 32]. Aparte de la mortalidad cardiovascular el hábito de fumar se asocia a enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cáncer, especialmente pulmonar. En un estudio de 50 años de duración en Europa donde el objetivo era determinar el riesgo a largo plazo del tabaquismo, se demostró que la mortalidad por enfermedades coronarias es 60% más alta en fumadores (80% en fumadores crónicos) comparado con no fumadores. Y además que el 50% de los fumadores termina eventualmente sufriendo un infarto agudo de miocardio (IAM) y a edades más tempranas [33].

**Diabetes mellitus:** La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que ocurre cuando el cuerpo no puede producir suficiente o no utiliza eficazmente la insulina, y se induce por una predisposición genética junto con factores ambientales [34].

Trescientos sesenta y seis millones de personas tenían DM en 2011; la mitad de estos (183 millones de personas) no han sido diagnosticados [35]. El número de personas con DM en todo el mundo está aumentando y para 2030, esto habrá aumentado a 552 millones [35]. Hay dos tipos principales de diabetes: diabetes tipo 1 (DM1) y diabetes tipo 2 (DM2). En la diabetes tipo 2, el organismo o bien resiste los efectos de la insulina o no produce suficiente insulina para mantener un nivel normal de glucosa. La hiperglicemia es un factor de riesgo importante que acelera la tasa de desarrollo de las múltiples complicaciones cardiovasculares de la diabetes.

La DM es un factor de riesgo bien establecido para las enfermedades cardiovasculares. Personas con DM2 tienen una mayor morbi-mortalidad cardiovascular, y se ven afectados desproporcionadamente por enfermedades cardiovasculares en comparación con sujetos no diabéticos [36]. La enfermedad diabético vascular es responsable del aumento de dos a cuatro veces en la ocurrencia de enfermedad arterial coronaria (EAC) y accidente cerebrovascular, y de dos a ocho veces más en el riesgo de insuficiencia cardíaca [37]. Se ha descrito que los pacientes con DM2 y sin antecedentes de EAC tienen el mismo riesgo de eventos cardíacos que sujetos con un infarto de miocardio previo [38]. La DM2 incrementa de manera sustancial el riesgo de las enfermedades coronarias. Hombres con DM2 tienen de dos a cuatro veces mayor riesgo anual de enfermedades coronarias. En mujeres con DM2 el riesgo de enfermedades coronarias es inclusive mayor (de tres a cinco veces). La DM2 no solo incrementa el riesgo de las enfermedades coronarias, sino que también aumenta el efecto de otros factores de riesgo sobre las enfermedades coronarias y a su vez también favorecen el desarrollo de aterosclerosis en otros lechos vasculares como ser la arteria renal y las cerebrales [39].

**Hipertensión arterial:** La hipertensión arterial (HTA) es una afección en la cual la presión en los vasos sanguíneos es continuamente alta y es otro de los factores de riesgo principales para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La HTA afecta ya a mil millones de personas en el mundo, y puede provocar infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares isquémicos,

debido al desarrollo de aterosclerosis en dichos lechos vasculares; y/o hemorrágicos [40]. La hipertensión, además, incrementa la probabilidad de desarrollo de enfermedad renal, demencia e insuficiencia cardíaca congestiva. Los investigadores calculan que la hipertensión es la causa por la que mueren anualmente nueve millones de personas [40]. Se define como hipertensión arterial a la elevación persistente y sostenida de las cifras de tensión arterial por encima de valores de 130 mm Hg para la tensión arterial sistólica (TAS) y de 80 mm Hg para la tensión arterial diastólica (TAD) [41]. El estudio INTERHEART estimó que el 22% de los ataques de corazón en Europa occidental están asociados con historias de alta presión sanguínea y que aquellos con historia de hipertensión tienen el doble de riesgo de sufrir un ataque cardíaco comparado con personas sin historia de hipertensión [42].

**Obesidad:** En los últimos 40 años, la incidencia del sobrepeso y de la obesidad aumentó de manera dramática, ahora excediendo al número de personas desnutridas y convirtiéndose en la epidemia del siglo XXI [43]. En una segunda revisión del estudio Framingham, se ha reconocido a la obesidad como uno de los factores de riesgo independiente más importante de las enfermedades cardiovasculares [44]. Recientemente, se han publicado datos del peso de adultos comparando desde el año 1975 al 2014 y se puede apreciar que desde 1975 la proporción de hombres obesos se ha triplicado y la de mujeres se ha duplicado. Además, a partir de la cuarta década de vida, la población mundial adulta gana aproximadamente 10 kg de peso en promedio por cada década transcurrida. Para el año 2025 se predice que un quinto de la población mundial será obesa [45]. Consecuentemente, el aumento de la obesidad en el mundo, resultó en una explosión de los problemas de salud relacionados a la obesidad, incluyendo la resistencia a la insulina (RI), DM2, enfermedades coronarias, enfermedades del hígado graso, aumento de algunos tipos de cánceres y enfermedades degenerativas [46-48].

La epidemia mundial de obesidad ha llevado a un dramático aumento en las enfermedades metabólicas asociadas con esta condición, que ha centrado una gran atención sobre los mecanismos subyacentes de la obesidad y sus co-morbilidades. La evidencia sugiere que muchas de las co-morbilidades de la obesidad, incluida la DM2, el hígado graso no alcohólico (del inglés NASH) o esteatohepatitis, asma, cáncer, enfermedades cardiovasculares y

enfermedades neurodegenerativas, están relacionadas con la generación de una inflamación crónica, estéril y que cursa a bajo grado [49-51]. El desencadenante último de esta inflamación es incierto, y la relación causal entre inflamación y las complicaciones de la obesidad permanece en cuestión.

La obesidad, se asocia a la sobreproducción de citoquinas y a la activación de señales de inflamación [52]. La liberación de citoquinas proinflamatorias, conocidas como adipocinas, se ha relacionado con el desarrollo a la resistencia de insulina asociada a la diabetes de tipo 2 [52-57]. En este sentido, la activación de las vías del inflammasoma está relacionada con la patogénesis de varias enfermedades prevalentes, incluyendo cáncer, las enfermedades cardiovasculares e inmunometabólicas [58-64]. La ruptura de la homeostasis metabólica en individuos obesos lleva al aumento de la glucosa, ácidos grasos saturados libres, ceramidas, especies reactivas del oxígeno en la circulación y órganos, lo que desencadena, entre otras vías, la activación del inflammasoma NLRP3 y, por tanto, un aumento en la producción de IL-1 $\beta$  que no solo incrementa el proceso inflamatorio, sino que a su vez interfiere con la señalización de la insulina [49, 65-67]. Así, la inflamación crónica asociada con la obesidad contribuye directamente al desarrollo de resistencia a la insulina y, finalmente, a la DM2 [67]. Por tanto, quedan pocas dudas de que la obesidad está estrechamente asociada con el desarrollo de un proceso inflamatorio y que el grado de inflamación se correlaciona bien con la severidad de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 [49-51, 68], *lo que sugiere que entender la respuesta inflamatoria crónica, estéril y que cursa a bajo ruido podría conducir al desarrollo de nuevos enfoques para tratar estas enfermedades devastadoras.*

**Ingesta de Azúcar refinado como factor de riesgo independiente:** Uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y que ha permanecido lamentablemente oculto por más de cinco décadas debido a los intereses comerciales de la industria azucarera, es el consumo de azúcar refinado. Las señales tempranas de advertencia del riesgo del consumo de azúcar para el desarrollo de enfermedad coronaria surgieron en la década de 1950. En un trabajo publicado en JAMA (del inglés "Journal of the American Medical Association") por Kearns y colegas en el 2016, gracias a una profunda revisión de documentos



internos de los años 1950 y 1960 de la Industria Azucarera, se demuestra de forma convincente que esta industria de EEUU no solo pago, sino que también inicio una investigación influenciada expresamente para eximir al azúcar como un factor de riesgo importante para las enfermedades coronarias [69].

En suma, existen muchos factores de riesgo para el desarrollo de ECV, algunos de ellos no se pueden modificar, como la edad y género. La severidad de cada factor de riesgo está asociada a un mayor riesgo de desarrollar ECV. Más aun, la presencia de múltiples factores de riesgo aumenta sustancialmente la probabilidad de ECV.

**Tabla 1. Factores de riesgo de la aterosclerosis**

<b>Modificables Mayores</b>	Dislipemia (LDL aumentada, HDL disminuida)
	Tabaquismo
	HTA
	Diabetes Tipo 2/Obesidad
	Dieta alta en azúcar refinada
<b>Modificables Menores</b>	Inactividad física
	Estrés
	Alcohol en exceso
	Factores trombogénicos
<b>No modificables</b>	Edad, Sexo
	Historia familiar
	Historia personal

### **1.3) PATOGENIA DE LA ATEROSCLEROSIS: una enfermedad inflamatoria crónica.**

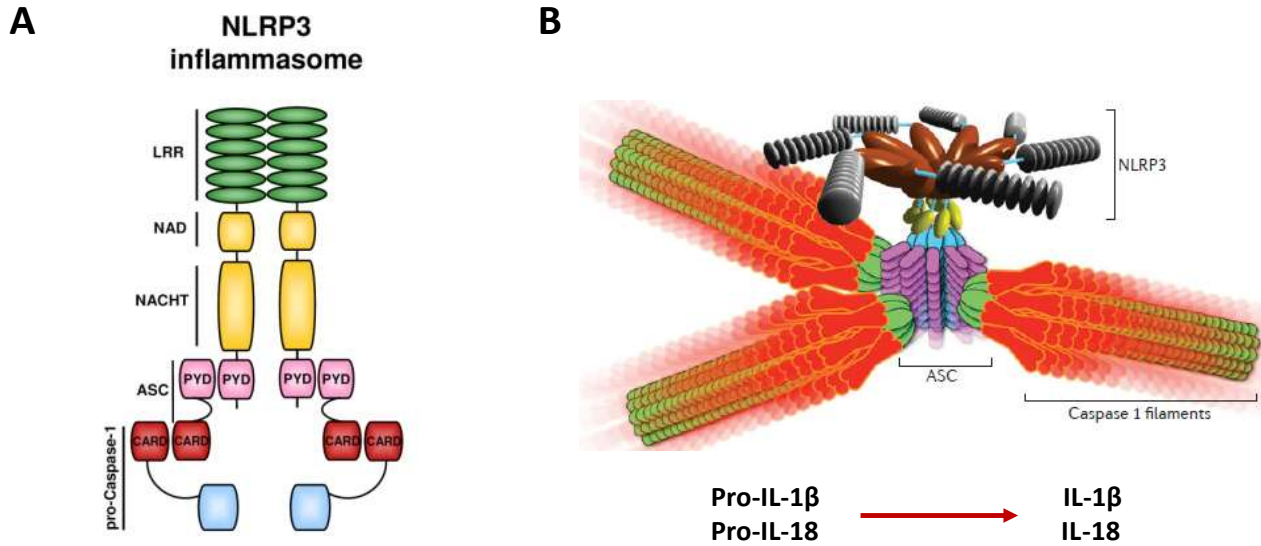
Si bien durante muchos años la patogenia de esta enfermedad estaba centrada únicamente en el rol que desarrollaba la dislipemia en la misma y luego surgieron dos hipótesis alternativas (hipótesis de la respuesta a la lesión [70, 71] y la hipótesis de la modificación oxidativa de la aterosclerosis [72]), en la actualidad la patogenia de la aterosclerosis se centra en el rol que juega el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico a nivel vascular [73].

Las herramientas fundamentales que llevaron al cambio de opinión con respecto a la patogénesis de la aterosclerosis, dándole mayor importancia al papel de la inflamación y la inmunidad frente a la proliferación de SMC, fueron la identificación precisa de los componentes celulares en placas ateroscleróticas humanas usando técnicas modernas de inmunohistoquímicas (llevadas a cabo por Goran Hansson y sus colegas). En estos trabajos se evidenció que la formación de células espumosas es principalmente derivada de los macrófagos y además que los linfocitos T participan en la formación de la placa y se encuentran en un alto porcentaje, aprox. 20%, rodeando la placa y en la cubierta fibrosa, evidenciando el papel de la inmunidad en la aterosclerosis [73, 74].

El proceso inflamatorio, que "es un conjunto complejo de interacciones entre factores solubles y células que pueden surgir en cualquier tejido en respuesta a una lesión traumática, infecciosa, post-isquémica, tóxica o autoinmune" [75], está involucrado en todas las etapas de la aterosclerosis y participa tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Está implicada en la formación de estrías grasas tempranas, cuando el endotelio es activado y expresa quimioquinas, incluyendo la quimioquina atrayente de monocitos MCP-1 e interleuquina 8 (IL-8), y moléculas de adhesión, incluida la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, molécula de adhesión vascular VCAM-1, selectina E y P que conducen al reclutamiento e infiltración de monocitos/linfocitos al espacio subendotelial [76]. También está implicada en la liberación de citoquinas de la familia 1 (IL-1 $\beta$  e IL-18) por la activación del inflamasoma NLRP3 en respuesta a la formación de cristales de colesterol durante todo el desarrollo de la enfermedad [60].

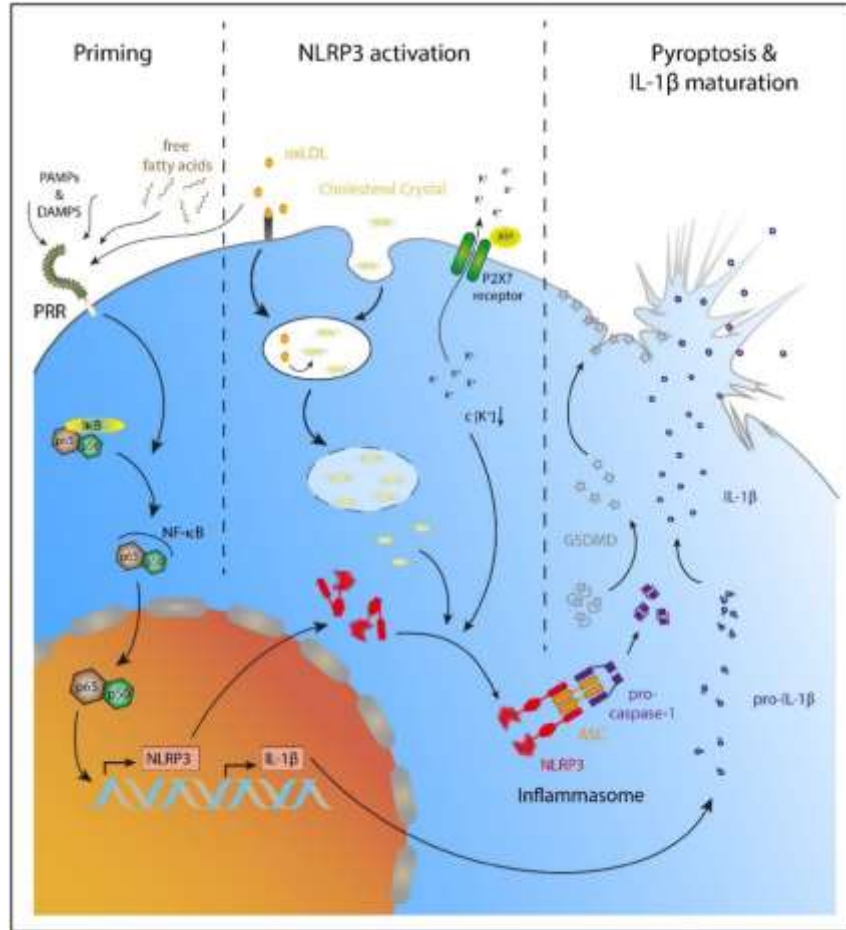
El inflamasoma es un complejo multiproteico señalizador que forma parte del sistema inmune innato y que sirve como plataforma de activación de caspasas, principalmente Caspasa-1, en respuesta a señales de peligro exógenas y endógenas promoviendo principalmente

liberación de IL-1 $\beta$  y muerte celular regulada [77, 78]. Caspasa-1 es una cisteína proteasa que digiere en el extremo amino terminal de residuos de aspartilos y procesa pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 a IL-1 $\beta$  e IL-18 maduras, siendo estas potentes citoquinas proinflamatorias [79, 80]. El inflamasoma de tipo NLRP3, uno de los cinco tipos de inflamasomas conocidos, es el más firmemente involucrado en la patogenia de la obesidad y enfermedades cardiovasculares [59, 63, 78, 81-84]. El inflamasoma NLRP3 (figura 7) está formado por tres componentes proteicos principales, el receptor NLRP3, el adaptador ASC y la procaspasa-1. En cuanto a NLRP3 su estructura está determinada por un dominio central "NACHT" (dominio de unión a nucleótidos) común en todos los "NLRs" (del inglés "Nod-Like Receptors") con funciones autorregulatorias, un dominio sensor carboxilo terminal "LRR" (del inglés "Leucine-Rich Repeat") y un dominio efector *N*-terminal "pyrin" (del inglés PYD) o de reclutamiento de Caspasa (del inglés "Caspase Recruiting Domain"), dependiendo del dominio NLR [77, 85]. Este último, mediante interacción PYD-PYD (figura 6) recluta a la molécula adaptadora ASC la cual se compone de dos dominios: un dominio PYD *N*-terminal y un dominio CARD C-terminal. Esta proteína permite el reclutamiento de procaspasa-1 y funciona como una plataforma activadora, convirtiendo a procaspasa-1 en caspasa-1 activa por autoproteólisis, siendo capaz de procesar IL-1 $\beta$  e IL-18. ASC recluta moléculas de procaspasa mediante el dominio efector CARD por interacción CARD-CARD y oligomeriza gracias al dominio PYD, provocando esto la activación de caspasa-1 [86-88]. La caspasa-1 es expresada como un zimógeno denominado procaspasa-1 que no tiene actividad proteolítica. La estructura de procaspasa-1 consiste en un dominio CARD que interacciona con el adaptador ASC y dos subunidades p10 y p20 (10 y 20 kDa respectivamente).



**Figura 7. A) Estructura del inflammasoma NLRP3. B) Inflammasoma NLRP3 oligomerizado.** Tomado de Eitel J. et al. *Frontiers in Microbiology*; 2011, 1, 149.

El mecanismo de ensamblado del inflammasoma propone que son necesarios dos procesos (figura 8): 1. el cebado y, 2. la activación del inflammasoma NLRP3 [77, 89, 90]. En primer lugar, para que el inflammasoma se ensamble debe generarse una primera señal que desencadena el cebado del proceso, el cual consiste en parte en la estimulación a nivel transcripcional de la expresión de las proteínas NLRP3 y pro IL-1 $\beta$  (figura 7). Esto es así, ya que en condiciones basales, ambas proteínas no se expresan constitutivamente y su concentración en el citosol es muy baja. La señalización para el cebado puede ser desencadenado por diversos PAMPs (del inglés "Pathogen Associated Molecular Patterns") o DAMPs (del inglés "Damage Associated Molecular Patterns") que pueden ser reconocidos por receptores TLRs (del inglés "Toll-Like Receptors") (ej. LDL-ox) o NLRs, así como también pueden ser citoquinas reconocidas por receptores IL-1R1, TNFR1 y TNFR2 [60, 77, 89-91]. Estos receptores al reconocer su ligando activan la vía de señalización de NF- $\kappa$ B que induce la transcripción de NLRP3 y pro IL-1 $\beta$ , no siendo así con los componentes ASC, procaspasa-1 ni proIL-18, ya que estos se expresan de manera constitutiva [92].



**Figura 8. Secreción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la activación inflammasoma NLRP3 en la aterosclerosis.** PAMPs y DAMPs inducen la señalización proinflamatoria de NF- $\kappa$ B después de la detección por PRR (receptores de reconocimiento de patrones). El factor de transcripción NF- $\kappa$ B se trasloca al núcleo y entre otros induce la expresión del precursor de pro-IL-1 $\beta$  y NLRP3. Los cristales de colesterol pueden ser fagocitados o la LDL-ox puede ser fagocitada mediada por receptor que resulta en la formación de cristales de colesterol dentro de fagolisosomas. La proteína inactiva NLRP3 se puede activar por ruptura lisosomal inducida por cristales de colesterol o por una disminución en la concentración intracelular de K<sup>+</sup>, causado por la unión de ATP al receptor purinérgico P2X7R. En la activación, NLRP3 recluta la proteína adaptadora ASC, que une al NLRP3 con la pro-caspasa-1. La caspasa-1 se activa por autoproteólisis y formación del heterotetrámero enzimáticamente activo. Caspasa-1 activa cataliza el procesamiento de IL-1 $\beta$  y el mediador de piroptosis GSDMD (gasdermina D). Tomado de: Grebe. A et al. *Circulation Research*; 2018, 122, 1722.

Para que el inflammasoma pueda ensamblarse a plenitud, después del cebado, se necesita de una segunda señal activadora (figura 8). Dicha señal permitirá el ensamblado/activación de NLRP3 y la consecuente oligomerización que resulta en el reclutamiento de ASC y luego procaspasa-1. Los activadores pueden ser moléculas exógenas o endógenas tales como adenosin-trifosfato (ATP), toxinas formadoras de poros como la nigericina o cristales capaces de producir daño fagolisosomal [93]. Estos últimos pueden ser cristales como alúmina, sílica, asbestos,

monourato de sodio o del propio colesterol, los que actúan como segunda señal y activan al inflamasoma NLRP3 [60]. El mecanismo a nivel de la activación aún es muy discutido y se presentan varios causantes como ser: eflujo de  $K^+$  por activación de receptores purinérgicos, lo que causa bajos niveles de  $K^+$  intracelular [94-96], translocación de NLRP3 a la mitocondria mediante el adaptador MAVS [97], producción de especies reactivas del oxígeno provenientes de la mitocondria (ROS) [98], liberación de ADN mitocondrial o cardiolipina y liberación de catepsinas lisosomales provocada por el daño lisosomal [93] (figura 7). Es interesante resaltar que la LDL modificada puede por sí sola dar cuenta tanto de la primera como de la segunda señal y ser un estímulo muy importante para la activación crónica del inflamasoma en el lecho vascular [60].

### **1.3.1) Función endotelial, óxido nítrico y aterogénesis.**

El endotelio constituye una interfase que delimita los compartimentos intra y extravasculares, actuando como tapizado continuo atrombogénico, barrera de permeabilidad selectiva, monitor y transductor de señales intravasculares solubles y mecánicas, fuente y blanco de mediadores intercelulares [99]. Su estructura y función normal son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis de la pared y fisiología vascular, cumpliendo un rol antiaterogénico fundamental [99]. Inicialmente se pensaba que el episodio desencadenante de la enfermedad aterosclerótica era una lesión anatómica del endotelio con pérdida de células endoteliales y exposición de la membrana basal trombógena subyacente (“hipótesis de la respuesta a la lesión”). Sin embargo, la denudación endotelial no ha podido ser evidenciada en las etapas iniciales del proceso, sino únicamente en las etapas más tardías de la enfermedad. Esta observación junto con la apreciación de las múltiples funciones que cumple el endotelio, llevó a postular que su estado funcional puede ser tan importante como su integridad anatómica en la aterogénesis [99, 100].

Debido a su localización y al importante conjunto de productos bioactivos que produce (tabla 2) el endotelio regula una serie de balances fisiopatológicos de indudable importancia en el desarrollo de enfermedad vascular, siendo el sitio primario de asiento del proceso morboso aterosclerótico [101].

**Tabla 2. Mediadores derivados del endotelio.** (adaptada de ref. [99])

<b>Antitrombóticos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\cdot</math>NO</li><li>• PGI<sub>2</sub></li><li>• Heparansulfato</li><li>• T-PA – Urokinasa</li></ul>	<b>Protrombóticos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Factor Tisular</li><li>• vWF</li><li>• PAI-1, etc.</li></ul>
<b>Vasorelajadores:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\cdot</math>NO</li><li>• PGI<sub>2</sub></li><li>• EDHF, etc.</li></ul>	<b>Vasoconstrictores:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Endotelina I</li><li>• Angiotensina II</li><li>• PDGF</li></ul>
<b>Inhibidores del crecimiento:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\cdot</math>NO</li><li>• TGF-<math>\beta</math></li></ul>	<b>Estimuladores del crecimiento:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• BFGF, VEGF, IGF(s)</li><li>• PDGF</li></ul>
<b>Anti-inflamatorios:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\cdot</math>NO</li><li>• PGI<sub>2</sub></li><li>• Kininasa II</li></ul>	<b>Pro-inflamatorias:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Citoquinas (IL-1, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-8)</li><li>• ELAM-s (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina)</li></ul>
<b>Antioxidantes:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• SOD</li><li>• <math>\cdot</math>NO</li></ul>	<b>Pro-oxidantes:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Superóxido</li><li>• ONOO<sup>-</sup></li></ul>

Debido a su plurifuncionalidad, óxido nítrico ( $\cdot$ NO, primariamente caracterizado como el factor de relajación derivado del endotelio, EDRF) se destaca del resto de los mediadores producidos por el endotelio. El  $\cdot$ NO regula múltiples procesos estrechamente involucrados en la fisiología vascular y el proceso aterogénico, destacándose su rol en la vasodilatación dependiente del endotelio [102] y la inhibición de procesos oxidativos e inflamatorios [103-107].

El  $\cdot$ NO es un radical libre producido por diversas células de los mamíferos a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina en presencia de oxígeno molecular y NADPH, reacción

catalizada por una familia de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintetasas (NOS) [108, 109]. La vida media del  $\bullet$ NO en sistemas aeróbicos es de 5-60 segundos y depende de sus reacciones con blancos biológicos (ej. guanilato ciclasa) así como de otras reacciones de inactivación/transformación, fundamentalmente con el oxígeno molecular y especies reactivas del oxígeno, en particular con el superóxido  $O_2^{\cdot-}$  [102, 109]. Normalmente, su vida media es suficientemente larga como para que el  $\bullet$ NO difunda y actúe como segundo mensajero activando la guanilato ciclasa citosólica de las células musculares lisas (SMC) de la media vascular, que a través de la producción de GMP cíclico induce la relajación del vaso sanguíneo [102].

En condiciones normales y debido fundamentalmente al predominio de la acción del  $\bullet$ NO, el endotelio funciona en un modo inhibitorio, antiaterogénico inhibiendo procesos como la contracción del músculo liso vascular, la agregación plaquetaria, la proliferación celular, la trombosis, la adhesión leucocitaria, la oxidación de biomoléculas y manteniendo una permeabilidad selectiva que constituye una barrera al depósito de lípidos en la pared arterial [110]. El concepto de disfunción endotelial (DE) hace referencia y jerarquiza la importancia que la pérdida de la función normal del endotelio tiene para la fisiopatología vascular [110]. La DE es una alteración precoz en la patogenia de la aterosclerosis y ha sido evidenciada tanto en modelos experimentales animales como en pacientes con diferentes grados de enfermedad aterosclerótica o riesgo de padecerla [110-121]. Se ha sugerido que el test de la hiperemia reactiva podría ser de utilidad para monitorizar la respuesta vascular al tratamiento farmacológico instituido en pacientes con aterosclerosis [122]. Sin embargo, este estudio no se ha podido consolidar de manera significativa en la clínica y ha sido sustituido por otros estudios no invasivos capaces de detectar placas de ateroma en lechos vasculares importantes (arterias coronarias), como son la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RMN).

***Durante el proceso patogénico de la aterosclerosis existen varios eventos importantes como ser la pérdida de la función normal del endotelio (disfunción endotelial), retención y acumulación de lipoproteínas en el espacio subendotelial, reclutamiento de células inmunes, formación de células espumosas; todos procesos que llevan a la formación, desarrollo y ruptura de una placa de ateroma en sitios particularmente susceptibles del lecho vascular.***



La enzima antiinflamatoria Hemoxigenasa-1 (HO-1) también tiene efectos citoprotectores durante la disfunción endotelial. La importancia de HO-1 está demostrada por el daño severo y persistente en el endotelio de humanos con deficiencia de esta enzima o ratones *Hmox1*<sup>-/-</sup> knockout [123]. HO-1 ejerce potentes efectos contra la aterogénesis, injuria de isquemia y reperfusión y rechazo de transplantes. HO-1 protege los tejidos durante el estrés inflamatorio a través de la degradación del grupo hemo prooxidativo, producción de bilirrubina y monóxido de carbono (CO) y regulación de hierro celular. Se ha propuesto que estos efectos vasculo-protectores de la HO-1 son a través de múltiples mecanismos, incluyendo la regulación del ciclo celular y angiogénesis, homeostasis redox y modulación del sistema de complemento [123-128].

Las ROS son producidas por sistemas enzimáticos presentes en la pared vascular como la NADPH oxidasas (NOX), xantina oxidasa y la NOS que incrementan en asociación con los factores de riesgo. La familia NOX, la cual se expresa en neutrófilos, monocitos, VSMC, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y mastocitos, son una de las fuentes más importantes de ROS en la pared vascular [129-131]. Durante la disfunción endotelial esta familia de proteínas tiene actividad anormal, resultando en una sobreproducción de ROS, incluyendo el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que promueve disfunción endotelial a través de diferentes efectos que incluyen la apoptosis de células endoteliales, vasoconstricción, peroxidación lipídica, proliferación celular y formación de isoprostanos [132, 133]. El  $O_2^{\cdot-}$  también reacciona con  $\cdot NO$ , inhibiendo sus efectos antiaterogénicos y formando nuevos ROS como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) [134]. Las ROS modulan muchos procesos involucrados en la aterosclerosis, incluyendo la inflamación, apoptosis, replicación de VSMC, angiogénesis y degradación de la matriz y por lo tanto ha sido propuesto que el incremento en la expresión y/o actividad de las NADPH oxidasas tienen un rol importante en la aterosclerosis [135, 136].

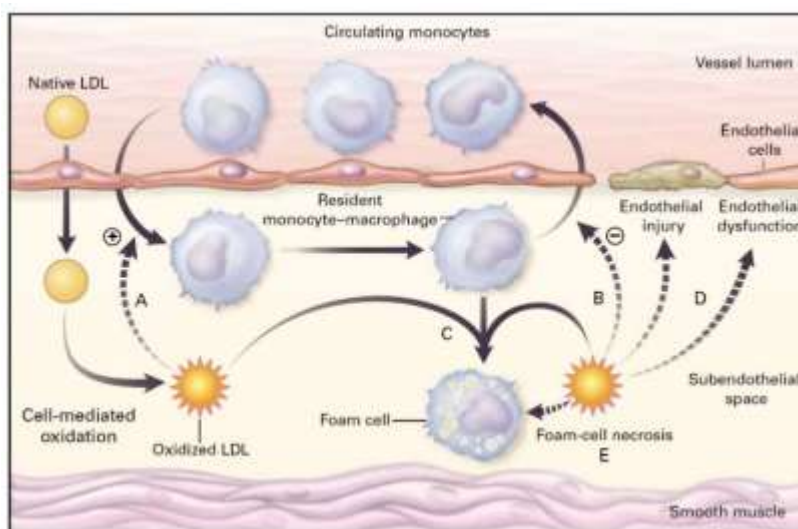
### **1.3.2) Acumulación de lipoproteínas en el espacio subendotelial.**

La acumulación de LDL en la íntima arterial conduce al desarrollo de aterosclerosis. La retención de partículas infiltrantes de LDL por los proteoglicanos en el espacio subendotelial es uno de los eventos iniciadores de la aterosclerosis [137, 138]. Las lipoproteínas atrapadas son más propensas a sufrir diferentes tipos de modificaciones químicas, ya sea por vías enzimáticas

o por vías no enzimáticas. Las modificaciones enzimáticas son mediadas principalmente por proteasas, lipasas y otras enzimas que producen especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (NAPDH oxidasa, mieloperoxidasa, xantin oxidasa, iNOS, etc.), lo que conduce a su agregación y a una mayor unión de proteoglicanos [139].

Las modificaciones oxidativas por mieloperoxidasa, lipoxigenasa y ROS conducen a la formación de un subtipo de LDL modificada que se denomina LDL oxidada (LDL-ox). Esta puede provocar una respuesta inflamatoria innata [140]. ***La inflamación y el estrés oxidativo vascular (predominio de la formación y reacciones de los oxidantes sobre la de los antioxidantes), particularmente cuando se asocia con la modificación/oxidación de la LDL, son un componente patogénico principal en el proceso aterogénico*** [141-143] (figura 9).

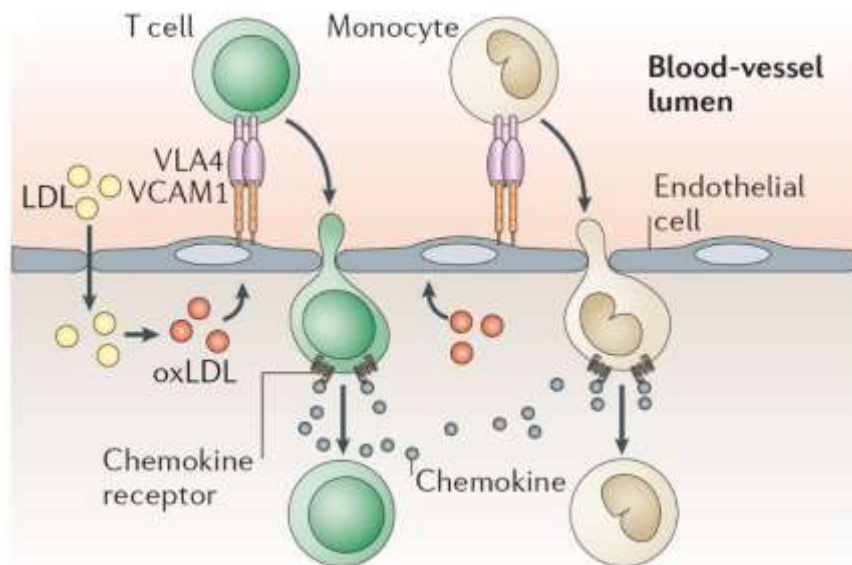
Los macrófagos en las placas de ateroma expresan varios receptores del tipo TLR. La LDL modificada y sus productos pueden ser ligandos endógenos para TLR2 y TLR4 [144, 145]. Otros ligandos endógenos de relevancia en la aterogénesis incluyen a la lisofosfatidilcolina y los ácidos grasos no esterificados oxidados generados por la fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas (Lp PLA2) [146]. *Es probable que todos estos factores sean importantes para iniciar y contribuir al mantenimiento de la inflamación en las etapas iniciales de formación de las placas.* No obstante, las estrategias para prevenir la activación inmune innata utilizando antioxidantes [147, 148] o inhibidores selectivos de Lp PLA2 [149, 150] no han logrado reducir la incidencia de eventos cardiovasculares en diversas poblaciones de pacientes (figura 9).



**Figura 9. Patogénesis de la aterosclerosis.** Tomado de: *M.N.Diaz et al.; New England Journal of Medicine 1997, 337, 408.*

### **1.3.3) Reclutamiento de células inmunes a los focos de lesión.**

En respuesta a la acumulación de lipoproteínas atrapadas y modificadas en el espacio subendotelial, y en sitios en el árbol arterial con flujo sanguíneo turbulento, las células endoteliales expresan moléculas de adhesión, como la proteína 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) [151, 152]. Los monocitos circulantes y otros leucocitos, en particular células T, se reclutan en estos sitios (figuras 9 y 10). Los monocitos infiltrantes se diferencian en macrófagos en respuesta al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y al factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que son producidos por células endoteliales y varios tipos de células. Como resultado de su continuo reclutamiento, diferenciación y proliferación local, los macrófagos derivados de monocitos son una población celular importante en las placas ateroscleróticas [153, 154].



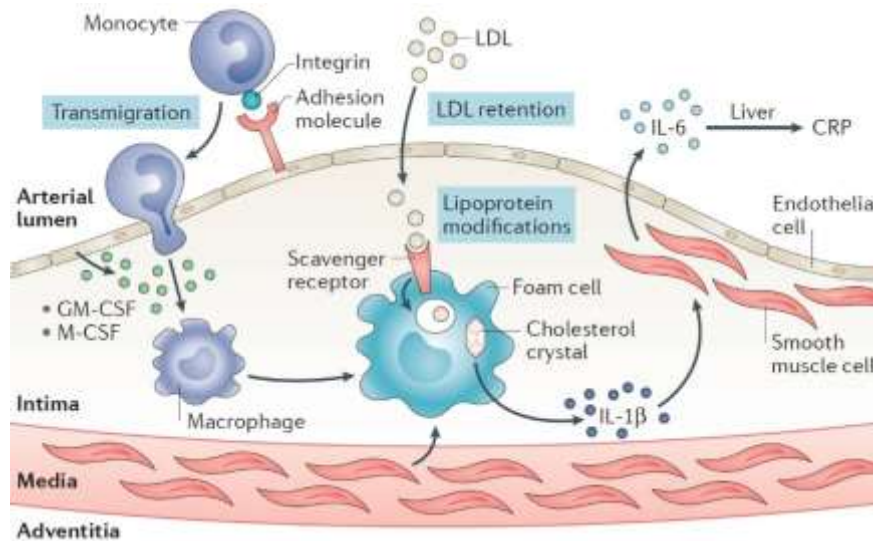
**Figura 10. Reclutamiento de células inmunes hacia la placa de aterosclerosis.**  
Tomado de: *Hansson G.K. et al. Nature Reviews Immunology 2006, 6, 508.*

### **1.3.4) Formación de células espumosas: un evento patogénico característico.**

La acumulación de colesterol en las lesiones ateroscleróticas y en particular, en el interior celular para dar lugar a células cargadas de lípidos (denominadas células espumosas) no es debida a la captación celular de la LDL nativa por medio del receptor de la LDL (receptor apoB/E), sino que se debe a la captación de una forma modificada (por ej. oxidada) de la misma y por la vía de un receptor alternativo denominado receptor "scavenger" (barrendero) presente en los

monocitos/macrófagos y células musculares lisas. En contraste con la captación de la LDL nativa por el receptor apoB/E, la captación de la LDL oxidada por la vía del receptor "scavenger" principalmente clase A y CD36, no está sujeta a regulación por "feed-back" negativo y por tanto resulta en la captación y acumulación masiva de colesterol y sus productos de oxidación, determinando la transformación de estas células en las denominadas células espumosas (células cargadas de lípidos), componentes principales de la placa de ateroma [101, 141] (figuras 9). Las células espumosas quedan atrapadas dentro de la íntima arterial y su capacidad migratoria está comprometida [155] (figuras 9). Eventualmente mueren y crean un área central en la placa que consiste en células apoptóticas y necróticas, cristales de colesterol y otro material extracelular. La captación de lípidos por los macrófagos también podría estar mediada por pinocitosis [156].

Los cristales de colesterol que se forman en las células espumosas, pueden *per se* activar el inflammasoma NLRP3, lo que conduce a la liberación de IL  $1\beta$  [60, 157] (figuras 11).



**Figura 11. Respuesta inmune innata en la aterosclerosis.** Tomado de: Gisterå A. et al. *Nature Reviews Nephrology*; 2017, 13, 368.

La IL- $1\beta$  liberada actúa, entre otros blancos, sobre las células del músculo liso para inducir la producción de IL-6 [158, 159], que a su vez envía señales al hígado para inducir la respuesta de fase aguda, incluida la producción de la proteína C-reactiva (del inglés "C Reactive Protein") [76, 160] y la IL-6 producida localmente en el hígado (que también puede inducir la producción de CRP) (figura 11).

### **1.3.5) Ruptura de placa, erosión, aterotrombosis y complicaciones agudas de la aterosclerosis como eventos desencadenantes del Infarto Agudo de Miocardio.**

A medida que la placa aterosclerótica crece, se vuelve más compleja. Las estrías grasas se convierten en lesiones fibro-adiposas que se convierten en placas avanzadas con un núcleo necrótico cubierto por una capa fibrosa. La acumulación de células inmunitarias, como las células T, ocurre en las regiones del hombro de la placa [73]. Los síntomas de la aterosclerosis generalmente surgen cuando la placa no puede resistir la fuerza pulsátil de la presión sanguínea y se forman fisuras superficiales, generalmente cerca de los bordes de la placa [161]. Las placas que son vulnerables a la ruptura se caracterizan por una fina capa fibrosa, un gran núcleo necrótico lleno de lípidos y una inflamación en curso [162, 163]. Se estima que las rupturas de la placa representan alrededor del 70% de los eventos de trombosis coronaria [164]. Se cree que el 30% restante es causado por la erosión endotelial y posiblemente también por otras formas de patología que pueden desencadenar la enfermedad clínica. Las erosiones endoteliales se definen como la ausencia de revestimiento endotelial que conduce a la formación de trombos agudos sin signos de rotura de la placa [165] (figura 1B).

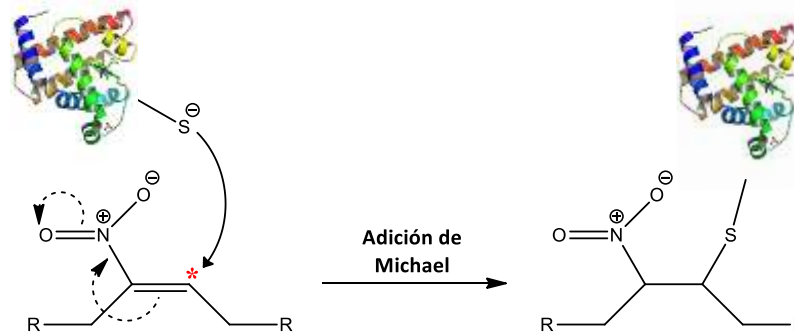
### **1.4) ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS Y NITRADOS: NITROALQUENOS ENDÓGENOS Y SU POSIBLE ROL EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS CRÓNICAS.**

Los nitroalquenos son moléculas que presentan un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) sobre un carbono que está formando parte de un doble enlace carbono-carbono (Esquema 1).

Dentro de esta familia de moléculas, se destacan los ácidos grasos (AG) insaturados y nitrados en un doble enlace, ya que son nitroalquenos endógenos que se forman bajo determinadas circunstancias fisiológicas y/o fisiopatológicas [166]. Se forman *in vivo*, principalmente en condiciones fisiopatológicas, en ambientes inflamatorios donde hay un aumento del nivel de estrés oxidativo, donde contribuirían a resolver el foco oxidativo-inflamatorio ya que poseen potentes propiedades anti-inflamatorias, anti-aterogénicas, anti-fibróticas y citoprotectoras [167-173].

Por definición los nitroalquenos son compuestos electrofílicos debido a que el grupo nitro es un centro electrón-atrayente que genera que el carbono beta del doble enlace quede

electrón deficitario y tenga una gran tendencia a formar aductos covalentes con nucleófilos mediante una reacción de adición de Michael. Estas especies nucleofílicas son grupos tioles o aminas presentes en residuos de cisteína o histidina [174], que a su vez están en sitios claves (activadores, reguladores) de muchas proteínas con gran relevancia biológica (Esquema 1) [166].



Esquema 1. Modificación covalente de proteínas y otros nucleófilos de baja masa molecular por los nitroalquenos.

#### 1.4.1) Formación de los nitroalquenos endógenos.

En los últimos años se ha demostrado que algunos nitroalquenos se sintetizan endógenamente, principalmente a través de dos vías: 1) la vía catalizada por nitración de AG insaturados a partir de nitritos proveniente de fuentes dietéticas (verduras y carnes) y durante la digestión (en el medio ácido del estómago) y 2) la vía catalizada por la nitración de AG libres, a partir de la producción endógena de especies reactivas del nitrógeno ( $\cdot\text{NO}$ ,  $\cdot\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^\cdot$ ) durante procesos de estrés oxidativo y condiciones inflamatorias (figura 12) [175, 176].

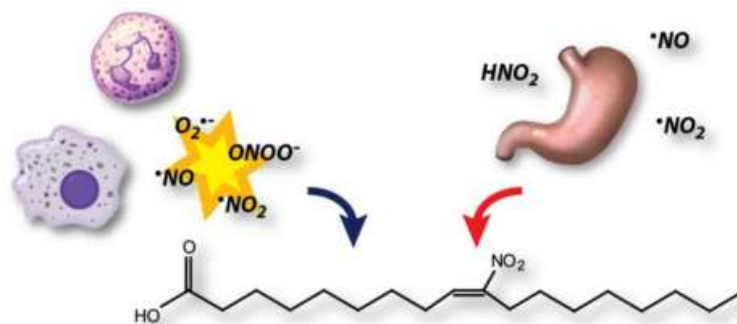
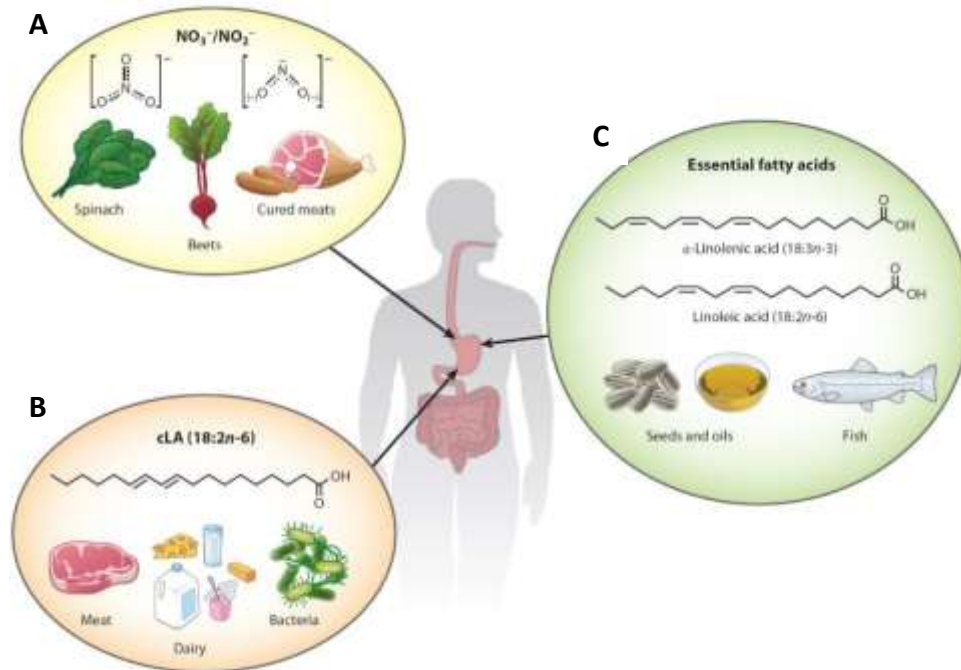


Figura 12. Mecanismos propuestos para la formación endógena de nitroalquenos derivados de ácidos grasos insaturados. A la izquierda, se muestra la vía de síntesis mediada por radicales libres y que ocurre en condiciones inflamatorias y de estrés oxidativo. A la derecha se muestra la vía de síntesis catalizada por ácido y como ocurre en el estómago a partir de fuentes dietéticas de grupos nitro. Tomado de: *The physiological generation of nitro-fatty acids*; B.A. Freeman; <http://www.pharmacology.us/Faculty/BruceFreeman>)

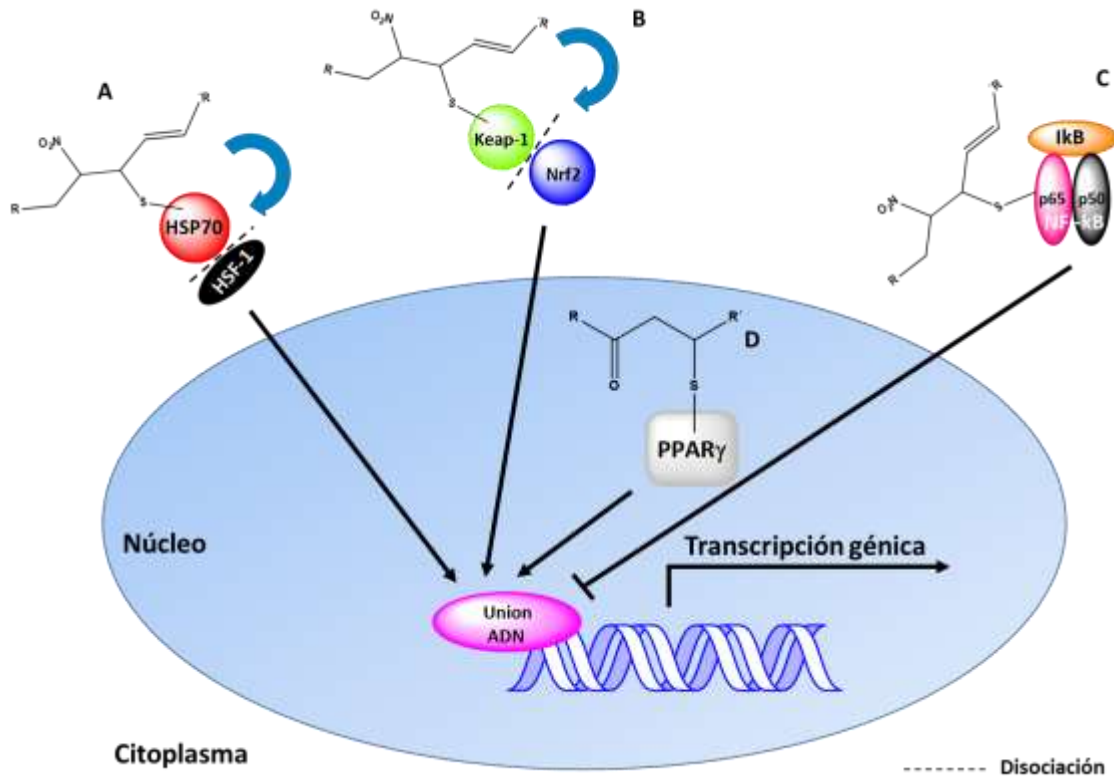
A su vez, los nitroalquenos pueden provenir directamente de la dieta, como se ha evidenciado en las dietas mediterránea y japonesa, que se dice son beneficiosas para la salud [176] (figura 13). En el organismo, los principales nitroalquenos endógenos derivan de ácidos grasos poliinsaturados esenciales obtenidos de la dieta. Los nitroalquenos más estudiados son los derivados del ácido linoleico (LA-NO<sub>2</sub>), del ácido oleico (OA-NO<sub>2</sub>), del ácido linoleico conjugado (CLA-NO<sub>2</sub>), y del nitroaraquidónico (AA-NO<sub>2</sub>) [177]. El ácido linoleico conjugado (CLA) es el principal precursor de los nitroalquenos endógenos, porque es un ácido graso que tiene una gran facilidad para nitrarse a nivel del doble enlace, se encuentra en la dieta, pero también es sintetizado en los seres humanos a nivel del tubo digestivo en un proceso mediado por la microbiota por isomerización del ácido linoleico (LA) [166] (figura 13).



**Figura 13. Síntesis endógena de nitroalquenos:** **A)** en el medio ácido del estómago las hortalizas y las carnes son ricas en nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). El nitrato puede ser reducido a nitrito, por las bacterias de la saliva. El nitrito queda muy concentrado en la saliva, y sumado al pH bajo del estómago se favorece la formación de HNO<sub>2</sub> que se descompone en el radical dióxido de nitrógeno, NO<sub>2</sub>. El NO<sub>2</sub> es capaz de formar un aducto con los AG libres. Esta reacción de adición ocurre preferentemente con el ácido linoleico conjugado (CLA) para formar el nitroalqueno NO<sub>2</sub>-CLA. **B)** Formación del NO<sub>2</sub>-CLA. Puede ser directamente obtenido de la dieta (leche y carne). Las bacterias del tubo digestivo pueden favorecer la síntesis de CLA, convirtiendo al isómero del ácido oleico (el ácido vaccénico), en CLA. **C)** Los ácidos grasos esenciales  $\Omega$ -3 y  $\Omega$ -6, ácido  $\alpha$ -linolénico (18: 3n-3) y ácido linoleico (18: 2 n-6), se obtienen de la dieta a partir de semillas, aceites y pescados. Tomado de: *Delmastro-Greenwood M. et al. Annual Reviews of Physiology; 2014, 76, 79.*

### 1.4.2) Mecanismo de acción de los nitroalquenos.

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos de cadena larga, fueron evaluados en modelos *in vitro* y en modelos animales, en los que se demostraron diferentes vías de señalización celular, a través de las cuales ejercen sus propiedades anti-inflamatorias.



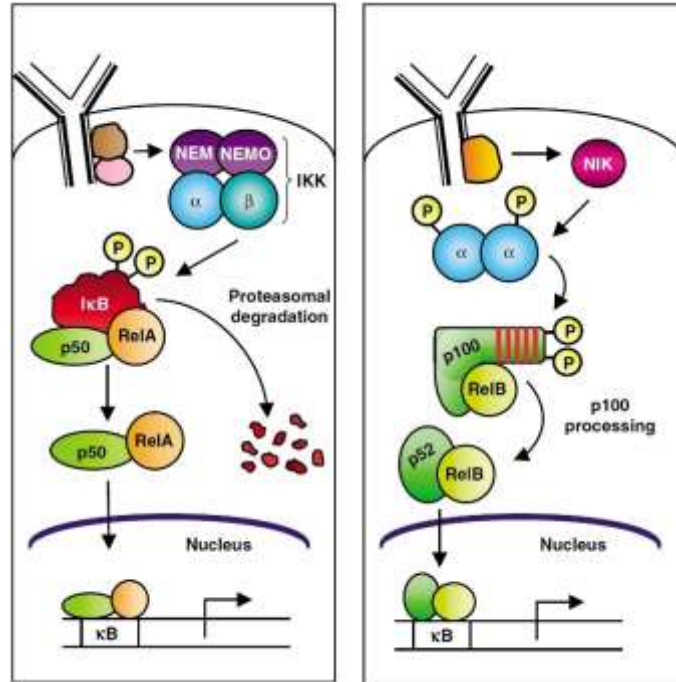
**Figura 14. Vías de señalización intracelular de los nitroalquenos derivados de los ácidos grasos y de síntesis.** En el citoplasma: **A)** Unión a HSP70, lo que ocasiona la liberación de HSF-1 y su la translocación al núcleo conduciendo así la transcripción de genes dependiente de HSF-1. **B)** Unión a Keap1, provocando la disociación y translocación al núcleo de Nrf2 para inducir genes de respuesta antioxidante. **C)** Unión a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B inhibiendo la transcripción de genes p65-dependientes. En el núcleo: **D)** se unen covalentemente a los receptores PPAR y actúan como agonistas parciales, estimulando la transcripción génica. (Adaptadode: Delmastro-Greenwood M. et al. *Annual Reviews of Physiology*; 2014, 76, 79.)

#### 1.4.2a) Inhibición de la vía NF- $\kappa$ B.

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) controla una amplia gama de procesos biológicos que incluyen inmunidad innata y adaptativa, inflamación, ciclo y proliferación celular, respuestas al estrés, desarrollo de células B y organogénesis linfoide. La familia del NF- $\kappa$ B en mamíferos consta de cinco subfamilias: NF- $\kappa$ B1 (p105 y p50), NF- $\kappa$ B2 (p100 y p52), RelA (p65),



RelB y c-Rel.2 En general, el NF- $\kappa$ B puede ser activado en minutos por una gran variedad de factores tales como citoquinas inflamatorias, estrés oxidativo, lipopolisacáridos, virus, factores de crecimiento, luz ultravioleta, factores involucrados en la señalización de células T entre otros. En condiciones basales, este factor de transcripción se encuentra secuestrado en el citosol por proteínas inhibitorias I $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ ), pero en condiciones de estrés son disociados permitiendo que el factor de transcripción ejerza su acción [178]. El mecanismo canónico por el cual ocurre la disociación es por medio del complejo IKK, que se compone de tres subunidades IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y otra unidad regulatoria y estructural denominada NEMO (del inglés "NF-kappa-B Essential Modulator"). En conjunto, este complejo tiene actividad quinasa y es responsable de la fosforilación de dos serinas de I $\kappa$ B, dejando a esta proteína inhibidora como blanco de degradación proteosomal, permitiendo la liberación de NF- $\kappa$ B y por ende su translocación al núcleo para unirse al ADN [178, 179] (figura 15). La ubiquitinación es una forma de regulación de esta vía, siendo importante en la activación de NF- $\kappa$ B porque actúa a nivel del complejo IKK. Este complejo de actividad quinasa para ser activado debe ser ubiquitinado y se ha propuesto que dicha modificación ocurra a nivel de la subunidad reguladora NEMO, debido a que tiene dos dominios de unión de ubiquitina [179]. Por otro lado, en la vía no canónica, a diferencia de la anterior, la señalización permite activar una quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (del inglés "NF- $\kappa$ B-inducing Kinase"; NIK), la cual fosforila y activa el complejo IKK $\alpha$  y a través de la fosforilación de dos serinas de p100, provocando su proteólisis limitada a nivel del proteasoma e inducida por ubiquitinación, así como la consecuente generación de p52 que se transloca en forma activa hacia el núcleo [180] (figura 15). NF- $\kappa$ B es un inductor de la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión [181].



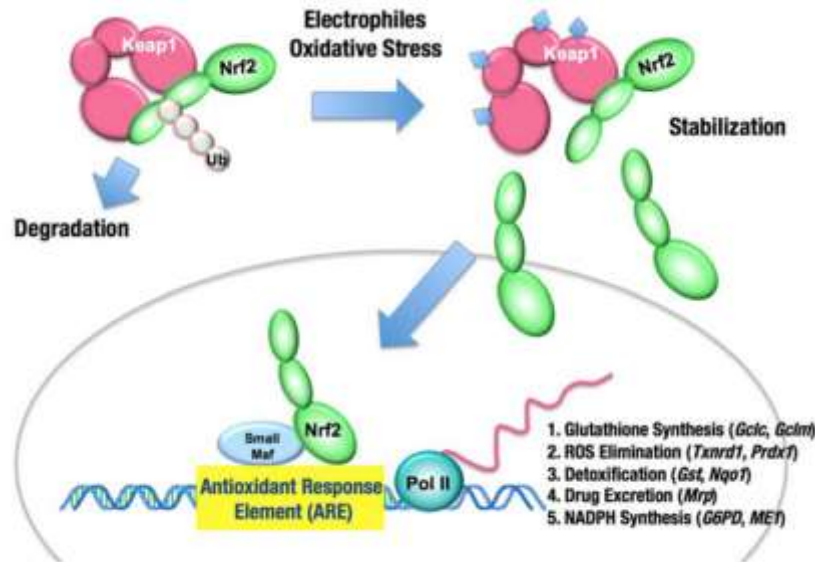
**Figura 15. Esquema del mecanismo de señalización de NF- $\kappa$ B.** Vía canónica (Izquierda) y no canónica (Derecha). Tomado de: Gilmore T.D. *Oncogene*; 2006, 25, 6680.

Los nitroalquenos disminuyen la unión del NF- $\kappa$ B al ADN, debido a la alquilación de cisteínas funcionalmente significativas de las subunidades p65 (Cys 38) y p50 (Cys 62), lo que conduce a la inhibición de la actividad transcripcional proinflamatoria. Esto inhibe la translocación de NF- $\kappa$ B y la unión al ADN, la supresión de la expresión de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), y la inhibición de la adhesión e infiltración de monocitos a los tejidos [182-184]. Además, los nitroalquenos inhiben la secreción inducida por lipopolisacárido (LPS; u otras señales) y dependiente de NF- $\kappa$ B de las citoquinas proinflamatorias como la IL-6, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) en macrófagos [183] (figura 14).

#### 1.4.2b) Activación de la vía de Nrf2.

La vía de señalización Nrf2-Keap1 es uno de los principales sistemas de citoprotección que poseen los vertebrados contra diversos agentes causantes de estrés (patógenos, sustancias tóxicas, radiación, etc.) capaces de provocar daño celular y por ende al organismo.

La proteína Nrf2 [Nuclear Factor (Erythroid-derived 2) like 2] se trata de un factor de transcripción que se une al ADN sobre el elemento de respuesta antioxidante ARE (“Antioxidant Response Element”) para inducir la expresión de aproximadamente 100 enzimas de fase 2, las cuales desempeñan roles antiinflamatorios o detoxificantes [185-187]. En condiciones normales, Nrf2 está anclado a las fibras de actina citoplasmáticas a través de su unión con la proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), proteína homodimérica que lo mantiene secuestrado en el citosol impidiendo que se traslade al núcleo y se una al ADN, manteniendo silenciada la expresión de enzimas detoxificantes y antioxidantes. En condiciones normales, Keap1 junto con la proteína Cul3, se comportan como un adaptador de ubiquitinación para Nrf2 y así permiten la degradación proteosomal de Nrf2 [188, 189]. Además Keap1 funciona como sensor de electrófilos (derivados de condiciones de estrés oxidativo y de xenobióticos) gracias a los residuos de cisteínas ultrasensibles a este tipo de moléculas que posee Keap1, aunque se mostró que la activación de Nrf2-Keap1 es independiente de la Cys151 de Keap-1 [190]. Al unirse uno o más electrófilos a los residuos de Cys reactivas, ocurre un cambio conformacional en Keap1 que permite liberar a Nrf2, lo que hace que este se traslade hacia el núcleo para unirse a AREs y así inducir la expresión de genes de enzimas de fase 2 [185-187, 191]. Los nitroalquenos, por su carácter electrofílico, forman aductos con los tioles de las cisteínas de Keap1, siendo reportado que las cisteínas 38, 226, 257, 273, 288 y 489 fueron muy reactivas con el OA-NO<sub>2</sub> [190]. Por lo tanto, los nitroalquenos son capaces de activar la vía Nrf2-ARE como consecuencia de la modificación de Keap1 [192], promoviendo la expresión génica de enzimas de fase 2, de las cuales se destacan: la hemoxigenasa-1 (HO-1), la NAD(P)H quinona deshidrogenasa-1 (NQO1), subunidades moduladora y catalítica de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa (GCLM y GCLC) involucradas en la síntesis de GSH, glutatión S-transferasa (GST) y otras que se muestran en la figura 16.



**Figura 16. La vía de señalización antioxidante NRF2-ARE.** En condiciones normales, Nrf2 se ubiquitina constantemente a través de Keap1 y se degrada en el proteasoma. Tras la exposición a electrófilos o estrés oxidativo, Keap1 se inactiva. El Nrf2 estabilizado se acumula en el núcleo y activa muchos genes citoprotectores. Tomado de: *Mitsuishi Y. et al. Frontiers in Oncology; 2012, 2, 200.*

#### 1.4.2c) Agonistas de receptores PPAR.

Los receptores PPAR son receptores nucleares implicados en la regulación del metabolismo de las grasas, homeostasis de la glucosa y señalización inflamatoria [170]. Existen tres tipos de PPARs: PPAR- $\alpha$ , PPAR  $\delta/\beta$  y PPAR- $\gamma$ . Todos ellos están involucrados en inducir expresión de genes involucrados en funciones como la adipogénesis, metabolismo lipídico, inflamación y mantenimiento de la homeostasis. Específicamente PPAR- $\gamma$  es el más altamente expresado en tejido adiposo, tanto blanco como pardo, sitio donde es el principal mediador de la adipogénesis, el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina [193]. Además, PPAR- $\gamma$  se expresa en otros tejidos donde regula la señalización inflamatoria debido a que en células mieloides como los macrófagos suprime la expresión de mediadores proinflamatorios como el IFN- $\gamma$ , así como también suprime la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)[166].

Este factor de transcripción es inducible por ligandos como metabolitos lipídicos (ej. ácidos grasos poliinsaturados, oxidados o nitrados) los cuales son reconocidos al unirse al dominio de unión a ligandos (LBD). Los nitroalquenos endógenos son ligandos parciales de los

tres receptores PPAR, pero sobre todo de los PPAR- $\gamma$ . Hay evidencia de que los nitroalquenos a través de estos receptores, aumentan la sensibilidad a la insulina, disminuyen la acumulación de grasas y las citoquinas proinflamatorias [194, 195]. Se ha mostrado mediante caracterización estructural que el nitroalqueno LA-NO<sub>2</sub> interacciona con los residuos Arg288 y Glu343 por enlaces de hidrógeno y a través de una reacción de adición de Michael con el residuo Cys285 presente también en este dominio de PPAR- $\gamma$  [196].

#### **1.4.2d) Activación de la respuesta dependiente del "Heat Shock Response Element".**

"Heat Shock Factor 1" (HSF-1) es también un factor de transcripción que promueve respuestas citoprotectoras regulando la expresión de proteínas del choque de calor ("Heat Shock Proteins", HSP). Estas se tratan de chaperonas que participan en el plegamiento y translocación de péptidos a través de membranas expresadas en respuesta a situaciones de estrés. Existen varios tipos de HSPs las cuales se clasifican en grupos de acuerdo a su peso molecular. Sus funciones son diversas dependiendo del tipo de HSP [197]. Estas representan una potencial causa de inflamación en aterosclerosis y donde estaría especialmente involucrada la HSP60 [198]. Las HSP pueden ser liberadas al medio extracelular a partir de células necróticas o por actividad exosomal, provocando activación de la inmunidad innata debido a que son ligandos de TLRs [199, 200].

HSF-1 se une al "Heat Shock Element" (HSE) y así promueve la transcripción de las HSPs [197]. Esta actividad del HSF-1 es suprimida por unión a las chaperonas HSP70 y la HSP90 [201, 202]. En condiciones de estrés, HSF-1 es disociado de estas chaperonas siendo sometido a modificaciones post-traduccionales que impulsan su acumulación en el núcleo y así su interacción con el ADN [203].

Esta vía de señalización también ha sido descubierta como blanco de nitroalquenos aunque no está claro aún el mecanismo de acción. Mediante técnicas de microarreglos de RNA en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) tratadas con OA-NO<sub>2</sub> se descubrió que el cambio transcriptómico más importante inducido por este nitroalqueno es la sobreexpresión de genes relacionados a la respuesta al choque de calor ("Heat Shock Response", HSR), blancos de HSF-1 [204]. Los nitroalquenos, forman un aducto con cisteínas de las HSP70,

con lo que liberan a HSF-1, activando la respuesta dependiente de shock térmico y resolviendo la situación de estrés celular [166].

#### **1.4.2e) Otros blancos subcelulares de los nitroalquenos.**

Por otro lado, el OA-NO<sub>2</sub> inhibe también la proliferación de células de músculo liso de la arteria pulmonar así como también disminuye la producción de ROS generadas por los macrófagos activados [137]. Además, los ácidos grasos nitrados inhiben de forma directa e irreversible la actividad de la enzima 5-lipooxigenasa (relacionada con inflamación por catalizar síntesis de leucotrienos), atenuando así respuestas inflamatorias agudas [138]. Se ha estudiado en ratones que nitroalquenos derivados del OA-NO<sub>2</sub> inhibieron la falla multiorgánica inducida por el efecto del LPS [139] y también reducen los niveles de triglicéridos y normalizan los de ácidos grasos en el plasma, además de incrementar los niveles plasmáticos de lipoproteína de alta densidad (HDL) [140].

La administración de ácido nitrooleico (OA-NO<sub>2</sub>) a ratones induce un *aumento de la expresión y actividad de la eNOS* y de la HO-1, y esto también sucede en modelos *in vitro*, tanto en células endoteliales vasculares como en células musculares vasculares lisas [205].

Por último, se ha reportado en un modelo celular *in vitro*, de sobre expresión del receptor AT1R, que uno de los mecanismos por los cuales estas moléculas podrían actuar como agentes anti-hipertensivos sería a través de la modificación post-traducciona del receptor AT1R, inhibiendo la cascada de señalización de la Ang II pero sin afectar su unión a dicho receptor [206].

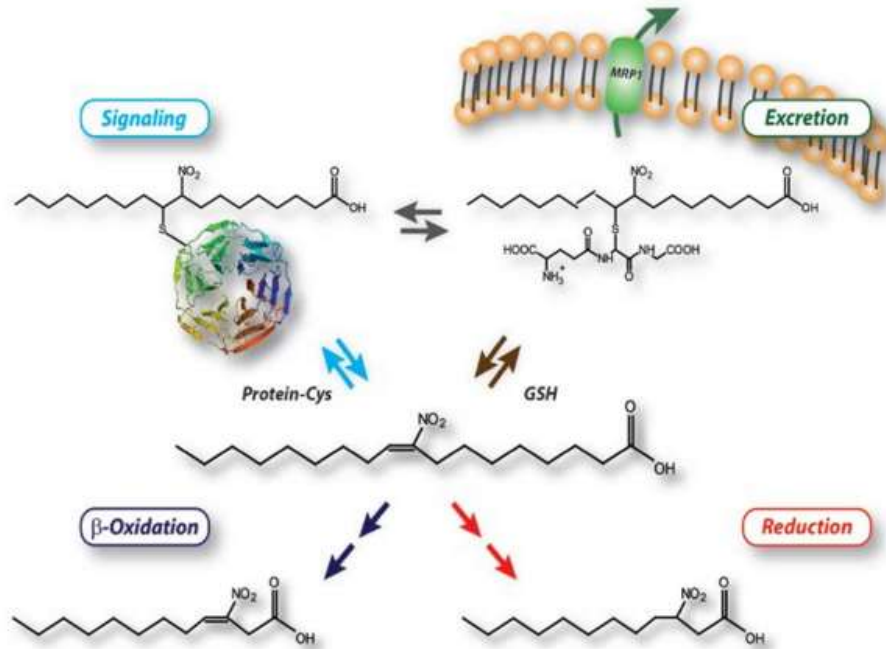
También se ha demostrado que el nitroalqueno derivado de ácido araquidónico, AA-NO<sub>2</sub>, es capaz de modular la actividad de la NOX2 en macrófagos, provocando una inhibición en la formación del radical superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> [207]. Esta inhibición de la NOX2 podría estar dada por la modulación de la actividad de la PDI (Protein Disulfure Isomerase) a través de la modificación covalente reversible que el AA-NO<sub>2</sub> genera al alquilar esta proteína [208].

### **1.4.3) Principales efectos farmacológicos de los de los ácidos grasos nitrados en modelos animales de patología humana.**

Considerando los efectos pleiotrópicos de los nitroalquenos derivados de los ácidos grasos, surge el potencial beneficio de su administración *in vivo* en modelos animales experimentales. Se han visto efectos beneficiosos en una multiplicidad de modelos experimentales. Protegen de la injuria vascular mediada por la HTA inducida experimentalmente con Ang II [206], protegen contra el daño miocárdico y renal en modelos de isquemia/reperfusión [171], reducen la aterosclerosis en modelo de ratones ApoE knockout [209], inhiben la formación de la capa neointimal en un modelo de lesión endovascular [210] y generan vasorrelajación en anillos de aorta pre-contraídos [175]. El tratamiento de ratones *ob/ob* (ratones obesos) con nitroalquenos, alimentados con dietas ricas en grasas, disminuye la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa [166]. Y también disminuyen la injuria renal en modelos de nefropatía diabética [211].

### **1.4.3a) Metabolismo y "Clearence".**

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos de cadena larga sufren una rápida metabolización por  $\beta$ -oxidación, inactivación (o reducción) y conjugación afectando su reactividad, farmacocinética y limitando sus acciones biológicas [212]. Estos mecanismos modulan la vida media de estos nitroalquenos, tanto de los nitroalquenos exógenos como endógenos. La conjugación con grupos glutatión forma productos que son exportados de la célula al espacio extracelular, donde son filtrados por los riñones y excretados por la orina. Los nitroalquenos son inactivados en forma irreversible por la enzima prostaglandina-1 reductasa [213]. Por último, como todos los ácidos grasos, los nitroalquenos son metabolizados a nivel mitocondrial por  $\beta$ -oxidación. Este proceso catabólico de los ácidos grasos implica la remoción, mediante la oxidación, de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el AG se descompone por completo en forma de moléculas de Acetil-CoA, que serán posteriormente oxidadas en la mitocondria para generar energía química en forma de ATP (figura 17) [176].



**Figura 17. Vías de metabolización y excreción de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos.** Se muestran las principales vías de eliminación: por unión a grupos glutatión y posterior excreción al espacio extracelular para posteriormente ser filtrados a nivel renal, beta-oxidación a nivel mitocondrial y reducción por la enzima prostaglandina 1 reductasa. Tomado de: B.A. Freeman; <http://www.pharmacology.us/Faculty/BruceFreeman>.

### 1.5) NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y METABÓLICAS.

Si bien algunos estudios epidemiológicos sugieren que el control de los factores de riesgo a través de cambios en los hábitos de vida puede prevenir el desarrollo de estas enfermedades, en la práctica esto no se ha logrado [45]. Por ejemplo y en relación a la obesidad, 1 de cada 210 hombres y 1 de cada 124 mujeres con un índice de masa corporal de 30-35  $\text{Kg/m}^2$  logra alcanzar un peso normal, mientras que si el índice de masa corporal es de 40-45  $\text{Kg/m}^2$  la proporción de personas que alcanza un peso normal es de 1 de cada 1290 en hombres y 1 de cada 677 mujeres.

Por tanto, son necesarios la prevención y/o el tratamiento mediante intervenciones farmacológicas (que hoy en día involucran terapias multi-fármacos con los problemas de cumplimiento, interacciones entre los diferentes fármacos, costos, etc.).

Diferentes estrategias terapéuticas para disminuir la mortalidad cardiovascular se han venido utilizando en la prevención secundaria, es decir en pacientes que ya han sufrido una complicación aterosclerótica (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico,



etc.). Estas son la terapia anti-plaquetaria con el uso de aspirina o un análogo, la terapia antihipertensiva con el uso de  $\beta$ -bloqueantes e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o inhibidores del receptor de esta hormona (ARA) junto con la terapia hipocolesterolemizante como ser el uso de estatinas. Esta asociación de fármacos ha logrado disminuir de manera muy significativa la mortalidad cardiovascular e incrementar la expectativa de vida de los pacientes que sufren este conjunto de enfermedades.

Por otro lado, nitratos orgánicos como el dinitrato de isosorbide y nitroglicerina se utilizan para el tratamiento sintomático del angor (dolor cardíaco producido por isquemia). Estos compuestos son vasodilatadores muy eficientes que calman los síntomas, sin embargo, no mostraron resultados positivos en eventos cardiovasculares mayores (mortalidad, infartos etc.) [214].

La mayoría de las intervenciones farmacológicas actuales diseñadas para retrasar la progresión de la aterosclerosis se centran casi exclusivamente en la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol LDL, siendo las estatinas los principales agentes terapéuticos utilizados. Los resultados beneficiosos de la terapia con estatinas se relacionan principalmente con una reducción en los niveles plasmáticos de colesterol. Sin embargo, algunos autores plantean que otros efectos benéficos de estos fármacos estarían relacionados a la inhibición de la inflamación crónica que subyace a la patogenia de estas enfermedades [215-219]. Sin embargo, no fue hasta la publicación del estudio CANTOS (del inglés "Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study") en agosto de 2017, que se pudo demostrar que la reducción de la inflamación vascular en ausencia de la disminución plasmática de lípidos es capaz *per se* de reducir las tasas de futuros eventos cardiovasculares. Por tanto la hipótesis inflamatoria de la aterotrombosis todavía no se había probado. En el estudio de CANTOS se evaluó si la reducción de la inflamación mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-IL 1 $\beta$ , el Canakinumab, en hombres y mujeres que habían sufrido un evento coronario previo (prevención secundaria) y que permanecían en alto riesgo debido a una elevación persistente del biomarcador inflamatorio CRP; podía reducir el riesgo de que ocurra otro evento cardiovascular en el futuro [220]. El estudio se llevó a cabo durante 48 meses en más de 40 países de todo el mundo con más de 10.000 pacientes. Se demostró que la terapia anti-inflamatoria bloqueando la acción de la IL-1 $\beta$  con el Canakinumab,

en comparación con el placebo, llevó a una tasa significativamente menor de eventos cardiovasculares recurrentes, sin reducir los niveles de LDL-colesterol [220]. ***Por lo tanto y por primera vez, con este estudio se demostró la importancia o el rol principal que la inflamación juega en la patología de la aterosclerosis, impulsando la búsqueda de estrategias farmacológicas que bloqueen los procesos inflamatorios involucrados en la patogenia de la misma.***

En otro ensayo clínico donde también se bloqueó la acción de la IL-1 $\beta$  a través del tratamiento con un antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  (Anakinra), en pacientes con diabetes tipo 2, se demostró una mejora en la glicemia y en el perfil metabólico, en la función secretoria de las células beta del páncreas y reducción de marcadores sistémicos de inflamación (IL-6 y CRP) [221]. ***En suma, estos dos estudios mencionados anteriormente, en los cuales a través de diferentes mecanismos, se logra inhibir la ruta de la IL-1 $\beta$ , demuestran el rol que la inflamación crónica tiene en la patogenia de enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes tipo 2 y la aterosclerosis.*** Estas evidencias sugieren que el atacar la inflamación crónica de bajo ruido, subclínica, es una estrategia muy valiosa para el tratamiento de las ECNT, altamente relacionadas entre sí. Sin embargo, la terapia con anti-inflamatorios de uso tradicional (AINE) no ha resultado eficiente a la hora de prevenir o revertir la evolución de las enfermedades cardiovasculares y/o metabólicas (obesidad y diabetes tipo 2). ***Por este motivo, el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios no convencionales, capaces de inhibir las rutas involucradas en la generación de los procesos inflamatorios crónicos no regulados, en particular los mediados por la activación del factor de transcripción pro-inflamatorio NF $\kappa$ B y del inflammasoma NLRP3 y que cursan de manera subclínica, resulta de fundamental importancia.***

## II) HIPÓTESIS

## II) HIPÓTESIS.

Teniendo en cuenta que el metabolismo del  $\alpha$ -tocoferol está intrínsecamente relacionado al de las lipoproteínas y en particular al de las LDL, y que éstas tienen un rol patogénico fundamental en la aterosclerosis, hipotetizamos que la modificación de la estructura del  $\alpha$ -tocoferol ya sea a través de la adición de un grupo anti-inflamatorio (nitroalqueno) o de un grupo liberador de óxido nítrico (nitrato orgánico), haría que estos nuevos compuestos utilicen la partícula de LDL como un transportador hacia los sitios de las lesiones ateroscleróticas, donde éstos podrán ejercer los efectos anti-inflamatorios y anti-aterogénicos de los nitroalquenos o del óxido nítrico, enlenteciendo o retardando el progreso de la enfermedad.

Para ello se diseñaron y sintetizaron dos series de compuestos híbridos formados por una estructura mimética del  $\alpha$ -tocoferol (principal componente de la vitamina E) y conteniendo: un grupo funcional con propiedades principalmente anti-inflamatorias (nitroalqueno, serie 1, figura 18) ó un grupo funcional liberador de óxido nítrico (nitrooxilo, serie 2, figura 18).

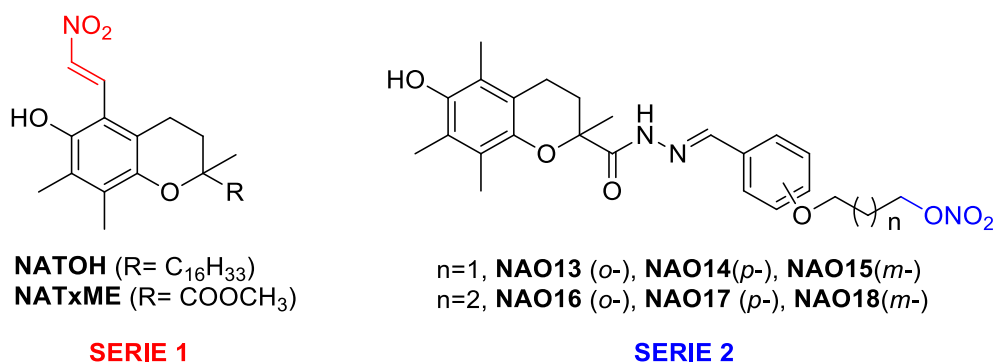


Figura 18. Análogos de  $\alpha$ -tocoferol diseñados como potenciales agentes anti-aterogénicos.

## **III) OBJETIVOS**

### III) OBJETIVO GENERAL.

*Diseño, síntesis, caracterización fisicoquímica, evaluación biológica y estudios preclínicos de dos series de compuestos híbridos miméticos del  $\alpha$ -tocoferol para la prevención y tratamiento de ECV*

#### 3.1) Objetivos específicos para la serie 1.

- 3.1.1) Diseño y síntesis de los nitroalquenos análogos de  $\alpha$ -tocoferol.
- 3.1.2) Caracterización fisicoquímica de los nitroalquenos análogos de  $\alpha$ -tocoferol.
- 3.1.3) Estudio de las propiedades biológicas y posibles blancos moleculares modulados por los compuestos híbridos *in vitro*.
- 3.1.4) Estudio de los efectos *in vivo* de los nitroalquenos análogos de  $\alpha$ -tocoferol.

#### 3.2) Objetivos específicos para la serie 2

- 3.2.1) Caracterización fisicoquímica de tocoferol-miméticos dadores de óxido nítrico de la serie 2.
  - a) Desarrollo de técnicas analíticas para la determinación de análogos de  $\alpha$ -tocoferol liberadores de óxido nítrico disponibles en el grupo de investigación.
  - b) Estudios de estabilidad en distintos medios de importancia biológica: buffers a distintos pH y plasma.
  - c) Estudios de incorporación en lipoproteínas plasmáticas.
- 3.2.2) Evaluación biológica *in vivo* en un modelo animal de hipertensión arterial

## **IV) RESULTADOS**

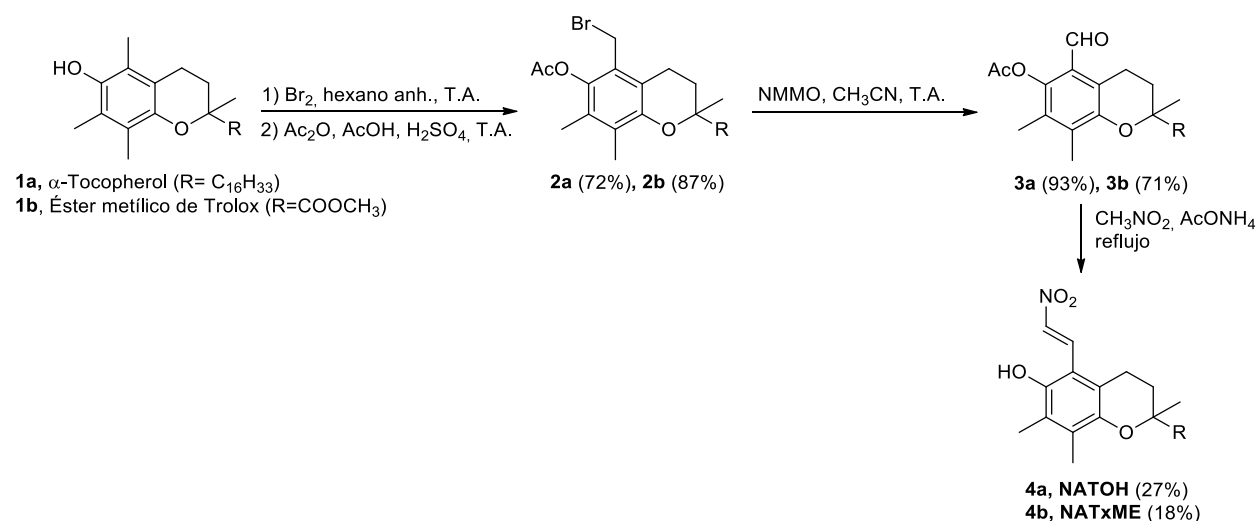
## **4.1) Resultados Serie 1**



Dado el recientemente descubierto del rol que tiene la inflamación crónica y estéril en el desarrollo de la aterosclerosis, nos propusimos desarrollar una nueva estrategia farmacológica que involucró el diseño de dos compuestos híbridos análogos del tocoferol a los que les incorporamos en su estructura un grupo nitroalquenilo, con probadas propiedades anti-inflamatorias.

#### 4.1.1) SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE $\alpha$ -TOCOFEROL-NITROALQUENO: NATOH Y NATxME.

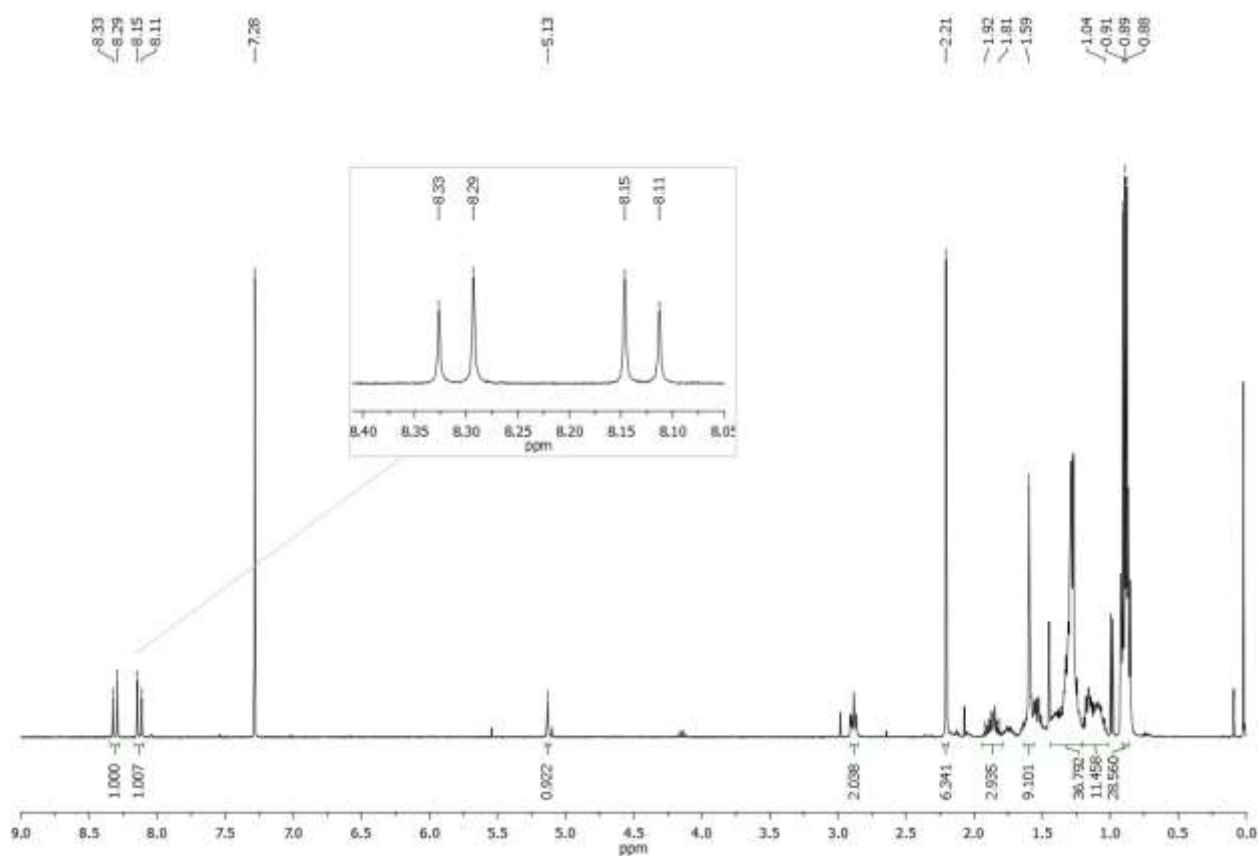
En ambos compuestos, el grupo nitroalquenilo se encuentra en la posición 5 del anillo de cromano del  $\alpha$ -tocoferol (**1a**) o en su análogo hidrosoluble, el éster metílico de Trolox ( 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxilato de metilo) (**1b**), obtenido como se describe en la literatura [222]. La ruta sintética mediante la cual se obtuvieron estos derivados se representa en la figura 19. El  $\alpha$ -tocoferol o el derivado de Trolox se transformaron en el correspondiente derivado bromoacetato mediante tratamiento con bromo seguido de O-acetilación. Luego, la oxidación del derivado 6-O-acetil-5a-bromo (**2**) con N-óxido de N-metilmorfolina produce el correspondiente aldehído (**3**) [223, 224]. Finalmente, la condensación de (**3**) con nitrometano en presencia de acetato de amonio, produce el nitroalqueno deseado (NATOH, **4a**) o (NATxME, **4b**) [225] (figura 19).



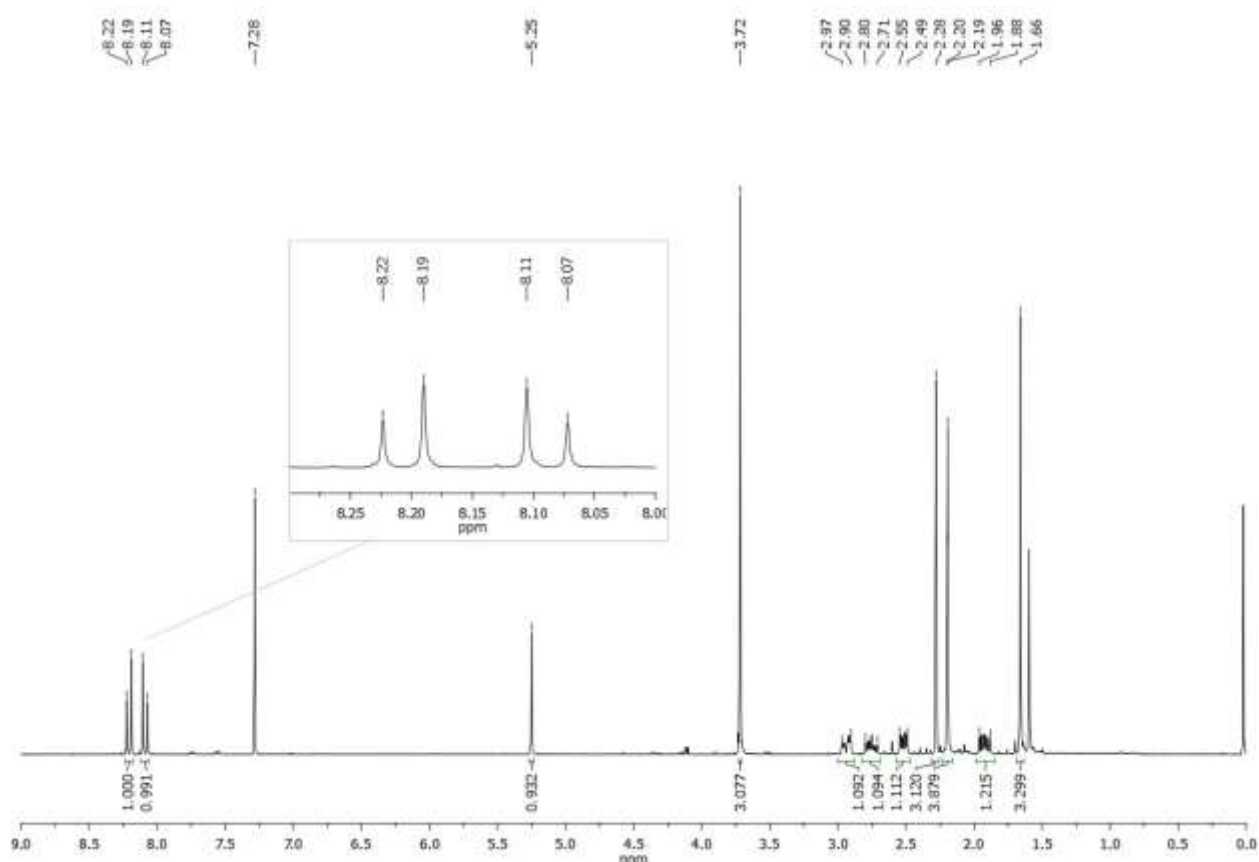
**Figura 19. Síntesis del NATOH y NATxME.** El  $\alpha$ -tocoferol o el éster metílico de Trolox se transforman en el correspondiente derivado bromoacetato por tratamiento con bromo seguido de O-acetilación. La oxidación del bromoacetato con NMMO produce el aldehído correspondiente. El tratamiento de este compuesto con nitrometano en presencia de acetato de amonio proporciona los productos de interés.

Los compuestos intermedios y finales fueron caracterizados por  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN y espectros bidimensionales necesarios para la completa elucidación estructural (COSY, HSQC, HMBC). Los productos finales además fueron analizados por espectrometría de masa de alta resolución. La figura 20 muestra el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del nitroalqueno derivado de tocoferol, NATOH, en donde se puede evidenciar la presencia de todos los protones correspondientes a su estructura. En particular es fácil notar las señales de los protones del grupo nitroalquenilo como dobletes a 8.31 y 8.14 ppm cuya constante de acoplamiento de 13.4 Hz lo que evidencia la presencia del isómero *E*.

En la figura 21 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del nitroalqueno derivado del éster metílico de Trolox, NATxME, donde se observan claramente las señales correspondientes a su estructura. Los protones del grupo nitroalquenilo se observan como dobletes a 8.21 y 8.09 con una constante de acoplamiento de 12.0 Hz lo que confirma la presencia del isómero *E*.



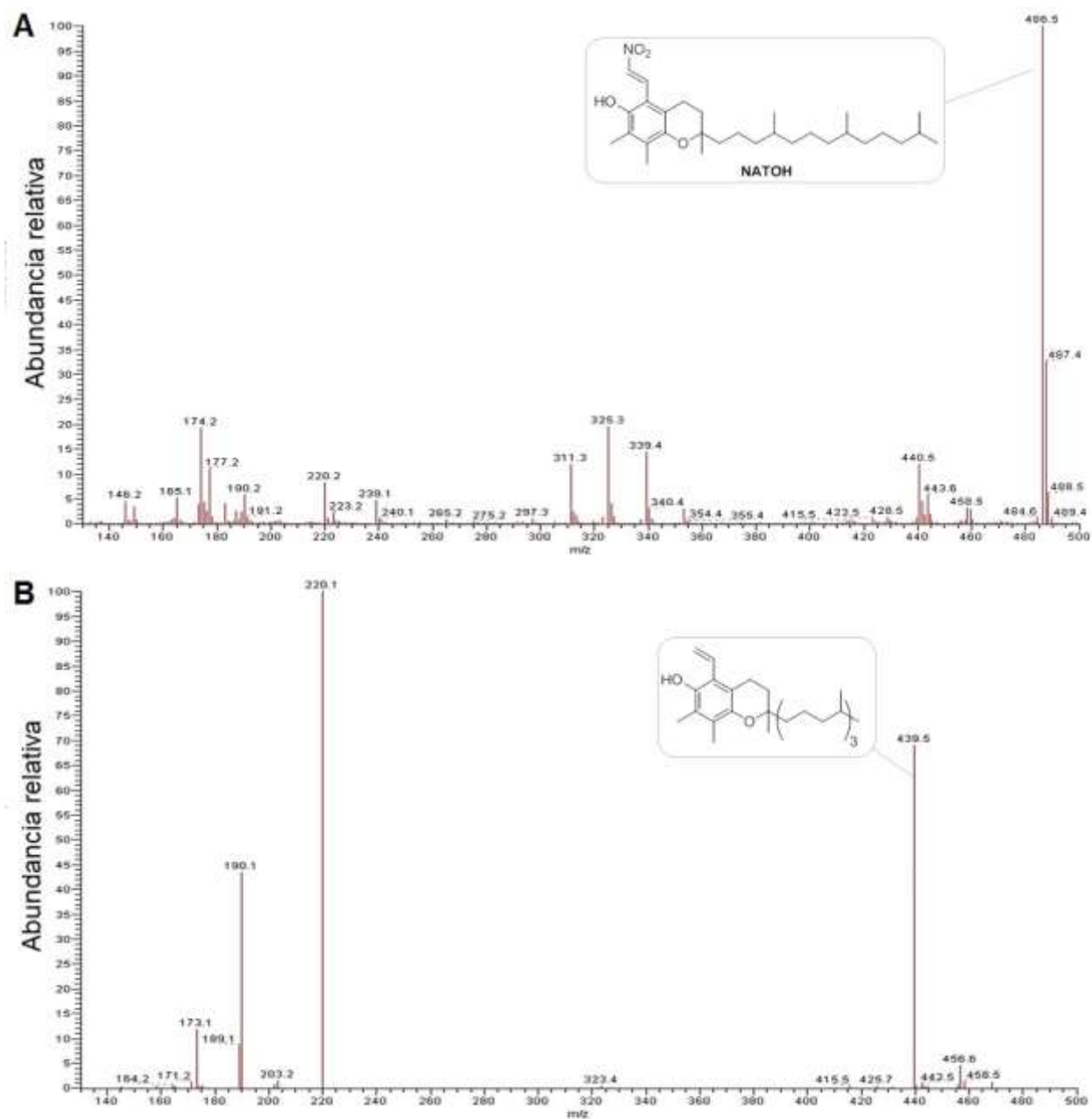
**Figura 20. Espectro de  $^1\text{H}$ NMR del NATOH.** En el inserto se muestra una ampliación de las señales correspondientes al grupo nitroalquenilo característicos de este compuesto.



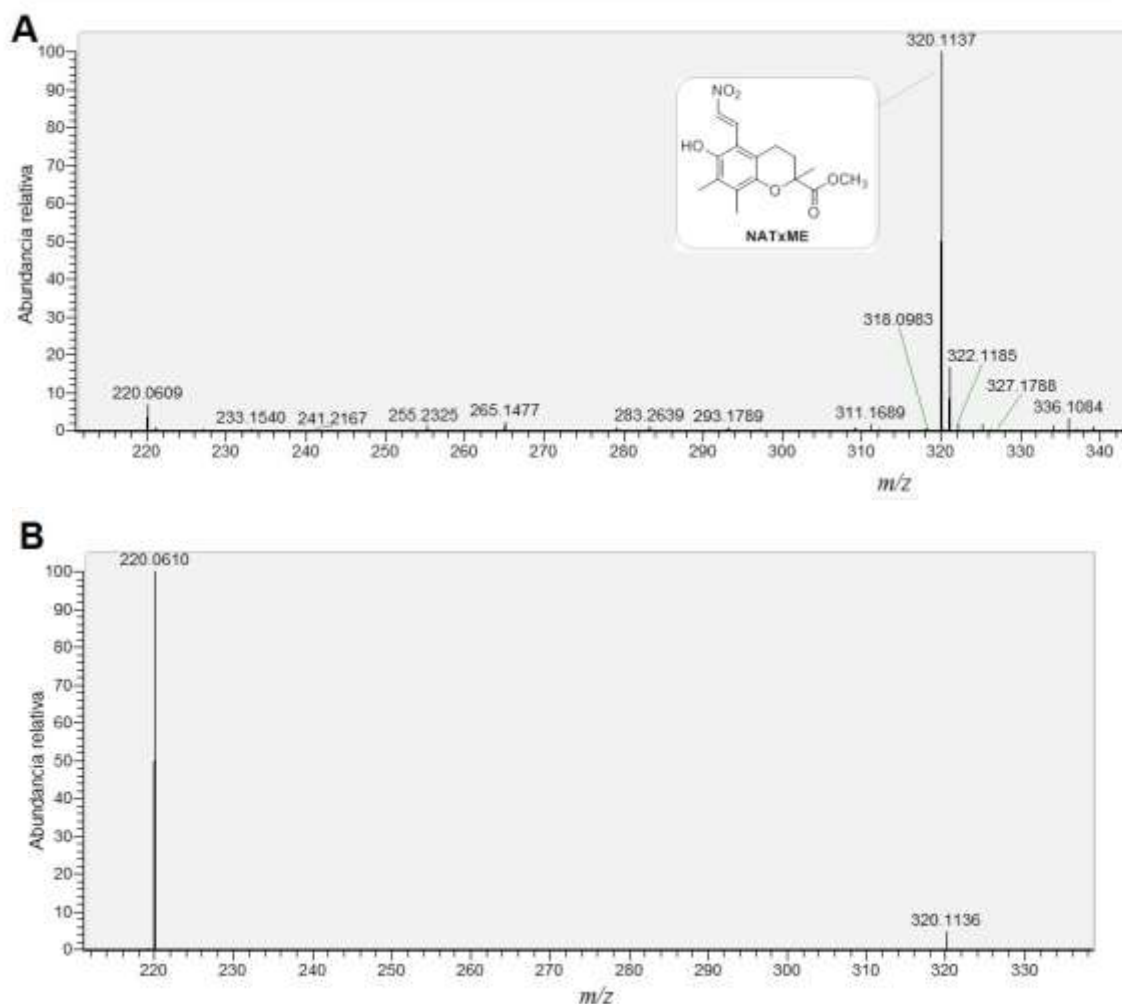
**Figura 21.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR del NATxME. el inserto se muestra una ampliación de las señales correspondientes al grupo nitroalqueno.

Asimismo, los compuestos se inyectaron directamente en un espectrómetro de masa ORBITRAP Q-Exactive o LTQ XL ESI (Thermo). La relación  $m/z$  calculado para NATOH  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  es de 486.3589, mientras que el encontrado fue de 486.5 (figura 22A). Es importante destacar que el espectro de masa de este compuesto fue adquirido en un espectrómetro de masa de tipo trampa iónica lineal de alta sensibilidad, pero no de alta resolución. Por tanto, en este caso la confirmación de la identidad del compuesto viene más de los experimentos de fragmentación ( $m_s/m_s$ ) que de la exactitud de la masa del ion parental. Para el caso de NATxME el  $m/z$  calculado de  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_6$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  fue de 320.1140, mientras que el encontrado en el espectrómetro de alta resolución fue de 320.1137 (figura 23A). A ambos compuestos se le realizaron experimentos de espectrometría de masa en tándem a fin de obtener los patrones de fragmentación característica de cada uno de los compuestos, y así obtener herramientas para poder detectar estos

compuestos en diferentes matrices biológicas a través de la espectrometría de masa (figura 22B y 23B).



**Figura 22. Espectros de masa del NATOH en modo negativo en LTQ XL. A)** Espectro "full scan" de NATOH. **B)** Espectro de MS<sup>2</sup> de la señal a 486.5 del espectro mostrado en A). Ión molecular del NATOH: 487.37 Da.



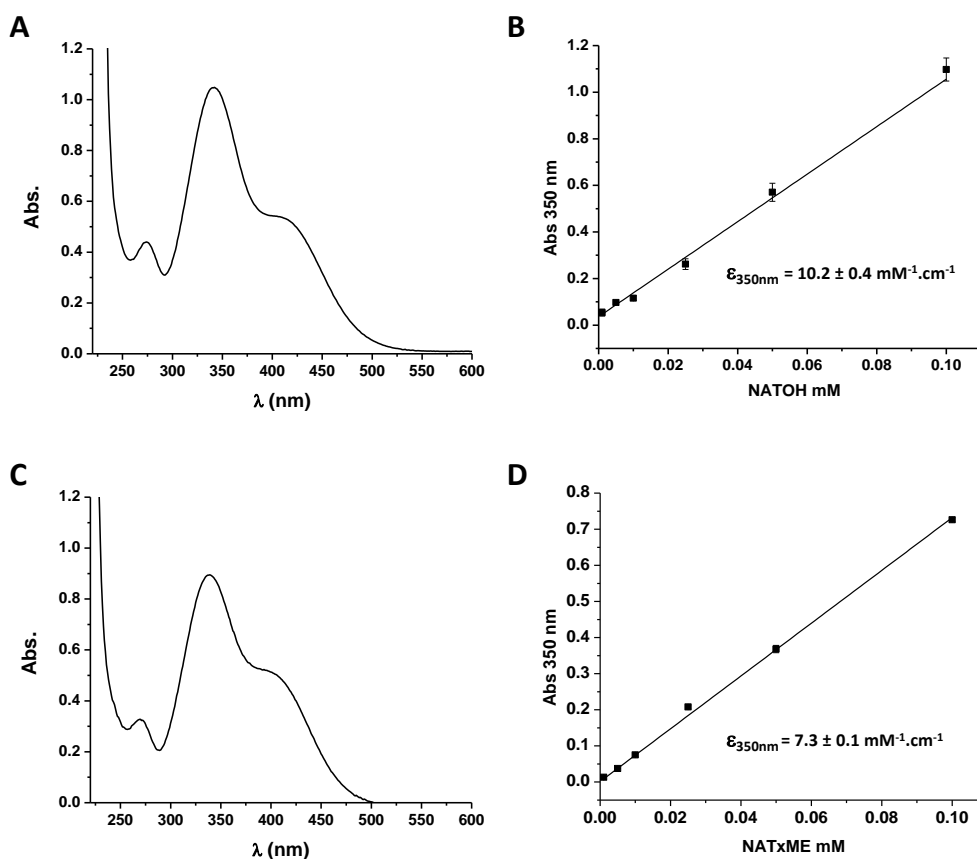
**Figura 23.** Espectros de masa del NATxME en modo negativo en orbitrap Q Exactive. **A)** Espectro "full scan". **B)** Espectro de MS<sup>2</sup> de la señal en 320.11 en espectro de A. Ión molecular del NATxME 321.11 Da.

#### 4.1.2) CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS NITROALQUENOS ANÁLOGOS DEL TOCOFEROL.

##### 4.1.2a) Análisis por espectrofotometría UV-Visible de los nitroalquenos análogos del tocoferol.

Para continuar profundizando en la caracterización de nuestros compuestos y teniendo en cuenta que lo usaremos en estudios posteriores, procedimos a analizarlos por espectrofotometría UV-Visible. En la figura 24 presentamos los espectros de absorbancia UV-Visible del NATOH y NATxME. Como puede observarse en la figura 24, ambos compuestos

presentan espectros muy característicos y similares con máximos a 420, 350 nm y 275 nm; y un mínimo a 290 nm. EL pico a 350 nm, que es donde ambos compuestos presentan mayor absorbancia, fue utilizado para determinar los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) en MeOH. Para el NATOH, el valor de  $\epsilon$  encontrado fue  $10 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y para el NATxME el  $\epsilon$  fue de  $7.3 \pm 0.1$  (figura 24).

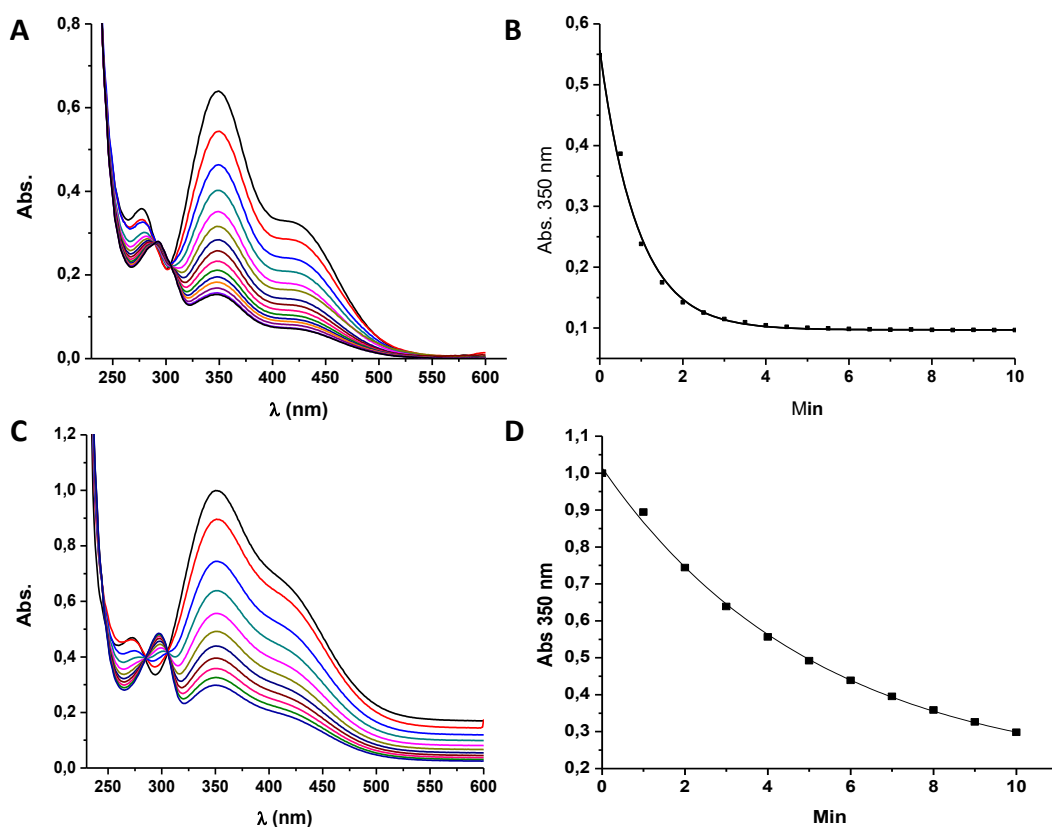


**Figura 24. A) Espectro UV-Visible de NATOH (100 $\mu\text{M}$ ) en metanol.** El inserto muestra la determinación del coeficiente de extinción molar a 350nm en metanol. **B) Espectro UV-Visible de NATxME (100 $\mu\text{M}$ ) en metanol.** El inserto muestra la determinación del coeficiente de extinción molar a 350nm en metanol.

#### 4.1.2b) Reactividad electrofílica de los nitroalquenos análogos del tocoferol.

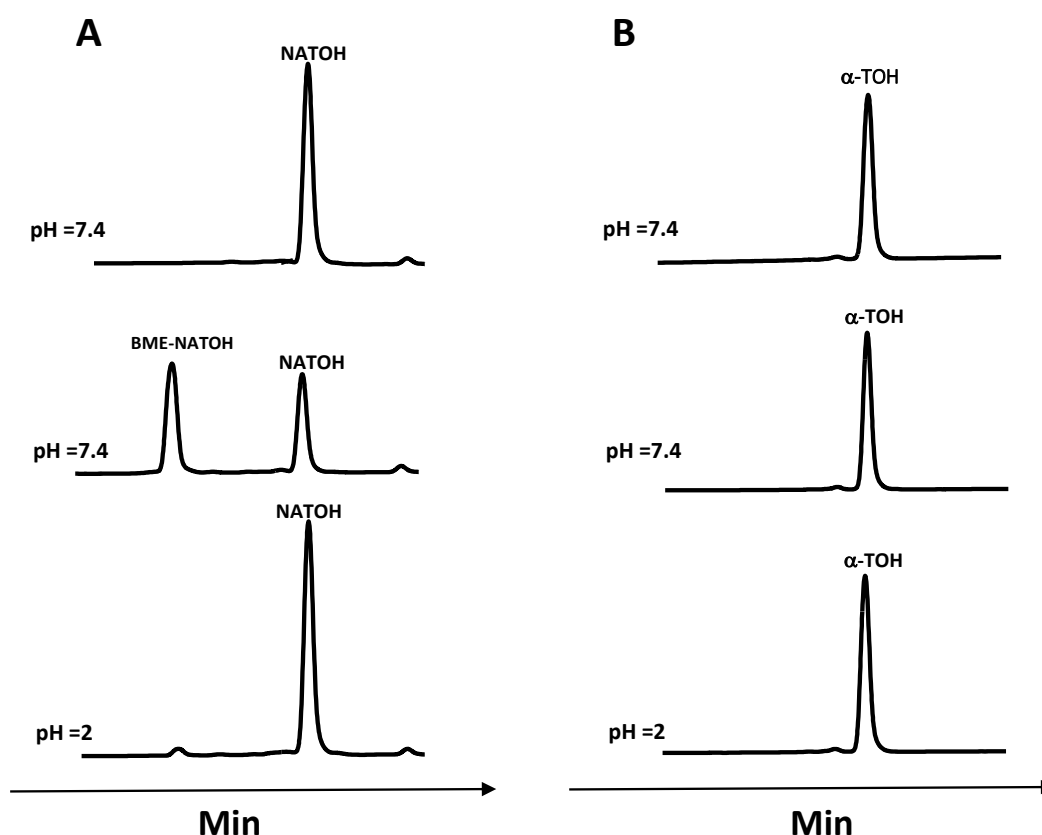
El modo de acción que explicaría la actividad biológica de los nitroalquenos es su capacidad de reaccionar con nucleófilos de bajo peso molecular o en proteínas, principalmente con tioles, a través de reacciones de adición de Michael [174, 226].

Para estudiar si la incorporación del grupo nitroalqueno al tocoferol o al éster metílico de Trolox, dotaba a los compuestos de propiedades electrofílicas, inicialmente analizamos la reactividad del NATOH y del NATxME con un nucleófilo modelo como el  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME). Para ello, incubamos los compuestos (100  $\mu$ M) con un exceso de  $\beta$ ME (1 mM; condiciones de pseudoprimer orden) y la reacción se controló espectrofotométricamente y por HPLC en fase reversa. La figura 25 muestra las medidas de absorbancia entre 200-600 nm a cada minuto durante los primeros 15 minutos de reacción entre los compuestos y el  $\beta$ ME. Allí se puede observar que hay cambios en la absorbancia a lo largo de todo el espectro, con formación de dos puntos isobésticos (292 nm y 275 nm). Globalmente, estos cambios sugieren que está teniendo lugar una reacción entre cada uno de nuestros compuestos y el  $\beta$ ME.



**Figura 25. Propiedades electrofílicas del NATOH y NATxME.** **A)** NATOH (100  $\mu$ M) disuelto en buffer fosfato (20mM) 1% de SDS pH 7,4 y se incubó con  $\beta$ ME 1 mM. Los espectros de la reacción se obtuvieron en el rango de 220-660 nm cada 60 s. Los escaneos mostrados fueron tomados cada 1 min, durante los primeros 15 min de reacción. **B)** Decaimiento exponencial de la reacción seguida a 350 nm. **C)** NATxME (100  $\mu$ M) disuelto en buffer fosfato 20mM pH 7.4 se incubó con  $\beta$ ME 1mM. Los espectros de la reacción se obtuvieron en el rango de 220-660 nm cada 60 s. Los escaneos mostrados fueron tomados cada 1 min, durante los primeros 15 min de reacción. **D)** Decaimiento exponencial de la reacción seguida a 350 nm.

Para continuar profundizando en el análisis de estas reacciones, nos propusimos analizar las mismas por HPLC en fase reversa ya que de esta manera podemos separar sustratos de productos. En la figura 26 mostramos la reacción del NATOH con el  $\beta$ ME seguida por HPLC de fase reversa y a distintos pH. En esta figura se puede observar que cuando se incubó al NATOH con  $\beta$ ME a pH 7.4 aparece un nuevo pico que es más hidrofílico (eluye antes que el NATOH en la columna de C18) y también se ve una disminución del pico correspondiente al del NATOH (figura 26A panel del medio vs. panel superior). Por otro lado, cuando la reacción se lleva a cabo a pH ácido, vemos que la reacción no ocurre (figura 34 A panel inferior), debido a que los grupos tioles de los nucleófilos están protonados quedando menos grupos tiolatos disponibles para los ataques nucleofílicos. La figura 34 B muestra que cuando se incubó  $\beta$ ME con  $\alpha$ -TOH, la reacción de adición no se da, ya que el  $\alpha$ -TOH no es un electrófilo.

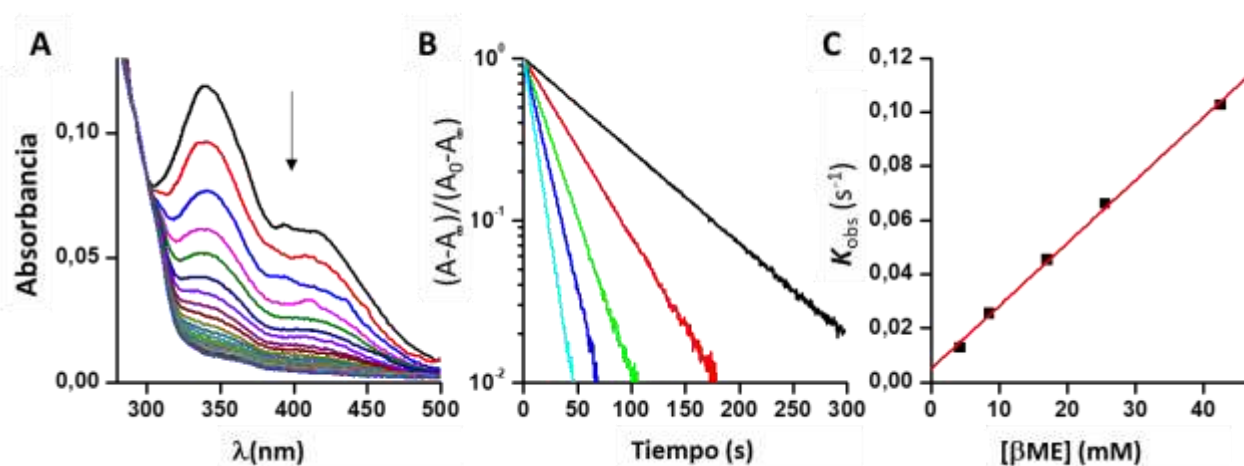


**Figura 26. Propiedades electrofílicas del NATOH.** **A)** Caracterización por HPLC en fase reversa de la reacción entre NATOH (10 nmol) y  $\beta$ ME (375 nmol) a pH 7,4 o 2,0 ( $\lambda = 295$  nm). **B)** idem para  $\alpha$ -TOH (10 nmol) y  $\beta$ ME (375 nmol).



#### 4.1.2c) Cinética de la reacción entre los nitroalquenos análogos del tocoferol y tioles de bajo peso molecular.

Para realizar la caracterización cinética de la adición de tioles de bajo peso molecular,  $\beta$ ME y GSH, a nuestros nitroalquenos sintéticos, tomamos en cuenta sus propiedades ópticas y sus solubilidades relativas en agua/disolventes apolares (partición). La reacción de adición interrumpe el cromóforo formado por el nitroalqueno conjugado con el cromano aromático, lo que conduce a una disminución dependiente de la dosis en la absorción UV-Visible (figura 25 y 27A). Esta disminución en la absorbancia se utilizó para controlar la reacción a  $\lambda_{\max}$  350 nm. La reacción es de primer orden para el nitroalqueno (figura 27B) y de primer orden para el tiol con una intersección distinta de cero (figura 27C), lo que implica una reacción reversible de la adición de Michael, como se esperaba [226].



**Figura 27. Reacción del NATOH con  $\beta$ ME en diferentes ambientes A)** cambio espectral tras la reacción de NATOH 10  $\mu\text{M}$  con  $\beta$ ME 0.1 mM en buffer TMA20 a pH 8.1 con 2.5 g/L de SDS. **B)** Gráficos de primer orden obtenidos a diferentes concentraciones de  $\beta$ ME medidos a 350 nm. **C)** Gráfico de segundo orden para el mismo experimento, parámetros de ajuste lineal  $k_f$  (pendiente) =  $2.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_r$  (intercepto) =  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

En la tabla 3 se muestran los valores de las constantes de 2<sup>do</sup> orden para la reacción entre los nitroalquenos análogos del tocoferol y los tioles de bajo peso molecular ( $\beta$ ME y GSH) en solución acuosa y en soluciones micelares usando distintos detergentes (aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y neutros). La tendencia esperada en las constantes de velocidad aparente de segundo orden es que las reacciones sean más rápidas en detergentes catiónicos que en los aniónicos. Por otro lado, en la solución acuosa neutra la tendencia esperada es que la reacción

sea más rápida con el GSH que con  $\beta$ ME, dado que GSH es más ácido que el  $\beta$ ME y, por lo tanto, va a haber una fracción más alta del tiolato disponible para la reacción. Esa tendencia se observa en ausencia de surfactantes con NATxME (tabla 3) y también con micelas catiónicas (CTAB) con el NATOH. Sin embargo, la tendencia está ausente en las micelas zwitteriónicas (CHAPS) y es revertida en las micelas neutras (Tritón X-100) y aniónicas (SDS) (tabla 3).

**Tabla 3. Constantes de velocidad de la adición nucleofílica de NATOH y NATxME a GSH y  $\beta$ -ME en suspensión micelar y solución acuosa.**

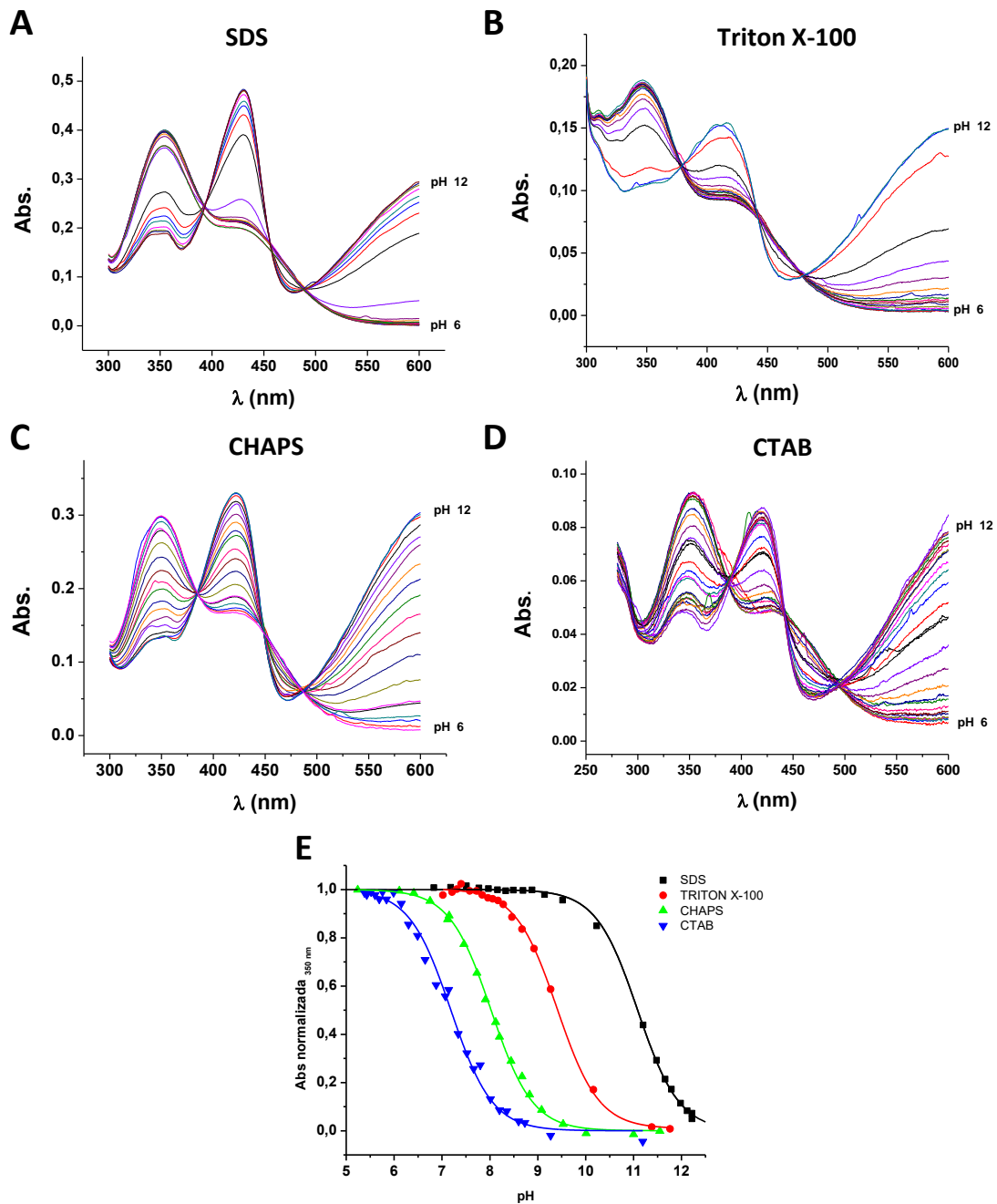
Surfactante	NATOH			
	Reactividad electrofílica			
	Tiol	pH	$k_f (M^{-1} s^{-1})$	$k_f (s^{-1})$
CTAB	GSH	7.1	576	0.36
	BME	7	343	0.13
CHAPS	GSH	6.7	34	$1.7 \times 10^{-2}$
		7.0	100	$4 \times 10^{-2}$
		7.3	148	$6.2 \times 10^{-2}$
	BME	6.9	53	$9.9 \times 10^{-3}$
		7.1	83	$1.5 \times 10^{-2}$
8.3	383	0.15		
Triton X-100	GSH	7.1	0.8	N.D.
	BME	7	6.5	$1.8 \times 10^{-3}$
SDS	GSH	7.2	0.2	
		7.5	0.63	$3 \times 10^{-4}$
	BME	7.8	1.0	$4.9 \times 10^{-4}$
		8.1	2.3	$5 \times 10^{-3}$
NATxME				
None	GSH	7.1	1370	N.D.
	BME	7.1	349	

Comparando la reacción del  $\beta$ ME con NATOH en CHAPS y con NATxME en solución acuosa, encontramos una disminución de cuatro veces en la constante de velocidad a pH 7.1. Si esta comparación se hace para las reacciones correspondientes con GSH, la constante de velocidad

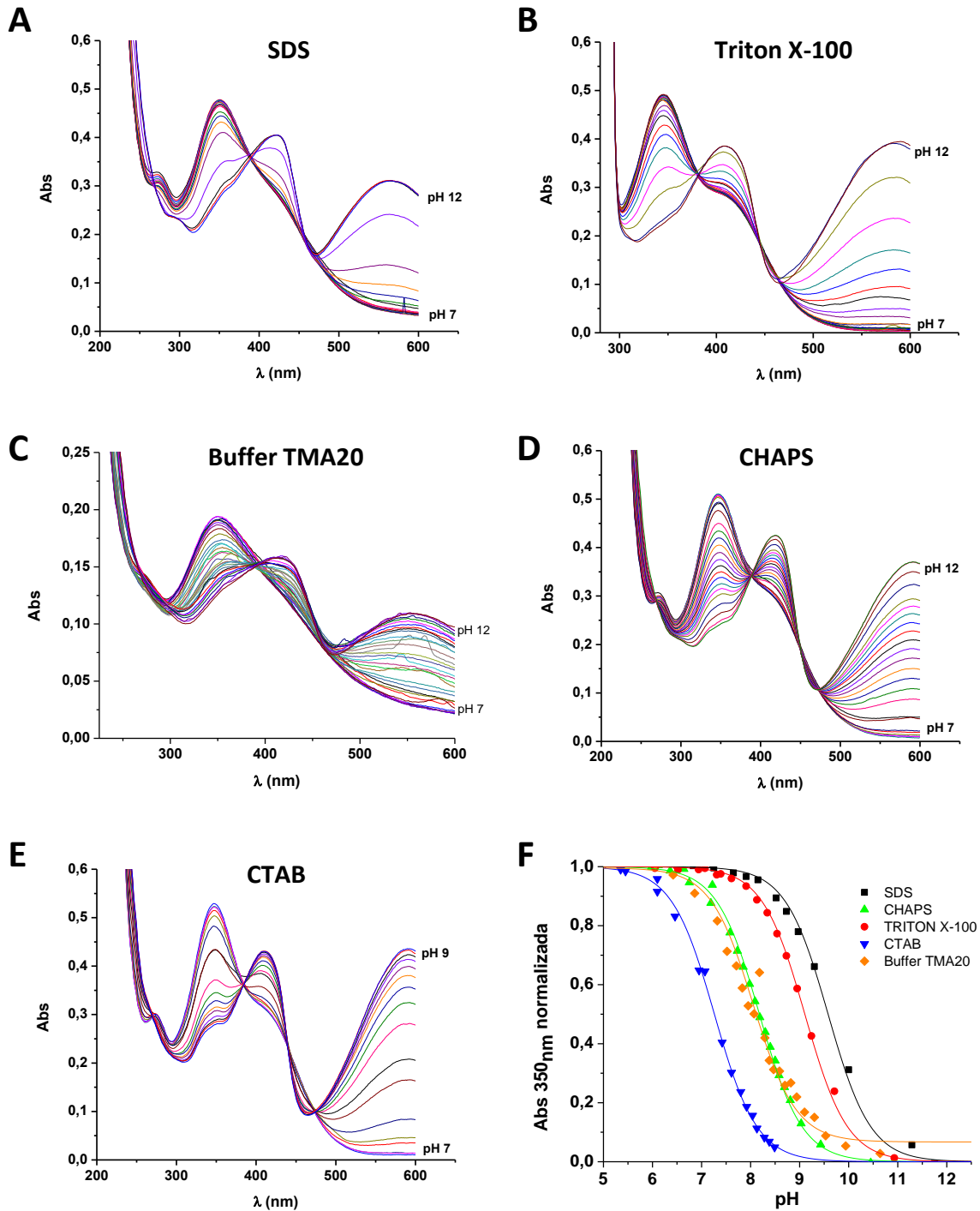
es más de diez veces menor en las micelas de CHAPS. La diferencia puede explicarse en términos de las cargas adicionales en el GSH que desestabilizan aún más su presencia en el núcleo hidrofóbico de las micelas. Además, las micelas neutras y aniónicas provocan una disminución adicional de dos a tres órdenes de magnitud en la constante de velocidad para la reacción del tiol con el NATOH y el NATxME, y en todos los casos, la disminución es más marcada para el GSH (tabla 3).

#### **4.1.2d) Determinación del $pK_a$ de los nitroalquenos análogos del tocoferol.**

Tanto en el NATOH como en NATxME, el cromóforo contiene un fenol ionizable, por lo que el equilibrio ácido-base del fenol también transmite un gran cambio en la absorbancia (figura 28 y 29). La titulación de ambos nitroalquenos permite la determinación de su  $pK_a$  aparente en los mismos sistemas micelares y, por lo tanto, refleja el pH tal como se percibe en el interior de la micela. Los valores de  $pK_a$  para NATOH abarcan un rango de 3.8 unidades con la tendencia de  $pK_a$  más ácido en micelas catiónicas (en CTAB) y menos ácidas en las micelas aniónicas (SDS) (figura 28). La tendencia es similar para NATxME pero dentro de un rango más estrecho de  $\sim 2.4$  unidades (figura 29). El  $pK_a$  de NATxME se determinó tanto en suspensión micelar como en solución acuosa en un intento de separar el efecto del pH aparente de los efectos de la partición de los nucleófilos y de la velocidad de reacción en sí misma. Observamos que el  $pK_a$  de NATxME en solución acuosa y en micelas de iones híbridos son esencialmente iguales y muy similares al  $pK_a$  de NATOH en las micelas zwitteriónicas (CHAPS); siendo los valores de 8.14, 8.18 y 8.0, respectivamente. Luego, y como primera aproximación, vimos que las micelas de CHAPS cancelan el efecto del pH de la superficie tal como lo percibe el nitroalqueno.



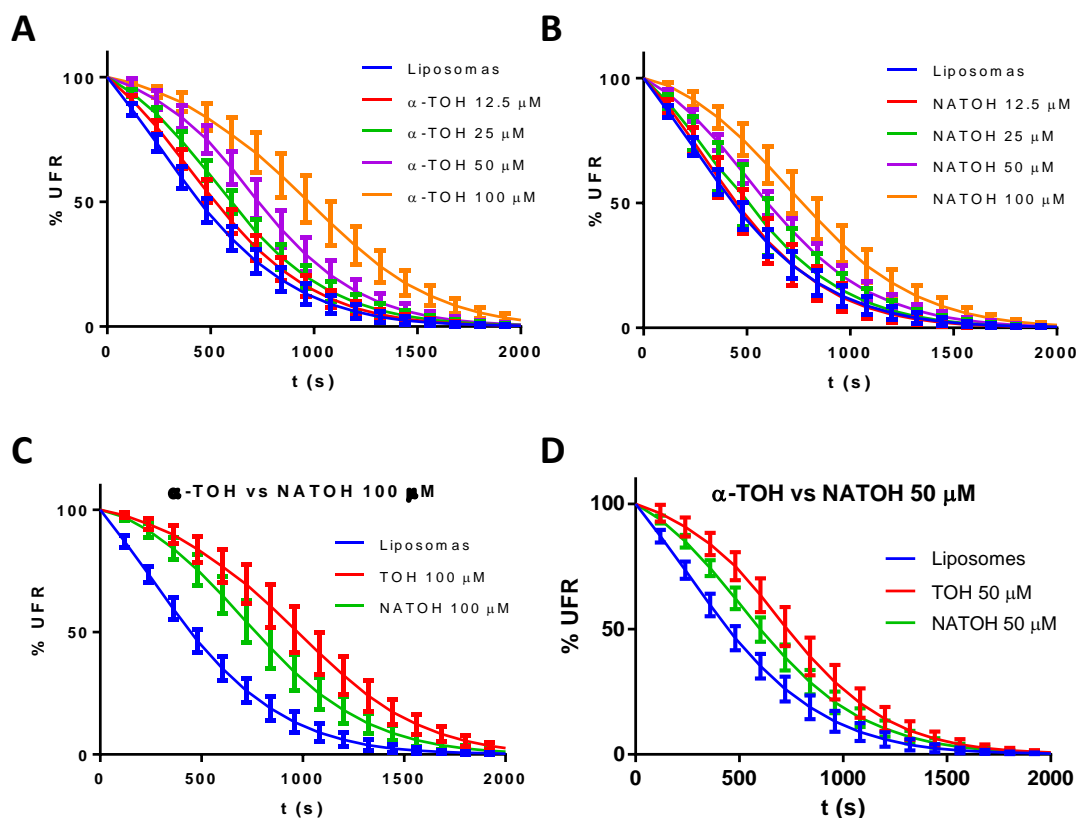
**Figura 28. Titulación de NATOH en solución con diferentes detergentes.** NATOH (30  $\mu$ M) en buffer TMA20 con diferentes detergentes fue titulado adicionando 5-10  $\mu$ L de NaOH y HCl 2M. **A)** SDS 0.25%; **B)** Triton X-100 1%; **C)** CHAPS 1%; **D)** CTAB 1%. **E)** Curvas de titulación de NATOH a 350 nm en buffer TMA20 con diferentes suspensiones micelares, de izquierda a derecha, CTAB, CHAPS, Triton X-100 y SDS. La absorbancia se normalizó a los valores ácidos y alcalinos extrapolados del ajuste. El  $pK_a$  fue determinado del ajuste sigmoidal del gráfico de Abs 350 vs pH.  $pK_a$  aparentes: SDS 11,08; Triton X-100 9,4; CHAPS 8,02; CTAB 7,18.



**Figura 29. Titulación de NATxME en solución acuosa con o sin diferentes detergentes.** NATxME (30  $\mu$ M) en buffer TMA20 con o sin detergentes fue titulado adicionando 5-10  $\mu$ L de NaOH y HCl 2M. **A)** TMA20 buffer; **B)** SDS 0.25%; **C)** Triton X-100 1%; **D)** CHAPS 1%; **E)** CTAB 1%. **F)** Curvas de titulación de NATxME a 350 nm en buffer TMA20 y en diferentes suspensiones micelares, de izquierda a derecha, CTAB, TMA20 buffer, CHAPS, Triton X-100 y SDS. El  $pK_a$  fue determinado del ajuste sigmoideal del gráfico de Abs 350 vs pH.  $pK_a$  aparentes: CTAB: 7.3; TMA buffer: 7.96; CHAPS: 8.18; Triton X-100: 9.1; SDS: 9.58.

#### 4.1.2e) Análisis de las propiedades antioxidantes del NATOH.

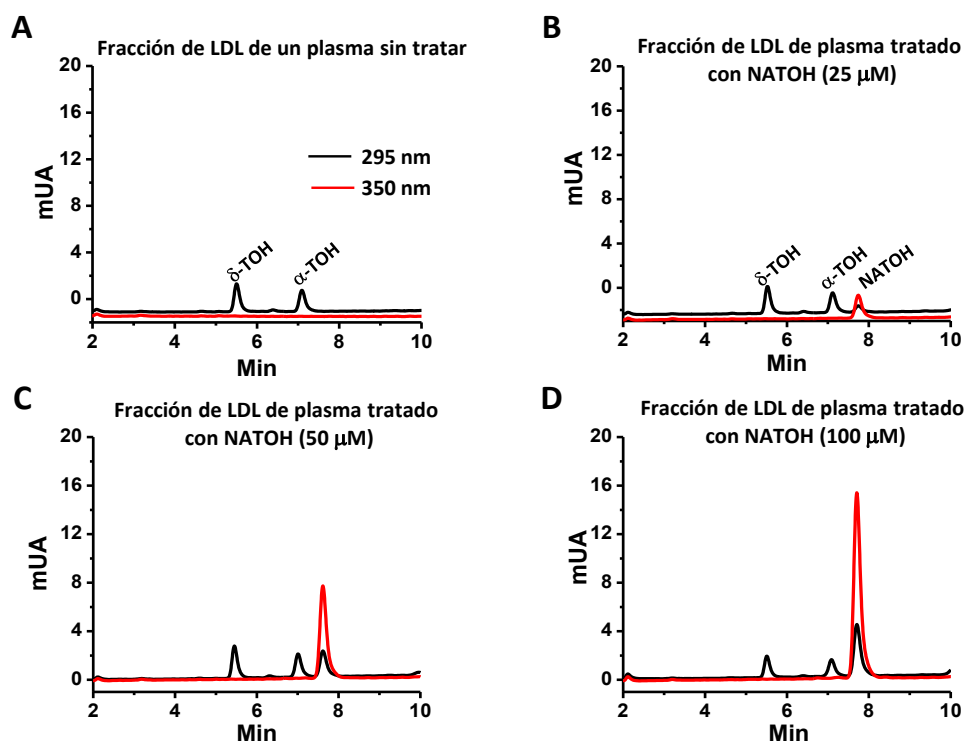
Con el objetivo de analizar si la presencia del grupo nitroalquenilo podía modificar las propiedades antioxidantes del  $\alpha$ -tocoferol, decidimos estudiar la capacidad antioxidante del NATOH con respecto a la del  $\alpha$ -TOH. Para ello incubamos al NATOH y al  $\alpha$ -TOH (12.5-100 $\mu$ M) incorporados en liposomas (POPC:POPG, 200  $\mu$ M) con fluoresceína (1 $\mu$ M) y luego con el generador de radicales libres AAPH (50 mg/mL). La reacción se siguió por fluorescencia y se determinó para cada concentración de NATOH los equivalentes de  $\alpha$ -TOH correspondientes. La figura 30 muestra la comparación de la capacidad antioxidante de NATOH vs. la del  $\alpha$ -TOH a 50 y 100 $\mu$ M. De estas curvas se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad antioxidante del NATOH y la del  $\alpha$ -TOH.



**Figura 30. Capacidad antioxidante del NATOH.** Alfa-TOH (A) y NATOH (B) (12.5-100  $\mu$ M) en liposomas se incubó con fluoresceína (1  $\mu$ M) en buffer fosfato (20 mM) pH 7,4, SDS al 1% durante 30 min a 37°C. Luego la mezcla se incubó con AAPH y la capacidad antioxidante se midió mediante la técnica ORAC con un ensayo fluorimétrico usando  $\lambda_{ex} = 485$  nm y  $\lambda_{em} = 518$  nm. C) y D) Comparación de la capacidad antioxidante de  $\alpha$ -TOH vs NATOH a 50 y 100  $\mu$ M, respectivamente.

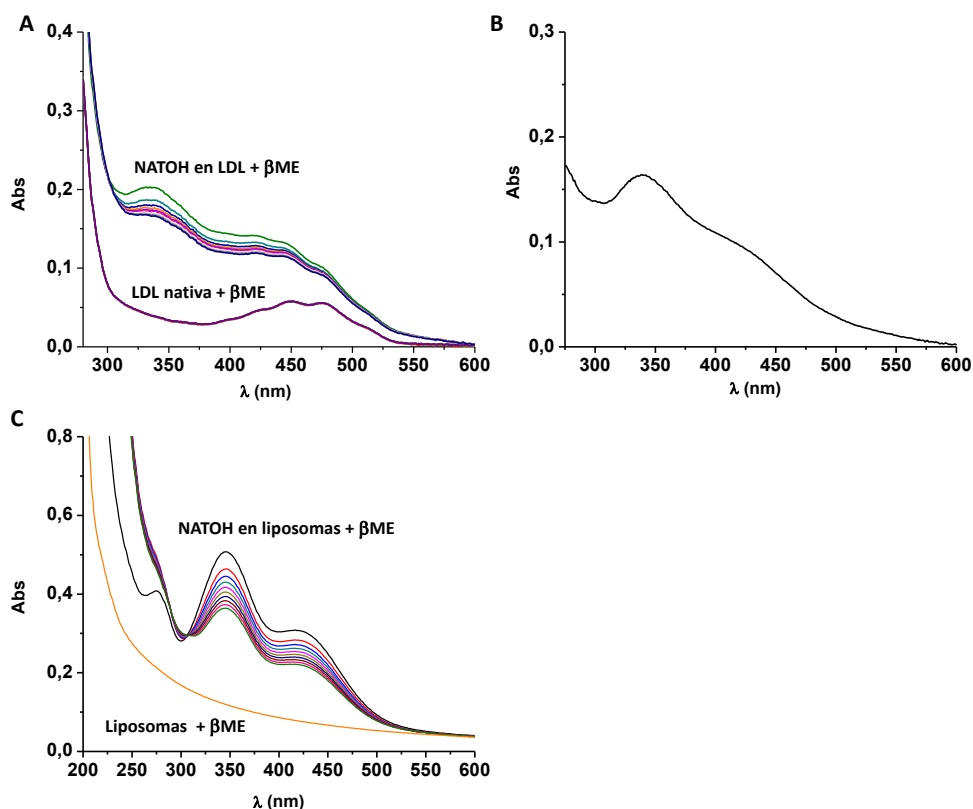
#### 4.1.2f) Incorporación del NATOH a lipoproteínas.

Como primera aproximación para evaluar cómo la modificación de la estructura del cromanol del  $\alpha$ -TOH en el NATOH puede afectar su incorporación a las lipoproteínas, incubamos plasma humano con diferentes concentraciones de NATOH durante 6 horas a 37 °C, siguiendo el protocolo utilizado para aumentar el contenido de  $\alpha$ -TOH en la LDL humana *ex vivo* [227]. Luego se purificó la fracción de LDL mediante ultracentrifugación en gradiente KBr [228] y posteriormente se extrajeron con metanol [227, 229]. La presencia de NATOH y  $\alpha$ -TOH endógeno en el sobrenadante se estudiaron mediante análisis por HPLC en fase reversa (figura 31) [227, 229]. En la figura 31 se muestra la incorporación dosis-dependiente del NATOH a las LDL humanas *ex-vivo*. Como puede verse en el panel C, cuando la LDL humana se incuba con una concentración de NATOH de 50  $\mu$ M, la concentración del mismo en la LDL es de similar orden de magnitud que la del  $\alpha$ -TOH endógeno.



**Figura 31. Incorporación de NATOH en lipoproteínas humanas (A-D).** El plasma humano se trató con NATOH (25, 50 o 100  $\mu$ M) durante 6 horas a 37°C y se aisló la fracción de lipoproteína LDL y se extrajo con metanol (9:1, v:v) después de una ultracentrifugación en gradiente de KBr. El control se realizó con plasma no tratado. Las muestras se analizaron mediante RP-HPLC usando  $\delta$ -TOH como patrón interno. En todos los paneles, la línea negra indica la absorbancia a 295 nm y la línea roja la absorbancia a 350 nm.

Además, se tomaron las fracciones de LDL de plasma sin tratar o tratado con NATOH, y se incubaron con un exceso de  $\beta$ ME y la reacción se siguió por espectroscopia UV-Visible. La figura 32A muestra los espectros de las diferentes fracciones de LDL incubadas con  $\beta$ ME. Cuando la fracción de LDL nativa se incubaba con  $\beta$ ME, no hay cambios significativos en el espectro de la LDL (figura 32A). Sin embargo, cuando las fracciones de LDL cargadas con NATOH (figura 32B, espectro diferencial entre la LDL c/NATOH y la LDL nativa) se incuban con  $\beta$ ME, se observan cambios importantes en el espectro, compatibles con la reacción entre el NATOH y el  $\beta$ ME (figura 32A). Más aun, cuando el NATOH se incorpora a liposomas, también se observa una reacción con  $\beta$ ME (figura 32C). En general, estos resultados son de particular importancia ya que sugieren que el grupo nitroalquenilo es capaz de reaccionar como un electrófilo dentro de las LDL o de liposomas.



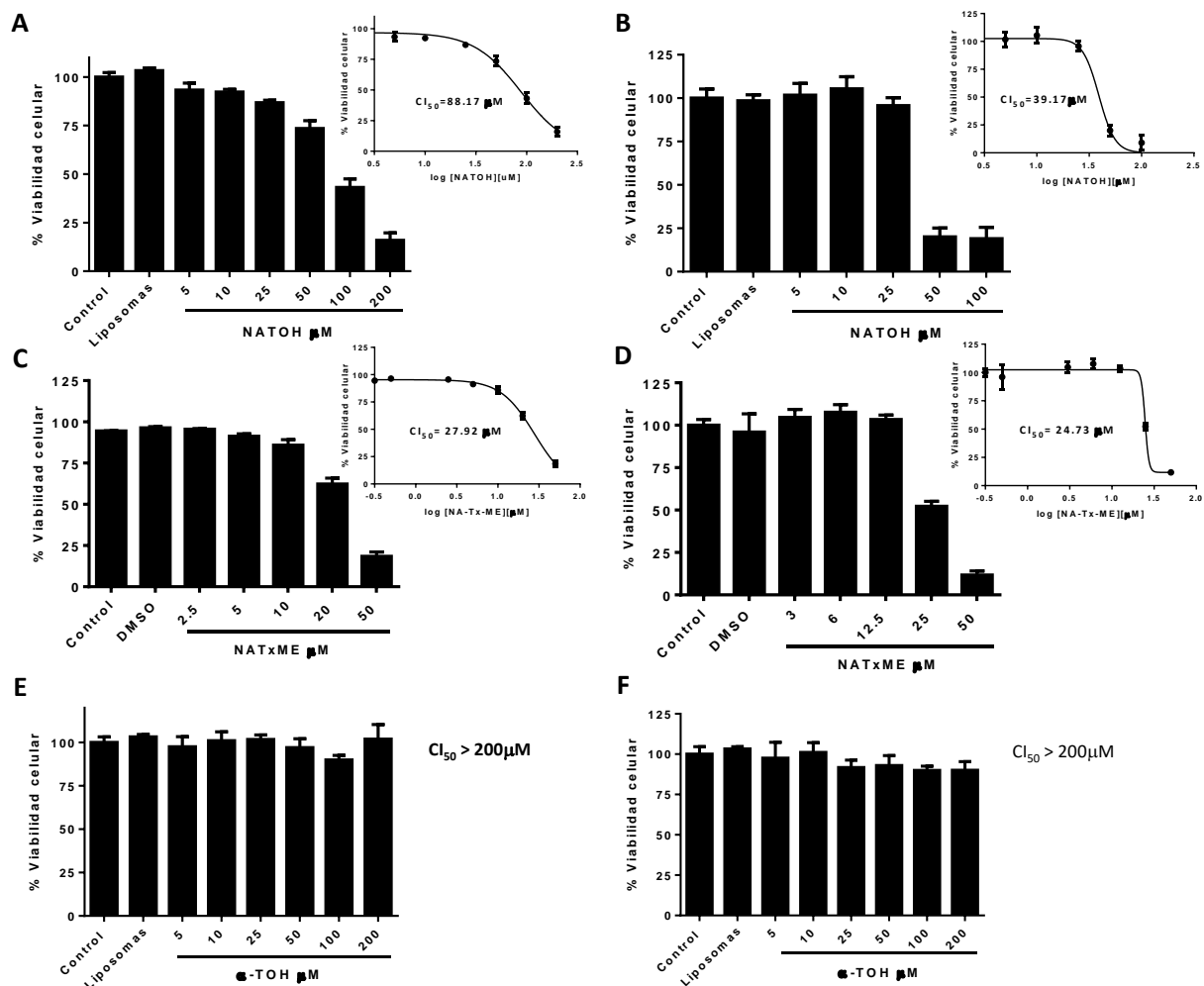
**Figura 32. Propiedades electrofílicas del NATOH en LDL humana o en liposomas. A)** Fracción de LDL humana obtenida de plasma incubado con NATOH (100  $\mu$ M) se incubó con BME (1mM) y la reacción se siguió por espectrofotometría UV-Visible **B)** Espectro diferencial de las fracciones de LDL incorporada con NATOH y LDL nativa. **C)** Reacción del NATOH (50 $\mu$ M) incorporado en liposomas POPG:POPC (7:3 200 $\mu$ M) y BME (1mM) seguida por espectrofotometría UV-Visible.



### 4.1.3) ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* Y POSIBLES BLANCOS MOLECULARES MODULADOS POR LOS NITROALQUENOS ANÁLOGOS DEL TOCOFEROL.

#### 4.1.3a) Citotoxicidad de los nitroalquenos análogos del tocoferol.

Para comenzar a estudiar los efectos biológicos de los nitroalquenos análogos del tocoferol, primero se realizaron ensayos de citotoxicidad para determinar la  $IC_{50}$  (concentración que reduce en un 50% la absorbancia control a 570 nm) en macrófagos humanos THP-1 y murinos RAW 264.7.



**Figura 33. Viabilidad celular del NATOH, NATxME y  $\alpha$ -TOH en macrófagos.** Células THP-1 (A, C y E) y RAW 264.7 (B, D y F) fueron incubadas con NATOH (A y B), con NATxME (C y D) o con  $\alpha$ -TOH (E y F) durante 24 h. Posteriormente la viabilidad celular fue medida por el ensayo de MTT. Los insertos de los paneles muestran el ajuste sigmoideal de la dosis respuesta. Los resultados se expresan como  $CI_{50}$  (concentración que reduce en un 50% la absorbancia del grupo control a 570 nm).

Utilizamos como modelo celular a los macrófagos, ya que son una de las células más importantes involucradas en la patogénesis de la aterosclerosis [230]. En la figura 33 se muestra los resultados de citotoxicidad. Para el caso del NATOH la  $Cl_{50}$  en macrófagos THP-1 es de 88  $\mu$ M y en RAW 264.7 es de 39  $\mu$ M. Para el NATxME la  $Cl_{50}$  en THP-1 fue de 28  $\mu$ M, mientras que en macrófagos RAW 264.7 fue de 25  $\mu$ M. En el caso del  $\alpha$ -TOH la  $Cl_{50}$  en ambos tipos celulares es mayor a 200  $\mu$ M.

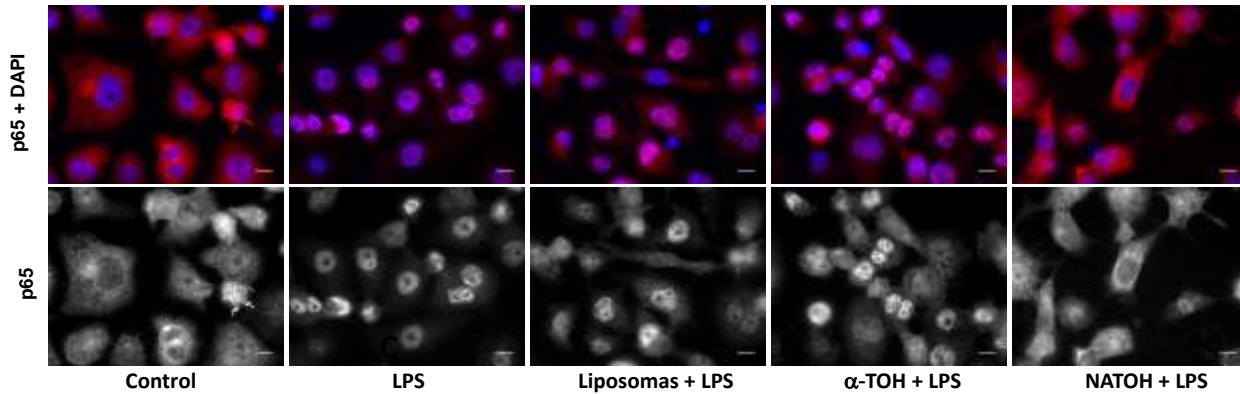
#### **4.1.3b) Efectos biológicos de los nitroalquenos análogos del tocoferol.**

Nuestro principal objetivo en el marco del desarrollo de una nueva estrategia farmacológica para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis, era diseñar un compuesto con propiedades anti-inflamatorias no convencionales, es decir que sus efectos no fuesen mediados exclusivamente por las enzimas COX1 y COX2. Esto es debido a que los inhibidores de estas enzimas, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), no mostraron ninguna utilidad para el tratamiento de la aterosclerosis y otras ECV. Por el contrario, algunos mostraron aumento de mortalidad [231]. En ese sentido, nuestro compuesto híbrido contiene un grupo nitroalquenilo sobre la estructura del  $\alpha$ -tocoferol. El grupo funcional nitroalqueno fue seleccionado por su capacidad de inhibir rutas pro-inflamatorias que se han demostrado que juegan roles protagónicos centrales en el desarrollo de la aterosclerosis (NF- $\kappa$ B, inflamasoma, PPAR- $\gamma$ , etc.) [173, 183, 184], y a la vez que activan rutas citoprotectoras importantes como Nrf2 y HSR [204, 232, 233]

En función de lo anteriormente comentado, en esta etapa de nuestro trabajo nos propusimos estudiar la capacidad de nuestros compuestos de modular estas vías.

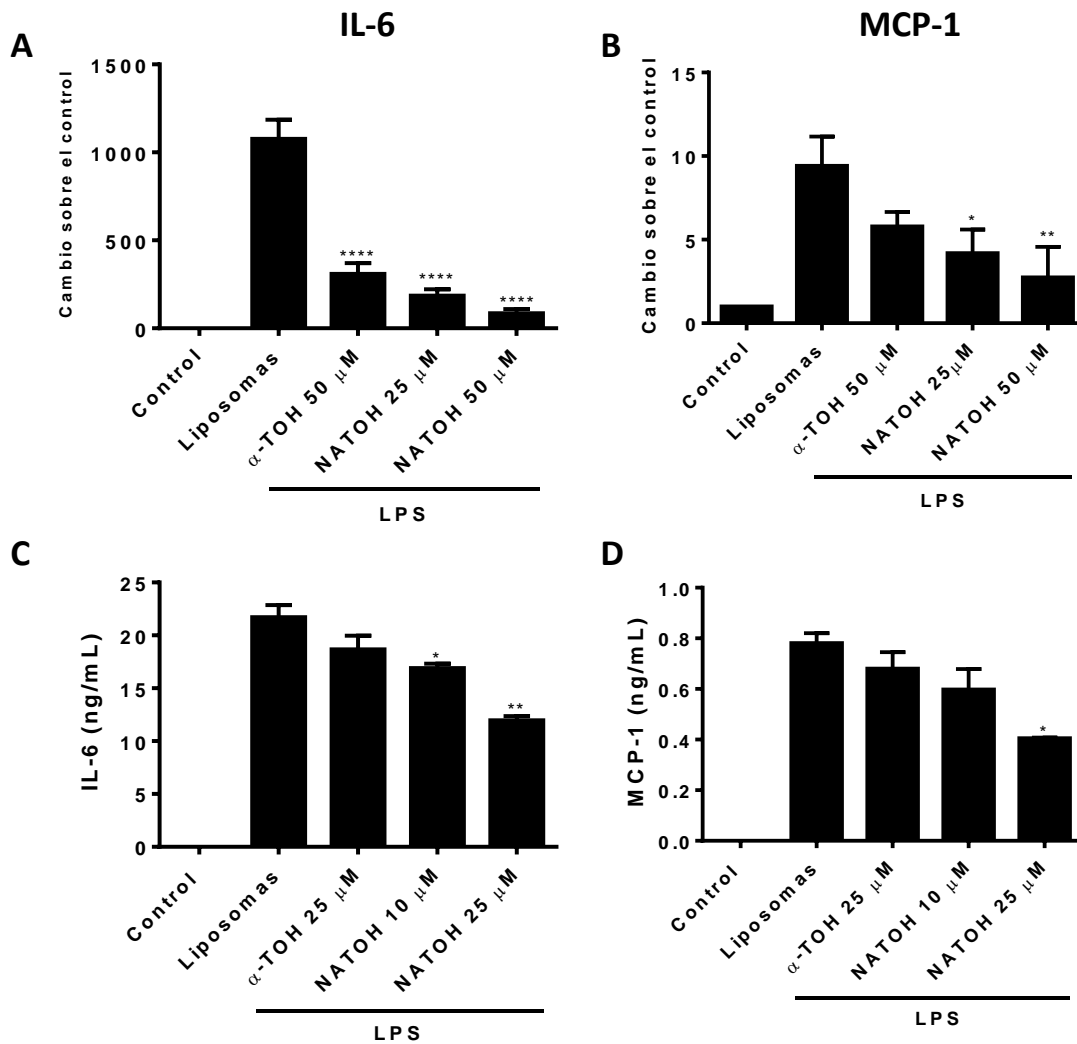
##### **4.1.3b1) Inhibición de NF- $\kappa$ B.**

Primero nos enfocamos en la capacidad del NATOH para inhibir la cascada de señalización proinflamatoria dependiente de NF- $\kappa$ B. Como primera aproximación, se analizó la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B inducida por LPS en presencia o ausencia de NATOH o  $\alpha$ -TOH en macrófagos humanos THP-1. Como se muestra en la figura 34, el NATOH pero no el  $\alpha$ -TOH fue capaz de inhibir la translocación nuclear de la subunidad p65 en respuesta a LPS.



**Figura 34. Efecto de NATOH sobre la translocación nuclear de la subunidad p-65 de NF- $\kappa$ B inducida por LPS en macrófagos THP-1.** Las células se trataron con NATOH o  $\alpha$ -TOH (50  $\mu$ M, durante la noche). Luego se activaron con LPS (1  $\mu$ g/mL) por 30 min. En control negativo (control) las células no fueron tratadas con LPS. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

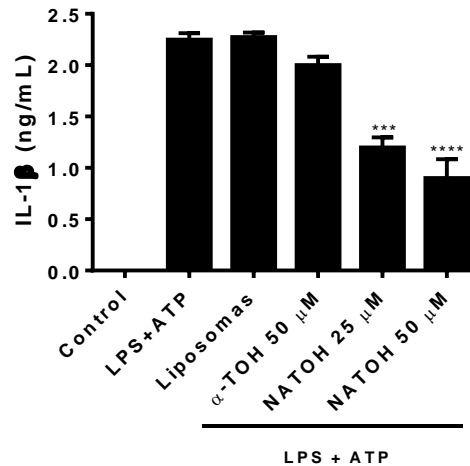
Por otro lado, se analizó la expresión de tres genes reporteros de NF- $\kappa$ B (IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ ) mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) y ELISA. Para analizar la expresión génica de IL-6 y MCP-1, los macrófagos THP-1 fueron tratados durante toda la noche con NATOH o  $\alpha$ -TOH solubilizados en liposomas y luego activados con LPS durante 4 h. El análisis de la expresión génica se realizó mediante qRT-PCR (figura 35). Finalmente, para analizar la secreción de estas citoquinas proinflamatorias, macrófagos murinos RAW 264.7 fueron tratados durante 8 h con NATOH o  $\alpha$ -TOH como previamente y luego estimulados con LPS toda la noche. El análisis de la secreción de IL-6 y MCP-1 se realizó en el sobrenadante del medio celular mediante ELISA. Como se muestra en la figura 35, el NATOH inhibió tanto la expresión como la secreción de IL-6 y MCP-1, tanto en macrófagos humanos como en murinos. En este modelo experimental, este compuesto no inhibió la expresión de TNF- $\alpha$ . Se ha descrito que el  $\alpha$ -TOH y el  $\gamma$ -TOH ejercen efectos antiinflamatorios, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo la modulación de la expresión de estas citoquinas pro-inflamatorias [234]. En nuestro estudio, el  $\alpha$ -TOH inhibió solo la transcripción de IL-6 pero no modificó el nivel de proteína y tampoco afectó la expresión génica ni proteica de MCP-1 (figura 35).



**Figura 35. NATOH inhibe la expresión de proteínas dependientes de NF- $\kappa$ B en macrófagos. (A y B)** Células THP-1 se trataron con NATOH (25 y 50  $\mu$ M) o  $\alpha$ -TOH (50  $\mu$ M) toda la noche (O.N.). Después del tratamiento, las células se estimularon con LPS (100 ng/mL, durante 4 horas). El ARNm se extrajo de las células para cuantificar la expresión relativa de IL-6 y MCP-1 sobre el control (actina) mediante el ensayo de RT-PCR cuantitativa. **El NATOH inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B. (C, D)** Macrófagos RAW 264.7 se trataron con NATOH (10 y 25  $\mu$ M) o  $\alpha$ -TOH (25 $\mu$ M) durante 8 horas y luego las células fueron estimuladas con LPS (50ng/mL) O.N. Posteriormente se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se midió la presencia de IL-6 o MCP-1 mediante ELISA. Análisis estadístico: paneles superiores: Anova de una vía con test Bonferroni \* = 0.0148; \*\* = 0.0017; \*\*\*\* <0,0001 vs liposomas; paneles inferiores: Anova de una vía con test Bonferroni IL-6 \* = 0.046; \*\* = 0.0018; MCP-1 \* = 0.030 vs. liposomas

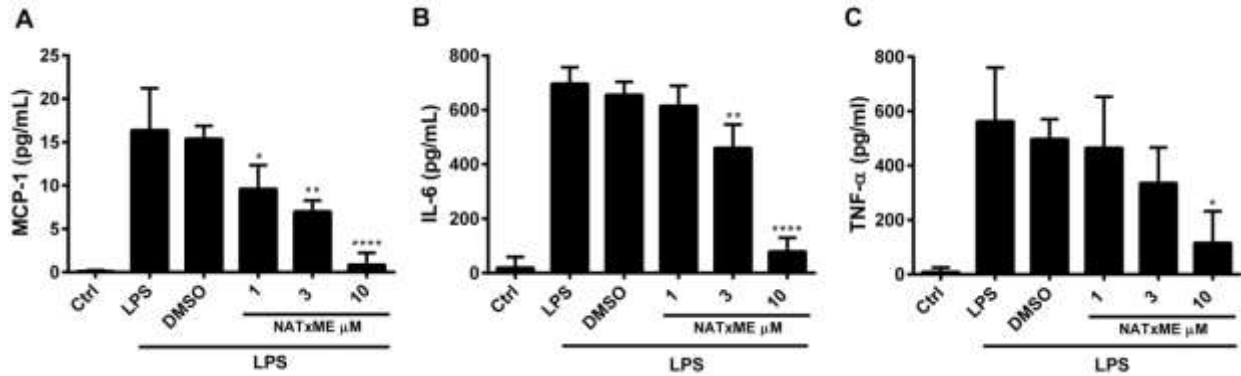
Por último, y dada la importancia que presenta la IL-1 $\beta$  en la patogenia de la aterosclerosis [220] y que su expresión está bajo control de NF- $\kappa$ B, fuimos a estudiar si el NATOH podría estar inhibiendo la síntesis y secreción de esta citoquina. Para ello, macrófagos THP-1 fueron incubados

durante toda la noche con NATOH (25 o 50  $\mu$ M) o  $\alpha$ -TOH (50  $\mu$ M) y posteriormente se estimularon con LPS y luego ATP (ver materiales y métodos). EL NATOH pero no  $\alpha$ -TOH inhibió la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos humanos de una manera dependiente de la dosis (figura 36).



**Figura 36. El NATOH inhibe la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos humanos THP-1.** Macrófagos THP-1 se pre-trataron O.N con NATOH o  $\alpha$ -TOH a las dosis indicadas y posteriormente se estimularon con LPS (250 ng/mL) por 3 h y luego ATP (5 mM, 45 min). Los niveles de IL-1 $\beta$  se midieron por ELISA. Los valores se muestran como media  $\pm$  SD. Análisis estadístico: Anova de una vía con test de Bonferroni. A) y B) \*\*\*\* <0.0001. C) \*\*\*\* <0,0001 o \*\*\* = 0,004. D) y E) \* < 0.0292; \*\*\*\*< 0.0001 vs LPS+ATP.

Luego, para determinar si el análogo hidrosoluble del NATOH, el NATxME, también podría modular la cascada de señalización NF- $\kappa$ B, incubamos macrófagos RAW 264.7 con NATxME (1, 3 y 10  $\mu$ M) durante 2 horas antes de que las células fuesen estimuladas con LPS durante toda la noche. La secreción de citoquinas dependientes de NF- $\kappa$ B fue analizada en el sobrenadante celular por ELISA (figura 37 A, B y C). Como se observa en dicha figura, de destaca una inhibición muy significativa tanto de MCP-1 e IL-6 como de TNF- $\alpha$ . Estos efectos fueron dependientes de la dosis, alcanzando ~ 80% de inhibición a 10  $\mu$ M de NATxME.



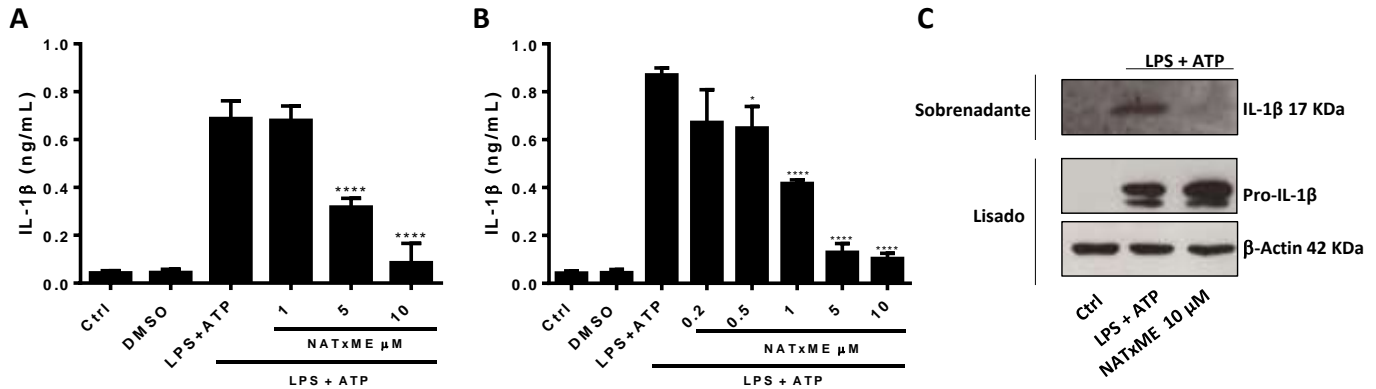
**Figura 37. NATxME inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B.** Macrófagos RAW 264.7 se trataron con NATxME 1, 3 y 10  $\mu$ M durante 2 h y luego se estimularon con LPS (50 ng/ml) durante 18 h. La secreción de citoquinas inflamatorias MCP-1 (A), IL-6 (B) y TNF- $\alpha$  (C) se analizó mediante ELISA. Los valores se muestran como media  $\pm$  SD. Análisis estadístico: Anova de una vía con test de Bonferroni. A) \* = 0.0294; \*\* = 0.0017; \*\*\*\* < 0.0001. B) \*\* = 0.013; \*\*\*\* < 0.0001. C) \* = 0.0131. vs LPS.

#### 4.1.3b2) Inhibición del inflamasoma NLRP3 por el NATxME.

El inflamasoma NLRP3 juega un papel clave en la generación de la respuesta inflamatoria crónica que subyace a varias enfermedades metabólicas crónicas, como la aterosclerosis [60, 235, 236]. En particular, se ha demostrado que los cristales de colesterol activan el inflamasoma NLRP3, que a su vez desencadena respuestas inflamatorias de la pared vascular y conduce al desarrollo de la placa de ateroma y es un evento temprano en la patogenia de esta enfermedad [60, 235]. Por otro lado, en el 2014 en la literatura se reportó que un nitroalqueno de síntesis, el 3,4-metilendioxi- $\beta$ -nitroestireno inhibe el inflamasoma al bloquear su ensamblaje y de esta manera inhibe la síntesis y secreción de la IL-1 $\beta$ , una de las citoquinas pro-inflamatorias más potentes [237].

Por tanto, decidimos analizar si los nitroalquenos análogos del tocoferol, en particular el NATxME, podría ejercer acciones anti-inflamatorias a través de la inhibición del inflamasoma NLRP3 en los macrófagos humanos mediante la técnica de ELISA y Western Blott (WB). El NATxME se probó a diferentes dosis (0, 1, 3 y 10  $\mu$ M) cuando el compuesto fue incubado junto con el LPS utilizado como primera señal de activación del inflamasoma. Para estudiar el efecto de nuestro compuesto adicionado al mismo momento que la segunda señal de activación del inflamasoma (ATP), las concentraciones utilizadas fueron menores (0.2, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M). Cuando se añadió NATxME junto con la primera señal, se observó una inhibición de IL-1 $\beta$  en el

sobrenadante celular dependiente de la dosis. Más aun, cuando se añadió NATxME junto con la segunda señal (ATP), se observó inhibición de la producción de IL-1 $\beta$  a dosis aún más bajas (0,5 y 1  $\mu$ M) (figura 38 A-B). Además, analizamos la secreción de IL-1 $\beta$  en el medio celular cuando NATxME fue aplicado junto con la segunda señal mediante la técnica de WB (figura 48 C). En esta figura se puede observar como el NATxME inhibe la secreción de la IL-1 $\beta$  pero no la de pro-IL-1 $\beta$ .

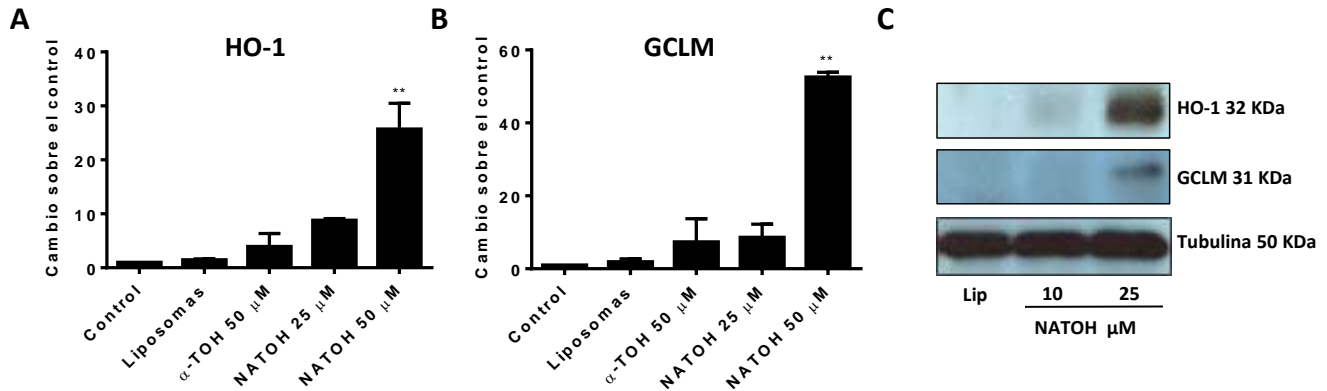


**Figura 38. NATxME inhibe el inflammasoma NLRP3.** Macrófagos THP-1 se estimularon con LPS (250 ng/mL, 3h) y luego con ATP (5 mM, 45 min). Aplicamos el tratamiento con NATxME con la primera señal (LPS) (A) o junto con la segunda señal (ATP) (B). Los niveles de IL-1 $\beta$  se midieron por ELISA. C) Análisis de la secreción de IL-1 $\beta$  por Western Blott en el medio celular. Los valores se muestran como media  $\pm$  SD. Análisis estadístico: Anova de una vía con test de Bonferroni. A) \*\*\*\* <0.0001. B) \* = 0.0292; \*\*\*\* <0.0001.

#### 4.1.3b3) Inducción del sistema Nrf2-Keap-1 por los nitroalquenos análogos del tocoferol.

La vía Nrf2-Keap1 es un importante regulador de las respuestas citoprotectoras a los factores de estrés endógenos y exógenos causadas por especies reactivas de oxígeno/nitrógeno y electrófilos [232, 233]. Por lo tanto, para estudiar si nuestros compuestos son capaces de activar estas vías, macrófagos THP-1 fueron tratados durante toda la noche con diferentes dosis de NATOH o  $\alpha$ -TOH solubilizados en liposomas. Después del tratamiento, la expresión de dos de los reporteros de Nrf2 más importantes fue analizada por qPCR y por WB. Como se muestra en la figura 39, NATOH pero no el  $\alpha$ -TOH fue capaz de inducir la expresión de la enzima hemoxigenasa 1 (HO-1) y la enzima glutamato-cisteina ligasa (del inglés GCLM) de una manera dependiente de la dosis. Más aun, el NATOH también indujo la expresión de estas dos enzimas a nivel proteico, en macrófagos RAW 264.7, como se observa en la figura 39C. Por otro lado, ni el NATOH ni el  $\alpha$ -

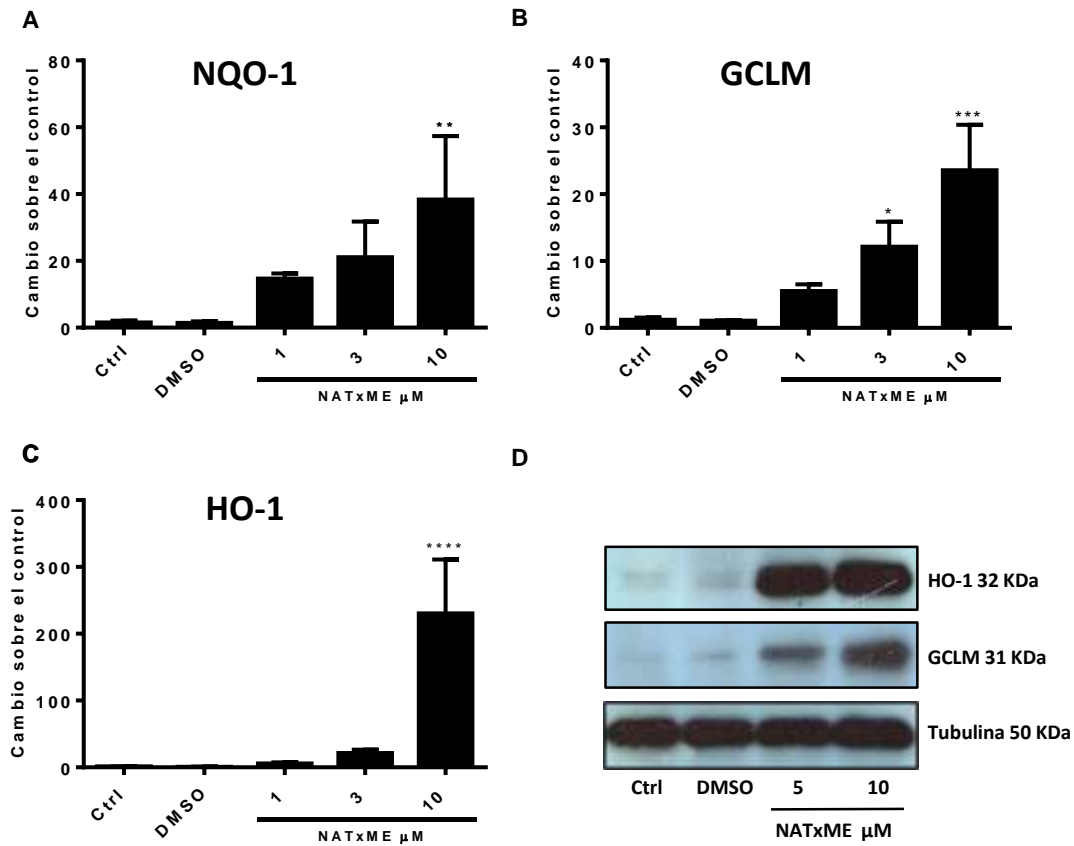
TOH alteraron la expresión de la enzima NAD(P)H-deshidrogenasa quinona 1 (NQO1), también reportera de este sistema (datos no mostrados).



**Figura 39. NATOH induce el sistema de Nrf2-Keap-1. A y B)** Células THP-1 se diferenciaron en macrófagos y luego se trataron con NATOH o  $\alpha$ -TOH O.N. Se extrajo ARNm y la expresión relativa de HO-1 y GCLM se midió mediante RT-PCR cuantitativa. **C)** Células Raw264.7 se trataron O.N. con NATOH y la inducción de a nivel proteico de HO-1 y GCLM se analizó por WB. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con test de Bonferroni. HO-1 \*\* = 0.0076; GCLM \*\* = 0.0011 vs control)

De forma similar, analizamos si el NATxME también era capaz de inducir la expresión de genes regulados por esta ruta de señalización celular. Para ello, macrófagos RAW 264.7 fueron tratados con diferentes concentraciones de NATxME por 5 h y luego se analizó la expresión de los reporteros más importantes de Nrf2 por qRT-PCR. Además analizamos la expresión de estos marcadores por WB incubando estos macrófagos con NATxME durante toda la noche. En la figura 40, se puede observar como este compuesto induce de manera significativa y dependiente la expresión de las tres enzimas reporteras de este sistema: NQO-1, GCLM y HO-1. Además, el NATxME también induce expresión de las proteínas HO-1 y GCLM, pero no de NQO1.





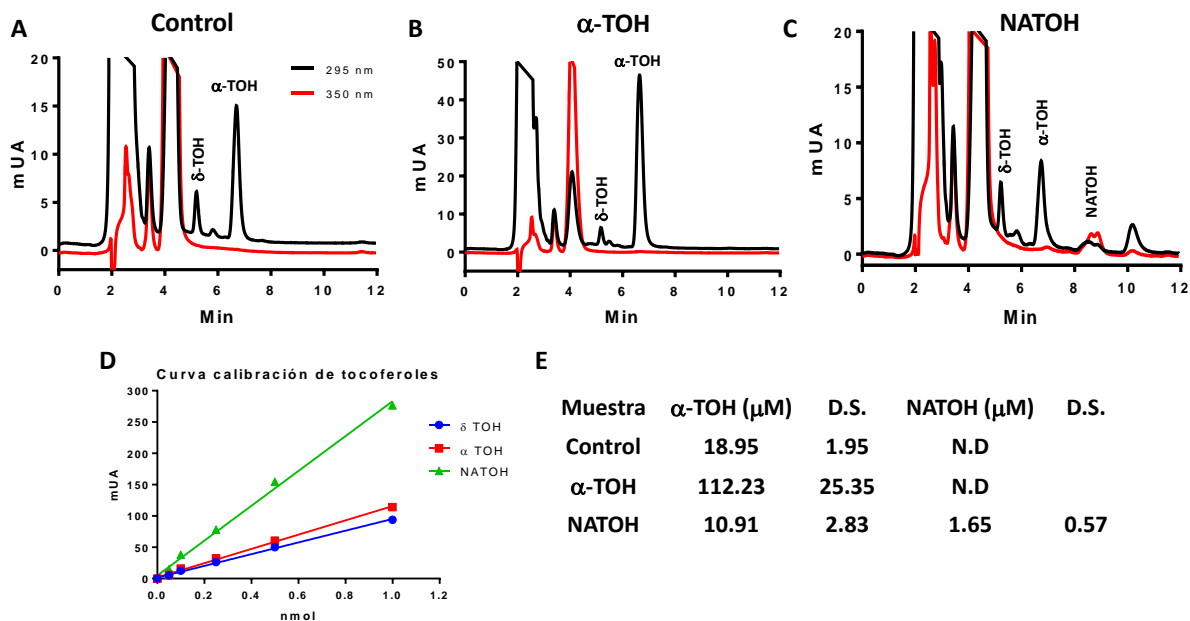
**Figura 40. NATxME induce el sistema Nrf2-Keap-1.** Macrófagos RAW 264.7 se trataron con NATxME 1, 3 y 10  $\mu$ M durante 5 h y La expresión relativa de NQO1 (A), GCLM (B) y HO-1 (C) se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa. D) inducción de la expresión de las proteínas HO-1 y GCLM por NATxME. Los valores se muestran como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con test de Bonferroni. A) \*\* = 0.0038. B) \* = 0.0310; \*\*\* = 0.0001. C) \*\*\* = 0.0001. vs Ctrl

#### **4.1.4) ESTUDIO DE LOS EFECTOS *IN VIVO* DE LOS NITROALQUENOS ANÁLOGOS DEL TOCOFEROL.**

##### **4.1.4a) Detección de NATOH en el plasma y en la fracción de lipoproteínas VLDL/LDL de ratones ApoE knockout.**

Para comenzar con la caracterización de los efectos biológicos *in vivo* de nuestros compuestos, inicialmente nos centramos en el estudio del NATOH para comprobar si este compuesto cuando lo administramos por vía oral, es absorbido y transportado por el organismo incorporado en las lipoproteínas, en particular las de síntesis endógena (VLDL/LDL). Por otro lado, nos interesaba estudiar su capacidad de prevenir el desarrollo de la aterosclerosis. Por tanto, utilizamos uno de los modelos animales más validados para el estudio de esta patología: el modelo de ratones knockout para la apolipoproteína E.

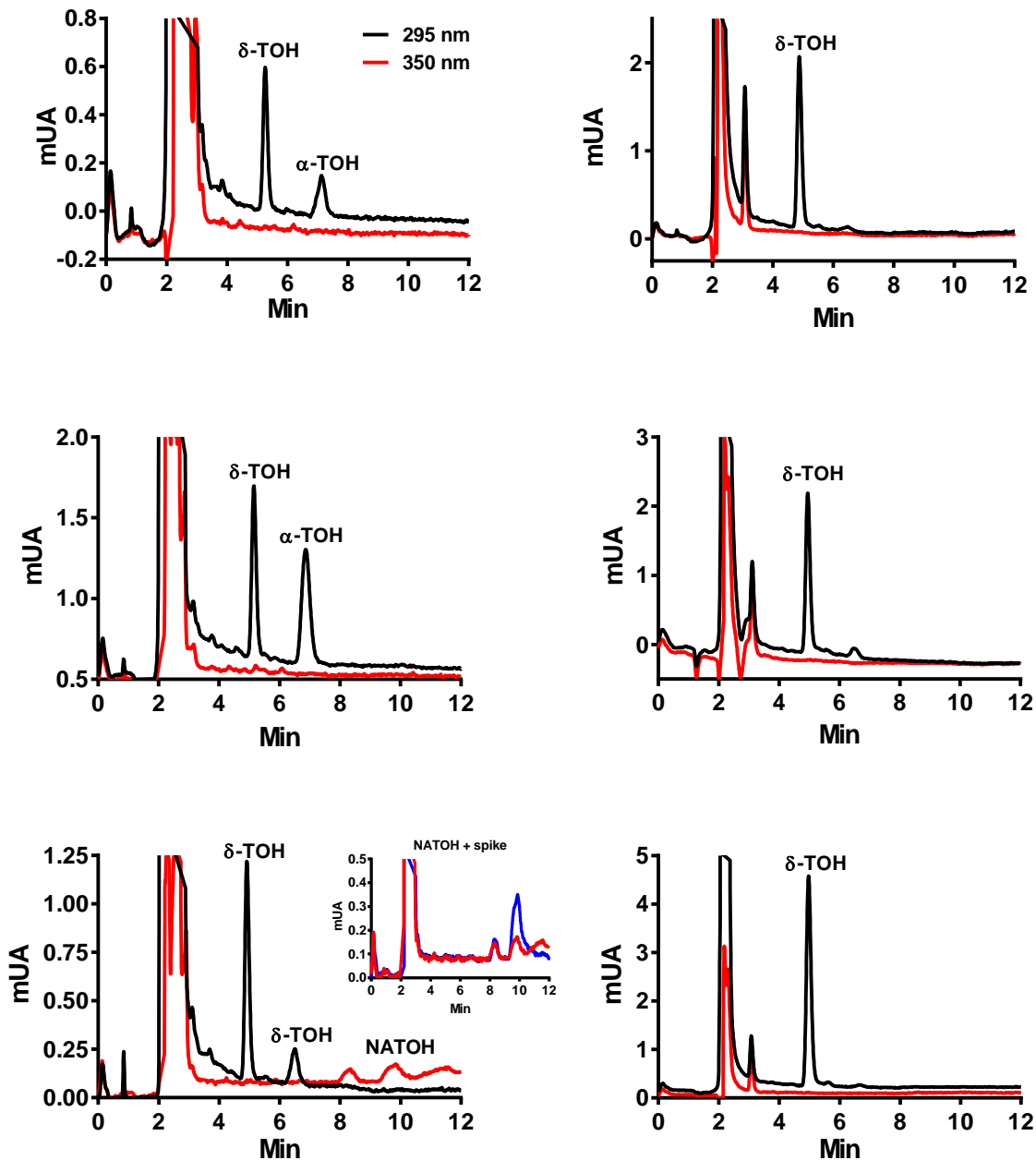
Inicialmente, ratones ApoE knockout alimentados con una dieta rica en grasas (HFD) pero sin adición suplementaria de Vitamina E, fueron administrados por vía oral con vehículo (aceite de girasol, 100  $\mu$ L) o con NATOH o  $\alpha$ -TOH (200 mg/kg disueltos en el vehículo) durante 2 semanas. La última dosis fue administrada en ayunas de 12 horas antes de sacrificar a los ratones. Como se muestra en la figura 41, el NATOH solo se detecta en plasma de ratones tratados con este compuesto y a una concentración de  $\sim 1,7 \mu$ M



**Figura 41. Detección de NATOH en plasma de ratones ApoE Knockout por HPLC en fase reversa.** Ratones ApoE Knockout fueron alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) durante 14 semanas. Desde la semana 12 a la 14, tratamos a los ratones por vía oral con NATOH (200 mg/kg/día),  $\alpha$ -TOH (200 mg/kg/día) o vehículo (aceite de girasol), y analizamos la presencia de NATOH en plasma por HPLC en fase reversa usando  $\delta$ -TOH como estándar interno. **A)** Cromatograma de un animal control; **B)** Cromatograma de un animal tratado con  $\alpha$ -TOH y **C)** Cromatograma de un animal tratado con NATOH. **D)** Curva calibración utilizada para la determinación de la concentración de plasmática de NATOH. **E)** concentración de NATOH y  $\alpha$ -TOH en plasma de ratones ApoE knock out. D.S (desviación estándar)

A continuación, nos propusimos analizar si el compuesto detectado en el plasma estaba asociado mayoritariamente a las lipoproteínas de síntesis endógena (VLDL/LDL) y/o a la albumina plasmática. El perfil lipoproteico de los ratones varía según la cepa, siendo la VLDL y LDL las lipoproteínas mayoritarias en la cepa ApoE knockout [238, 239]. Es por este motivo que decidimos purificar las lipoproteínas de los ratones ApoE knockout ajustando la densidad del plasma a 1.06 g/mL de manera de purificar de manera conjunta a las VLDL y las LDL (ambas con densidades menores a 1.06g/mL y por tanto en esa solución de KBr quedarían como banda de flotación) y las proteínas plasmáticas (mayoritariamente albumina) y la HDL quedan en la fracción inferior del tubo de centrifugación. Se tomaron manualmente las fracciones, realizamos una extracción orgánica con MeOH (9:1) y la presencia de NATOH y  $\alpha$ -tocoferol fue analizada por HPLC en fase reversa. Interesantemente, en la figura 42 podemos observar como el NATOH solo fue encontrado en la fracción lipoproteica VLDL/LDL y no en las fracciones albumina/HDL;

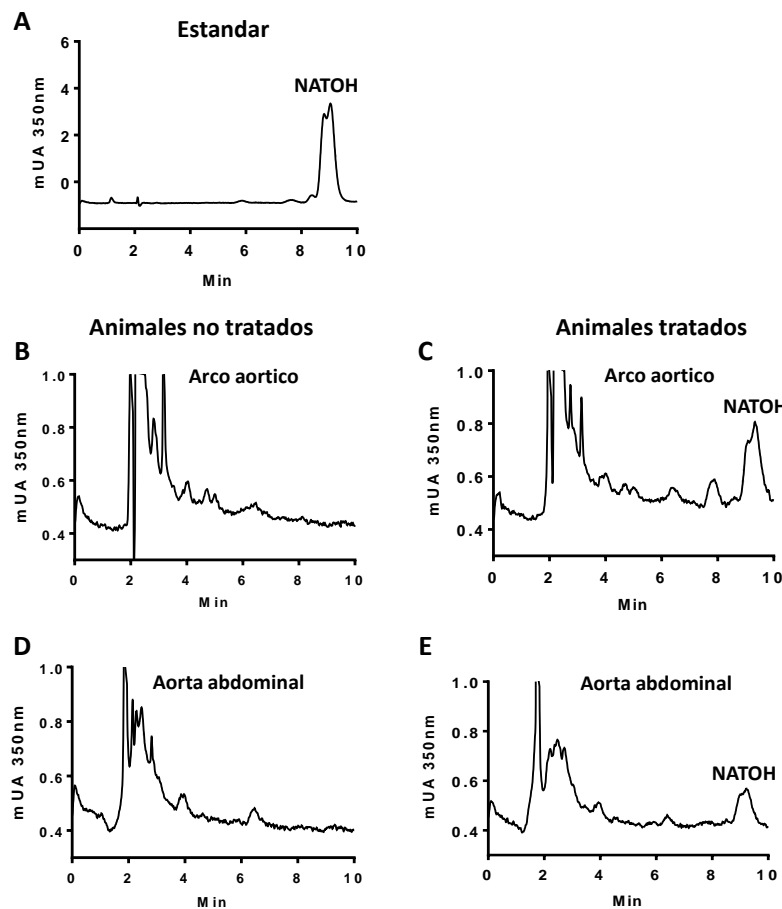
confirmando que no sólo se absorbe sino que se transporta por el plasma incorporado a las lipoproteínas de síntesis endógena VLDL/LDL.



**Figura 42.** Detección de NATOH en las fracciones de lipoproteínas de VLDL/LDL de ratones Apo E knockout (A-F). A ratones alimentados con un dieta HFD se les administró vía oral vehículo,  $\alpha$ -TOH o NATOH (200 mg/kg/día) durante dos semanas (semanas 12-14). Al final del experimento, se aislaron las fracciones de lipoproteínas VLDL/LDL y la presencia de NATOH o  $\alpha$ -TOH endógeno se analizó por HPLC en fase reversa usando  $\delta$ -TOH como estándar interno. El inserto del panel E muestra la misma muestra a la que se le añadió 0.05 nmol de NATOH estándar.

#### 4.1.4b) El NATOH se detecta en las aortas ateroscleróticas de ratones ApoE Knockout alimentados con HFD.

Una de las novedades más relevantes de nuestra estrategia farmacológica es que nuestro compuesto sea capaz de ser transportado hasta el sitio mismo de la lesión. Para continuar testeando nuestra hipótesis, nos propusimos analizar si podíamos detectar al NATOH en las lesiones ateroscleróticas de ratones ApoE Knockout alimentados durante 14 semanas con una dieta rica en grasas (HFD) y a los que en las dos últimas semanas les administramos el compuesto por vía oral.



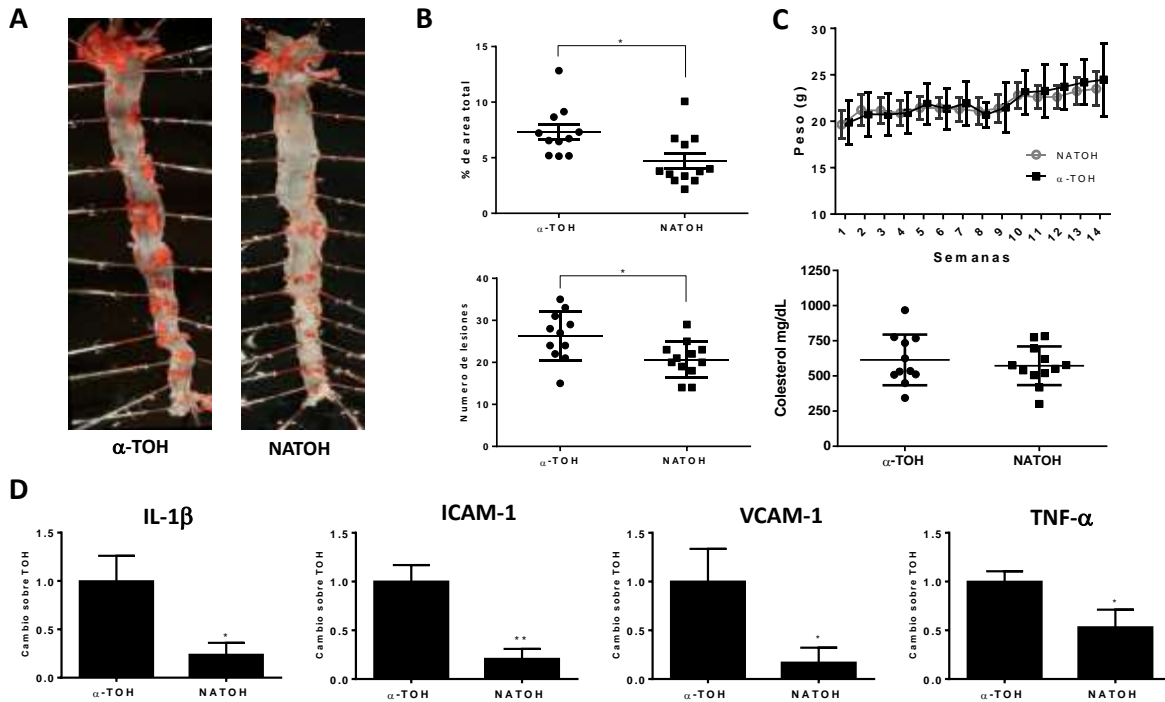
**Figura 43. Detección de NATOH en las aortas de ratones ApoE knockout. A)** Perfil de elución estándar de NATOH mediante RP-HPLC detectado a 350 nm. **B)** Cromatograma de extracción de Arco aórtico de animales control. **C)** Cromatograma de extracción de arco aórtico de animales tratados con NATOH. **D)** Cromatograma de extracción de aorta abdominal de ratones control. **E)** Cromatograma de aorta abdominal de animales tratados con NATOH.

Para ello, desde la semana 12 hasta la 14 tratamos a los ratones por vía oral con NATOH (200 mg/kg/día) o vehículo y analizamos la presencia de NATOH en las placas de ateroma disecadas de estos animales. Se homogeneizaron los arcos aórticos (alto contenido de placas) o aortas abdominales (bajo contenido) de animales control o tratados con NATOH, se extrajeron con  $\text{CHCl}_3$  y se analizaron mediante HPLC en fase reversa para dilucidar la presencia o ausencia de NATOH. Como se observa en la figura 43, el NATOH estaba presente en las lesiones obtenidas del arco aórtico así como en las lesiones de la aorta abdominal de animales tratados (figura 43 C y E). Como se esperaba, el NATOH no fue encontrado en las aortas de los animales control (figura 43 B y D).

**4.1.4c) El NATOH reduce las la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, de moléculas de adhesión y la aterosclerosis en ratones ApoE Knockout alimentados con dieta rica en grasa.**

Se ha demostrado que  $\alpha$ -TOH inhibe la aterosclerosis en los ratones ApoE knockout [240-242]. Para ver si la incorporación del nitroalqueno podría dar como resultado una mejora de las propiedades anti-aterogénicas de  $\alpha$ -TOH, estudiamos el efecto de la administración oral de NATOH frente a  $\alpha$ -TOH en el desarrollo de la aterosclerosis. Para ello y a diferencia del modelo utilizado para los experimentos anteriores, en este caso se alimentaron ratones ApoE knockout (3 meses) con HFD y al mismo tiempo se les administró por vía oral NATOH (100 mg/kg/día) o  $\alpha$ -TOH (100 mg/ kg/día, equivalente a 111 UI/kg/día, dosis equivalente a la utilizada en ensayos clínicos con humanos ~ 800 UI/día) durante 14 semanas. Luego, los ratones fueron sacrificados y se disecaron las aortas (desde el arco aórtico hasta la bifurcación ilíaca, figura 44A) para medir el grado de desarrollo de placas de aterosclerosis en la aorta. Los animales tratados con NATOH desarrollaron menos cantidad de área total de lesiones en comparación con los ratones tratados con  $\alpha$ -TOH (área de placa positiva para la tinción con el colorante Oil red O por área total de la aorta; figura 44A y B;  $p = 0.011$ ) y como consecuencia de tener un número reducido de lesiones (figura 44B). Es importante destacar que el tratamiento con NATOH no afectó el aumento de peso de los animales (figura 44C). Estos resultados demuestran que el NATOH mejora

significativamente las propiedades anti-aterogénicas de  $\alpha$ -TOH, de manera independiente a sus propiedades como antioxidante (figura 30).



**Figura 44. NATOH reduce la aterosclerosis en ratones ApoE knockout tratados con HFD. A)** Los ratones ApoE knockout se trataron con NATOH o  $\alpha$ -TOH vía oral (100 mg/kg en 100  $\mu$ l de aceite de girasol) de lunes a viernes durante 3 meses. Los ratones se sacrificaron, se disecó la aorta y se midió manualmente la formación de placa de ateroma usando la tinción Oil red O y el software Image J. **B)** Área de la placa aterosclerótica y número de lesiones en la aorta. El área se determinó como un porcentaje del área total de aorta,  $p = 0.011$  (Test de student), No. de lesiones  $p = 0.0149$ . **C)** Evolución del peso de los ratones durante el experimento y niveles de colesterol total a tiempo final de los distintos grupos de animales. **D)** **NATOH disminuye la expresión de marcadores pro-inflamatorios dependientes de NF- $\kappa$ B (IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 y TNF- $\alpha$ ) en las aortas de los ratones ApoE knockout.** Los ratones ApoE knockout se trataron con NATOH o  $\alpha$ -TOH (100 mg / kg) de lunes a viernes durante 3 meses. La aorta se extrajo y el ARN se aisló usando Trizol. Los niveles de IL 1b, VCAM-1, ICAM-1 y TNF- $\alpha$  se midieron mediante RT-qPCR usando GAPDH como gen 'housekeeping'. Prueba t de una cola: IL-1 $\beta$  = 0.0203; ICAM-1 = 0.0036; VCAM-1 = 0.0328; TNF- $\alpha$  = 0.0346.

Es importante destacar que el efecto del NATOH es independiente de la ganancia del peso corporal así como del perfil lipídico. En particular, los animales tratados con  $\alpha$ -TOH vs. NATOH no mostraron diferencias significativas ni en el peso corporal ni en los niveles de colesterol total en plasma (figura 44C).

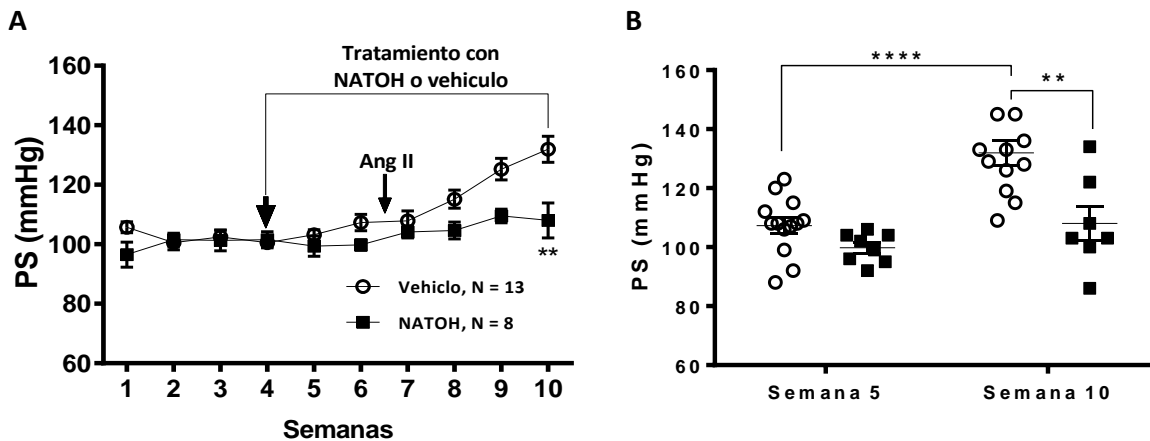
En este mismo set experimental *in vivo*, el NATOH disminuye la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de manera significativa en la aorta de los ratones ApoE knockout tratados con NATOH en comparación con los tratados con  $\alpha$ -TOH (figura 44D). Estos resultados van en el mismo sentido que los obtenidos *in vitro* (figuras 34-36).

#### **4.1.4d) Efectos del NATOH en un modelo de hipertensión arterial inducida por Angiotensina II.**

Teniendo en cuenta que está demostrado que los ácidos grasos insaturados nitrados inhiben la hipertensión inducida por angiotensina II en ratones a través de una modificación del receptor AT1 [206], decidimos estudiar los posibles efectos del NATOH en el modelo de hipertensión arterial inducida por administración subcutánea y continua de Angiotensina II (Ang II) en ratones. Para ello se utilizaron ratones C57BL/6 a los cuales tratamos con NATOH (50 mg/kg/día, n = 8) o vehículo (aceite de girasol, n = 13). El diseño experimental implicó un registro basal de la presión arterial (PA) durante de 4 semanas. Luego, se realizó una etapa de registro y pre-tratamiento (antes de la colocación de las bombas) por 2 semanas y administración de NATOH 50mg/kg/día o vehículo (aceite de girasol) vía oral, en forma trisemanal (lunes, miércoles, viernes). Posteriormente se procedió a la cirugía para la colocación de las bombas osmóticas que infunden Ang II (1 mg/kg/día; ver materiales y métodos). Finalmente, se realizó la etapa de registro y tratamiento (luego de la colocación de bombas) durante 4 semanas, la cual consistió en el registro de la PA en los ratones a la vez que se continuaba con el tratamiento con NATOH o vehículo. En la figura 45A se puede observar que cuando NATOH se administró por vía oral 3 veces por semana (50 mg/kg), los valores medios de presión sistólica (PS) se mantuvieron relativamente estables durante la línea de base y antes de la administración subcutánea de Ang II (1mg/kg/día). Después del inicio de la liberación de Ang II, hay un aumento progresivo en los valores de la presión arterial solo en el grupo control. Sin embargo, el NATOH inhibió el aumento de la presión arterial de manera estadísticamente significativa (figura 45A). Más aún, mientras



que en la décima semana del experimento, el grupo control presentó valores de PS medios más altos en comparación con la 5ta semana (valor SP medio  $132 \pm 4$  mm Hg frente a  $107 \pm 3$ , respectivamente,  $p < 0,0001$ ); el grupo NATOH no presentó diferencias estadísticamente significativas en el promedio PS entre la semana 10 frente a la semana 5 (el promedio PS fue de  $108 \pm 6$  frente a  $100 \pm 2$  mm Hg, respectivamente). Además, en la semana 10, el valor de PS promedio del grupo control fue significativamente mayor con respecto al valor de PS del grupo NATOH (figura 45 B,  $p = 0.0065$ ).

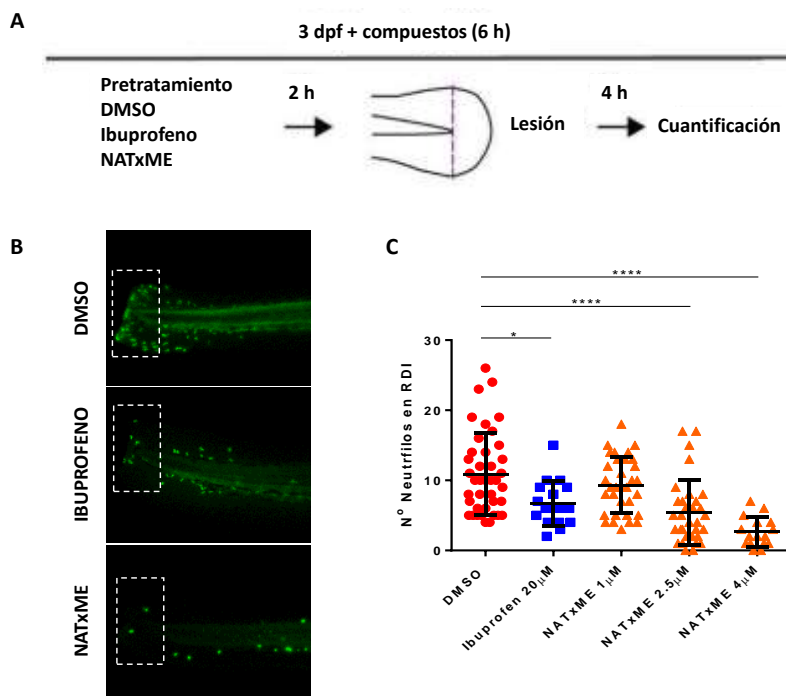


**Figura 45. NATOH inhibe la hipertensión Inducida por Angiotensina II. A)** Valores promedio de PS dependiendo de las semanas para los grupos tratados con vehículo (aceite de girasol) o NATOH. Los valores se expresan  $\pm$  SEM. Flecha izquierda: indica el inicio del pretratamiento. La duración total del tratamiento está definida. Flecha derecha: indica el inicio del tratamiento con AngII. **B)** Valores individuales de PS en las semanas 5 y 10 para el vehículo y el grupo NATOH. Análisis estadístico Test de student: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p = 0.0065$ .

#### 4.1.4e) Efectos *in vivo* del NATxME: NATxME inhibe el reclutamiento de neutrófilos en un modelo *in vivo* inflamatorio en el pez cebra.

Para analizar los efectos anti-inflamatorios *in vivo* del NATxME utilizamos un modelo de inflamación aguda en larvas de pez cebra transgénicas (Tg: mpx: GFP) en las que los neutrófilos expresan proteína verde fluorescente (GFP). Este es un modelo experimental ampliamente validado para estudiar la respuesta inflamatoria que puede seguirse *in vivo* midiendo directamente el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a una lesión mecánica localizada [243]. La figura 46A muestra un esquema de estos experimentos, en el que las larvas de Tg: mpx: GFP a los 3 días después de la fertilización (3 dpf) fueron incubados durante 2 h con DMSO (vehículo), ibuprofeno (control positivo) [244] o NATxME. Luego, sus aletas caudales son cortadas

con un bisturí y las larvas se incuban nuevamente con los compuestos, controles o vehículos durante 4 h. Finalmente, se realiza el conteo del número de neutrófilos reclutados en el sitio de la lesión. Como era de esperar, las larvas control (DMSO) mostraron el característico reclutamiento de neutrófilos (media=10.9; n=40) y el ibuprofeno (20 $\mu$ M) redujo significativamente este número (media=6; n=17; p=0.0164). De manera muy significativa, el NATxME también redujo el número de neutrófilos reclutados, incluso a concentraciones más bajas que el Ibuprofeno (2,5  $\mu$ M, media=5,4; n=32, p=0,0001, figura 46C). El panel B de la figura 46 muestra las imágenes características de cada condición usadas para cuantificar el número de neutrófilos en la lesión. Este efecto fue dependiente de la dosis y a 4  $\mu$ M, el NATxME mostró una disminución más pronunciada en el número de neutrófilos reclutados (media=2; n=16, p=0,0001; figura 46C).



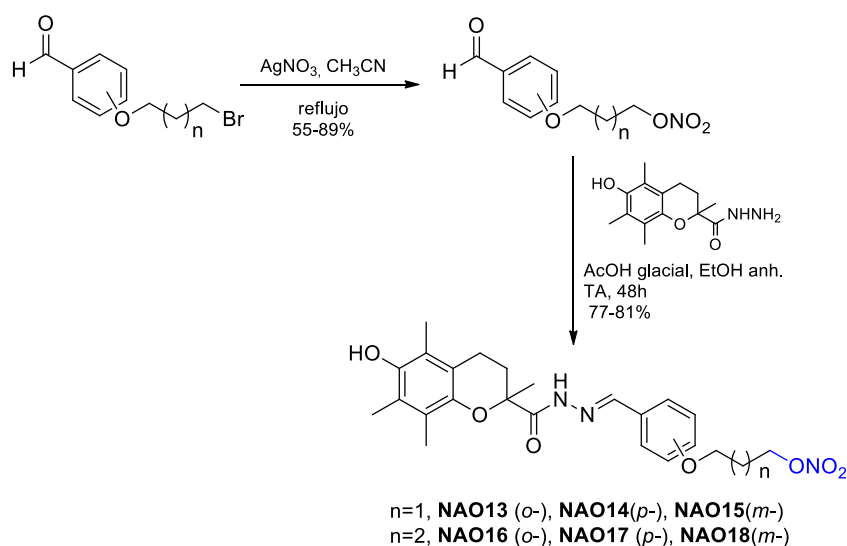
**Figura 46. NATxME inhibe el reclutamiento de neutrófilos en el pez cebra.** **A)** Diagrama de un ensayo de inflamación aguda usando larvas de pez cebra. Larvas de 3dpf (3 días post fertilización) se pretrataron durante 2 horas con DMSO, ibuprofeno o NATxME. La herida se realizó en las aletas de la cola por corte transversal con un bisturí, y luego las larvas se incubaron nuevamente en presencia de drogas. Cuatro horas después de la transección se contaron y obtuvieron imágenes de los neutrófilos en el sitio de la lesión. **B)** Imágenes representativas utilizadas para la cuantificación, que corresponden a DMSO, Ibuprofeno 20  $\mu$ M y NATxME 4  $\mu$ M. Los rectángulos punteados indican la región de la herida de interés (RDI) donde se cuantificaron los neutrófilos. **C)** Cuantificación del reclutamiento de neutrófilos a aletas heridas a las 4 h bajo diferentes tratamientos. Análisis estadístico: Anova de una vía con test de Bonferroni, \* = 0.0164; \*\*\*\* <0.0001.

## **4.2) Resultados serie 2**

*Durante muchos años el grupo de investigación en el que desarrollé mi trabajo de tesis trabajó en el diseño, síntesis y caracterización biológica de una gran serie de análogos de  $\alpha$ -tocoferol dadores de óxido nítrico [245-249]. En este marco y en colaboración con otros estudiantes del grupo (trabajos finales de licenciatura de los Lic. Luis. E. Gómez, Martín Gabay y María Eugenia Cruces desarrollados en el Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelAR), aprovechando el conocimiento adquirido, completamos la caracterización fisicoquímica, biológica y preclínica de una serie de nitratos orgánicos (nitrooxi-derivados) análogos de tocoferol. En este apartado de la tesis, en primer lugar, les comentaré las contribuciones generadas por otros miembros del grupo y no publicadas aún, para luego, a continuación, detallar mis aportes al estudio de esta serie de compuestos. El objetivo principal de esta sección de mi tesis fue entonces completar el estudio de dicha serie e identificar potenciales agentes que puedan contribuir al tratamiento de ECV, como ser la disfunción endotelial y/o la hipertensión arterial.*

#### 4.2.1) Antecedentes.

Los compuestos pertenecientes a esta serie fueron sintetizados en nuestro laboratorio según se describe en la figura 47 con buenos rendimientos [250]. Todos los compuestos se usaron para obtener datos espectroscópicos (IR, MS,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN) y para determinar tanto su pureza (HRMS) como sus actividades biológicas (toxicidad, estabilidad, capacidad de liberar  $\cdot\text{NO}$  e inducir vasodilatación, y su capacidad de unirse a  $\alpha$ -TTP e incorporarse en LDL *in vitro*). Sin embargo, los compuestos NAO14 y NAO17 resultan los de mejor perfil para continuar con los estudios preclínicos y por ello, mostraremos a modo de ejemplo los resultados para estos compuestos.



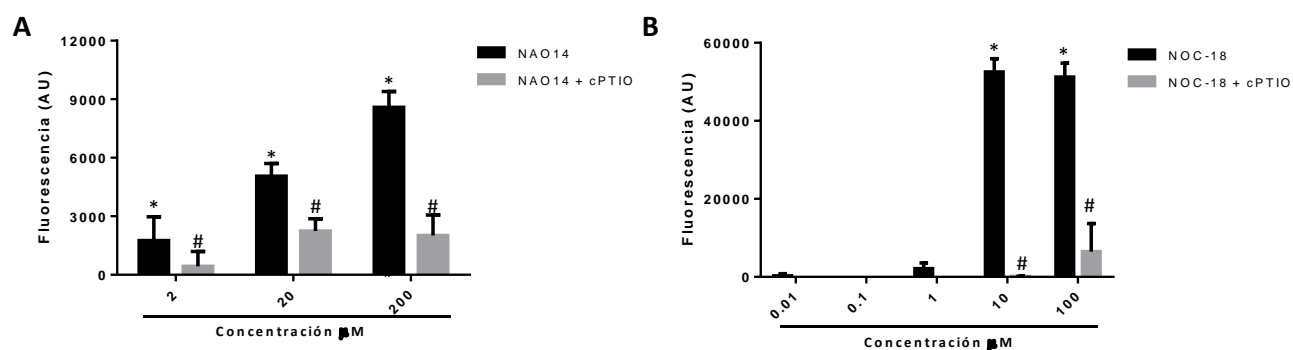
**Figura 47. Síntesis de NAO13-NAO18.** Los compuestos se preparan en dos pasos de síntesis, a partir del derivado hidrazida del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico con rendimiento global entre 25%-70%.

#### 4.2.2) Liberación de $\cdot\text{NO}$ de nitratos orgánicos análogos de tocoferol.

Se siguió la capacidad espontánea de los compuestos para liberar  $\cdot\text{NO}$  y/o especies similares a  $\cdot\text{NO}$  a lo largo de 5 h de incubación en PBS a 37 °C, usando diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2DA), una sonda fluorescente para detección de  $\cdot\text{NO}$ . En estas condiciones, no se detectó la generación de  $\cdot\text{NO}$ . Por el contrario, cuando los compuestos se añadieron a fibroblastos (línea celular murina L929), se observó una respuesta de fluorescencia DAF-2DA dependiente de la dosis después de 5 h en cultivo. En la figura 48A se muestran los resultados para NAO14 como ejemplo. Una fuerte respuesta de DAF-2DA también fue inducida por el dador de  $\cdot\text{NO}$  reconocido, NOC-18 (2,2'-(hidroxinitrosohidrazino)*bis*-etanamina or DETA

NONOate) (Control positivo, figura 48B) [251]. Para evaluar si estas respuestas de fluorescencia se asociaron con la liberación de  $\cdot$ NO, los ensayos se realizaron en paralelo en presencia de carboxi-PTIO [2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-óxido-3-óxido], un conocido "scavenger" de  $\cdot$ NO.

Como se muestra en la figura 48, la fluorescencia de DAF-2DA inducida por NAO14 y NOC-18 se inhibió fuertemente por carboxi-PTIO. Estos resultados sugieren que NAO14 es capaz de generar  $\cdot$ NO en un entorno celular.



**Figura 48. Actividad de liberación de  $\cdot$ NO de NAO14.** Fibroblastos murinos (L929) se incubaron por duplicado con NAO14 (2, 20 y 200  $\mu$ M), NOC-18 (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) en DMEM. Paralelamente, las incubaciones se realizaron en presencia de carboxi-PTIO (600  $\mu$ M) para evaluar en qué medida la respuesta de fluorescencia de DAF estaba mediada por NO. Se añadió DAF (10  $\mu$ M) al cultivo celular y se controló la fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  485nm,  $\lambda_{em}$  520nm) después de 5 h de incubación. Los valores de fluorescencia se corrigieron con el control y los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \* (comparación con el control  $p < 0,05$ ) y # (comparación con la incubación en presencia de carboxi-PTIO,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3) Actividad vasoactiva de nitratos orgánicos análogos de tocoferol en anillos de aorta.

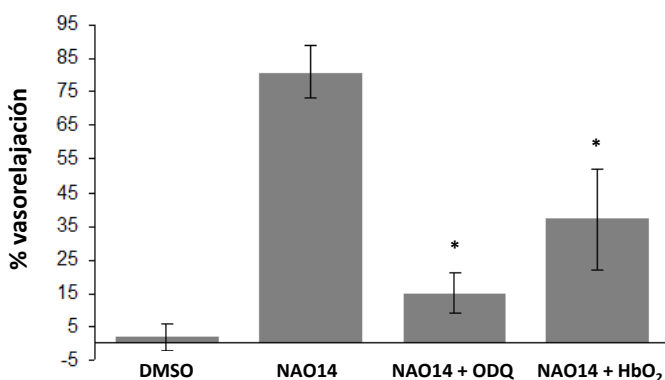
Como el  $\cdot$ NO es un potente inductor de vasorelajación a través de la activación de la guanilatociclasa soluble (sGC), se evaluó la capacidad de los compuestos liberadores de  $\cdot$ NO para inducir la vasorelajación de los vasos aórticos de rata. Para tal fin, utilizamos el sistema de baño de órganos Radnoti para medir la tensión isométrica de los anillos aórticos pretratados con noradrenalina, tratados con los compuestos liberadores de  $\cdot$ NO (20 $\mu$ M) o DMSO como control. En cuanto a NAO14 y NAO17, los resultados mostraron que ambos compuestos promovían una respuesta vasodilatadora significativa de los vasos aórticos precontraídos (tabla 4). Para evaluar

el rol de la activación de sGC mediada por  $\cdot$ NO en el efecto vasodilatador inducido por los compuestos liberadores  $\cdot$ NO, los estudios se llevaron a cabo en presencia de un inhibidor bien conocido de sGC (ODQ, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona) y usando al NAO14 como ejemplo (figura 49). La presencia de ODQ causó una reducción significativa en la vasodilatación inducida por NAO14 que indica la contribución de la vía dependiente de sGC en su actividad vasoactiva. Además, se obtuvieron resultados similares en estudios que utilizaron oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) como scavenger de  $\cdot$ NO (figura 49) [252, 253]. En general, los resultados sugieren que los compuestos liberadores de  $\cdot$ NO son potencialmente vasodilatadores de los anillos aórticos a través de una activación dependiente de  $\cdot$ NO de sGC.

**Tabla 4. Actividad vasodilatadora de NAO14 y NAO17\***

Compuesto	% de vasorelajación
DMSO	2 $\pm$ 4
NAO14	81 $\pm$ 8
NAO17	76 $\pm$ 8

\* NAO14 y NAO17 (20  $\mu\text{M}$ ) se añadieron al sistema de baño de órgano y tejido después de la contracción del anillo de aorta torácica con NA (1  $\mu\text{M}$ ). Todos los valores son medias  $\pm$  SEM (n = 5). La prueba de Mann-Whitney muestra diferencias significativas entre cada compuesto y vehículo (p <0.005).



**Figura 49. NAO14 indujo vasodilatación de anillos aórticos de rata pre-contráidos con noradrenalina mediante una vía dependiente de sGC.** Porcentaje de actividad vasodilatadora de NAO14 (20  $\mu\text{M}$ ) en ausencia de ODQ o  $\text{HbO}_2$  o en presencia de ODQ (1  $\mu\text{M}$ ) o  $\text{HbO}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) añadidos al baño 10 min antes del compuesto probado. El porcentaje de vasodilatación se expresa como media  $\pm$  SD de cinco determinaciones. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \* (comparación con la incubación en ausencia de ODQ o  $\text{HbO}_2$ , p <0,005)

#### 4.2.4) Estudios de citotoxicidad en macrófagos y fibroblastos.

Se evaluó la citotoxicidad de NAO14 y NAO17 en macrófagos J774:A1 y en fibroblastos L929 mediante el ensayo MTT (tabla 3). La  $CI_{50}$  de NAO14 en macrófagos J774:A1 fue 132 $\mu$ M y en fibroblastos L929 fue mayor a 200  $\mu$ M. para el caso de NAO17 la  $CI_{50}$  en ambos tipos celulares fue mayor a 200 $\mu$ M.

**Tabla 5. Citotoxicidad de NAO14 y NAO17 en macrófagos J774:A1 y en fibroblastos L929**

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)	
	J77A. A1	L929
NO14	132	>200
NAO17	>200	>200

#### 4.2.5) Estudios de mutagenicidad de los compuestos de la serie 2.

La mutagenicidad de los compuestos se estudió a través del ensayo de AMES (mutación reversa en *Salmonella typhimurium*) [254]. En la tabla 6 se resumen los principales resultados sobre la mutagenicidad de los compuestos NAO14 y NAO17 examinados utilizando 5 cepas de *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102) y de acuerdo a la OECD con y sin activación de S9 [255]. Como controles positivos se utilizaron el 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4- NPD), azida de sodio (NAAz) y el 2-aminofluoreno (AF). Las colonias revertientes se contaron manualmente y se compararon con el número de revertientes espontáneos. Los compuestos se consideran mutagénicos cuando el número de colonias revertientes es al menos el doble de las revertientes espontáneas durante al menos dos niveles de dosis consecutivos [256]. De acuerdo con este criterio, ninguno de los compuestos liberadores de \*NO probados ni sus potenciales metabolitos sanguíneos fueron mutagénicos.



Tabla 6. Número de colonias revertientes en 5 cepas de *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA102) en presencia de NAO14 y NAO17

	D <sup>(a)</sup>	Número de colonias revertientes (colonias/placa)									
		TA98		TA100		TA1535		TA1537		TA102	
		0% S9	10% S9	0% S9	10% S9	0% S9	10% S9	0% S9	10% S9	0% S9	10% S9
NAO14	400.00	31±25	17±2	58±7	102±28	10±1	15±3	5±1	7±1	340±11	290±1
	133.33	13±8	14±1	91±3	102±0	11±4	15±3	2±0	4±1	257±1	212±26
	44.44	9±1	18±4	78±3	92±16	11±4	7±1	2±1	3±2	270±5	196±36
	14.80	14±2	11±3	77±16	86±4	7±1	10±4	4±1	2±1	311±6	250±13
	4.90	6±1	10±1	96±32	101±1	7±1	9±0	2±1	3±1	312±60	293±33
	0.00	10±3	14±1	106±10	99±7	106±10	99±7	5±2	4±1	304±21	205±24
NAO17	40.00	9±2	22±7	89±16	119±5	8±1	13±1	3.5±0.7	3.5±0.7	284.5±20.5	286±18
	13.33	12±1	17±3	58±1	102±3	6±1	10±1	2.0±1.4	4.5±0.7	239.5±14.8	198±26
	4.44	12±0	24±2	68±8	109±2	7±1	6±0	5.0±1.4	4.0±1.4	201.0±5.7	200±23
	1.48	15±5	18±1	99±21	107±24	8±3	8±1	3.0±0.7	2.5±0.7	238.5±3.5	221±171
	0.490	17±2	15±1	96±7	98±6	8±1	6±1	3.0±2.0	3.0±0.0	272.5±34.6	321±3
	0.00	12±3	14±2	88±20	97±10	106±10	99±7	5.0±2.0	4.0±0.8	304.0±21.0	205±24
4-NPD <sup>(b)</sup>		769		430							
NAAZ <sup>(c)</sup>						418		131		422	
AF <sup>(d)</sup>			740		303		345		217		290

[<sup>a</sup>]D: dosis en  $\mu$ /placa; [<sup>b</sup>]4-NPD: 4-nitro-o-fenilendiamina; [<sup>c</sup>]NAAZ: Azida de sodio; [<sup>d</sup>]AF: 2-aminofluoreno. Valores expresados como el promedio  $\pm$  SEM.

#### 4.2.6) Ensayos de toxicidad *in vivo*. Test de toxicidad oral aguda y test de Micronúcleos.

Posteriormente, se realizaron estudios relacionados con la bioseguridad, particularmente, la capacidad de los análogos de tocoferol-liberadores de \*NO de causar daño al ADN. Con ese fin, se seleccionó el compuesto NAO17 para su evaluación usando la prueba de micronúcleos (MN) *in vivo* en médula ósea de ratones [257]. Para seleccionar la dosis apropiada para el ensayo, primero se llevó a cabo un ensayo de toxicidad aguda *in vivo* siguiendo el procedimiento para el test "up and down" descrito por O.E.C.D [258] (tabla 7). Se determinó una dosis letal 50 LD<sub>50</sub>> 2000 mg/kg para el NAO17. Posteriormente se usó esta misma dosis de 2000 mg/kg para llevar a cabo el test de micronúcleos *in vivo*. Los resultados de citotoxicidad en la médula ósea, expresados como relación de eritrocitos policromáticos (PCE) a eritrocitos normocromáticos (NCE), y el porcentaje de MN registrados 24 h después de una dosis de 2000 mg/kg vía oral de NAO17, se presentan en la tabla 8. Como se puede apreciar, los resultados mostraron diferencias significativas en la relación PCE/NCE entre el grupo experimental y el control positivo. NAO17 no indujo la frecuencia de MN en los eritrocitos inmaduros en la dosis probada. Sin embargo, el

tratamiento con ciclofosfamida (control positivo) indujo un aumento significativo en la frecuencia de MN.

**Tabla 7.** Ensayo de *up & down* para el estudio de la toxicidad de NAO17.

<b>Animal</b>	<b>Dosis mg/kg</b>	<b>Corto plazo</b>	<b>Largo plazo</b>
<b>1</b>	<b>2000</b>	<b>O</b>	<b>O</b>
<b>2</b>	<b>2000</b>	<b>O</b>	<b>O</b>
<b>3</b>	<b>2000</b>	<b>O</b>	<b>O</b>
<b>4</b>	<b>2000</b>	<b>O</b>	<b>O</b>
<b>5</b>	<b>2000</b>	<b>O</b>	<b>O</b>

X=Muerte, O=Sobrevivió, Corto plazo=48h, Largo plazo=14 días.

**Tabla 8. Resultados del ensayo de micronúcleos de NAO17.** Citotoxicidad de la médula ósea expresada como proporción de eritrocitos policromáticos micronucleados (PCE) y eritrocitos normocromáticos (NCE) y la inducción de micronúcleos expresada como % MN.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>N</b>	<b>PCE/NCE</b>	<b>%MN</b>
<b>NAO17</b>	<b>2000</b>	<b>5</b>	<b>1.001 <math>\pm</math> 0.086</b>	<b>0.050 <math>\pm</math> 0.075</b>
<b>Vehículo</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>1.014 <math>\pm</math> 0.114</b>	<b>0.075 <math>\pm</math> 0.104</b>
<b>Ciclofosfamida</b>	<b>100</b>	<b>3</b>	<b>0.464 <math>\pm</math> 0.106*</b>	<b>0.908 <math>\pm</math> 0.317*</b>

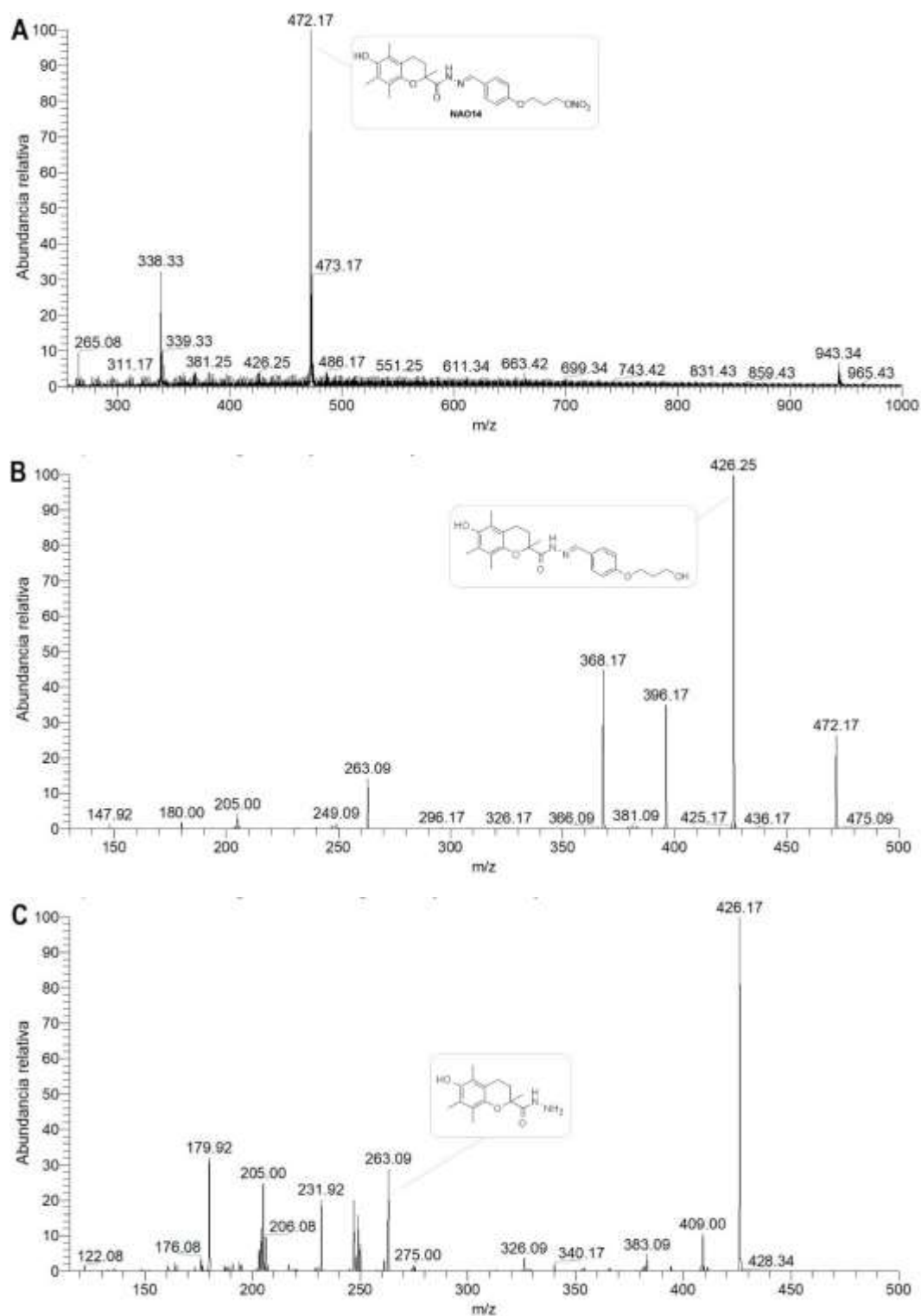
Todos los valores se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas, determinadas por ANOVA de una vía seguido de un posterior test de Dunnet, se indican como \* (comparación con el control negativo  $p < 0,0001$ ).

***A continuación, analizaremos los resultados obtenidos durante el desarrollo de mi tesis doctoral.***

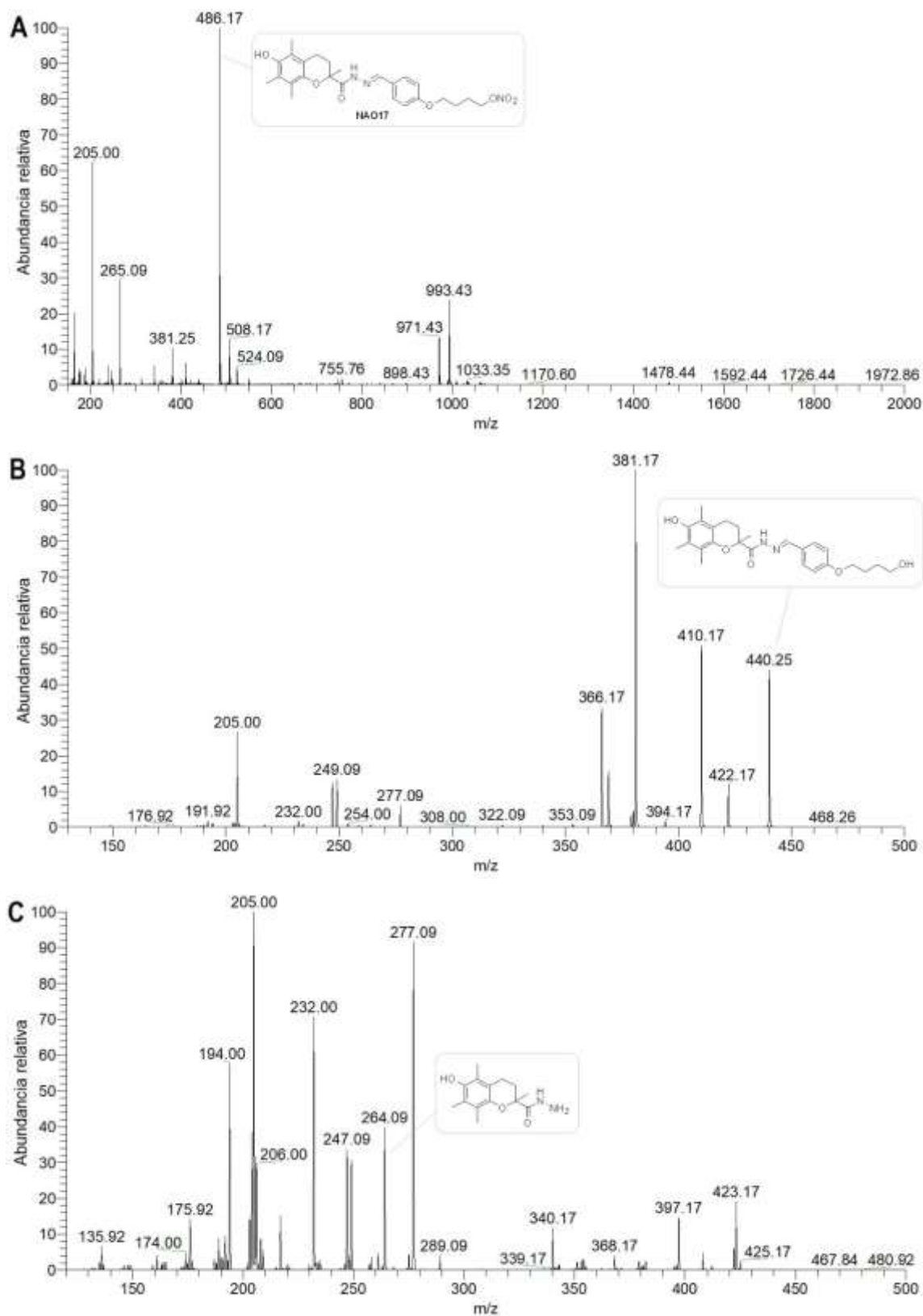
#### **4.2.7) CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.**

##### **4.2.7a) Desarrollo de técnicas analíticas para la determinación de análogos de $\alpha$ -tocoferol liberadores de óxido nítrico.**

**Caracterización de los compuestos por Espectrometría de masa.** Inicialmente, lo primero que realizamos fue la caracterización por espectrometría de masa. Para ello analizamos los compuestos en un espectrómetro de masa LTQ velos con trampa iónica lineal de alta sensibilidad. La figura 50 y 51 muestran los espectros de masa ("full scan"  $MS^2$  y  $MS^3$ ) de los compuestos NAO14 y NAO17, Respectivamente:



**Figura 50. Espectros de masa del compuesto NAO14 en modo positivo. A)** Espectro "full scan" de NAO14. **B)** Espectro de MS<sup>2</sup> del pico 472.17. **C)** Espectro de MS<sup>3</sup> de 472.17/426.25. Ión molecular del NAO17 471.22 Da.

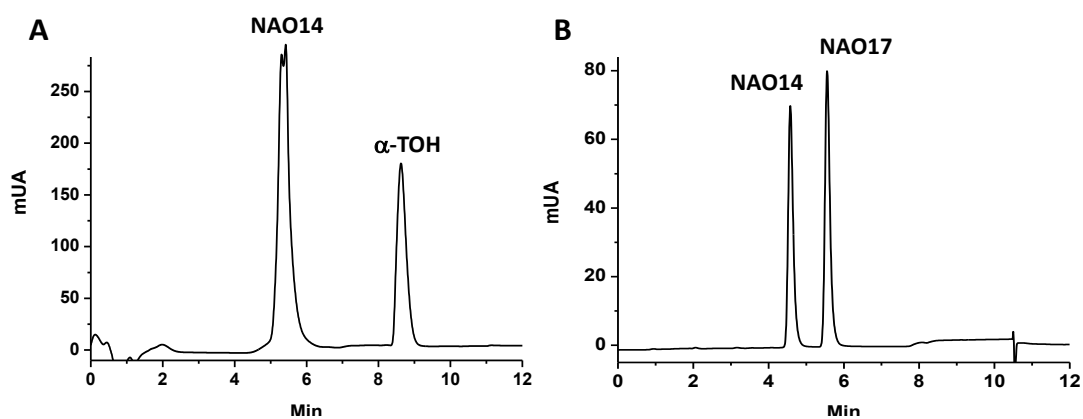


**Figura 51. Espectros de masa del compuesto NAO17 en modo positivo. A)** Espectro "full scan" de NAO17. **B)** Espectro de MS<sup>2</sup> del pico 486.17. **C)** Espectro de MS<sup>3</sup> de 486.17/440.25. Ión molecular del NAO17 485.22 Da.

Para los dos compuestos el ion mayoritario corresponde al ion parental monocargado  $[M+H]^+$  con la relación masa/carga ( $m/z$ ) esperada (figura 50A y 51A). Para el caso de NAO14 el  $m/z$  fue de 472.17 y para el NAO17 el  $m/z$  fue de 486.17. Además, realizamos experimentos de MS/MS con el objetivo de encontrar los patrones de fragmentación con miras a futuros estudios de detección en diferentes matrices biológicas y así poder usar estas transiciones para la detección de estos compuestos (figura 50 B-C y 51 B-C).

### Análisis de los compuestos por HPLC en fase reversa.

Posteriormente, desarrollamos dos métodos cromatográficos para la detección de los compuestos liberadores de  $\cdot\text{NO}$  en diferentes condiciones experimentales. La figura 52 muestra los cromatogramas de los dos métodos desarrollados.

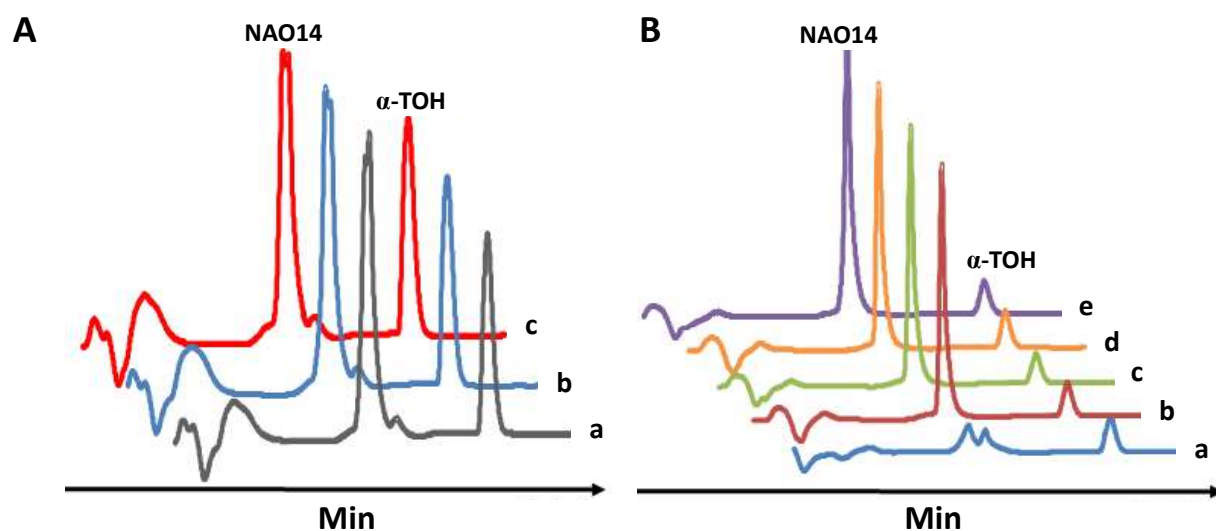


**Figura 52. Métodos cromatográficos desarrollados para la detección de los compuestos liberadores de  $\cdot\text{NO}$  y tocoferoles. A)** Método cromatográfico A. (Gradiente 50%-100% B en 10 min); Tiempos de retención: NAO14, 5.5 min;  $\alpha$ -TOH, 8.5 min. **B)** Método cromatográfico B. (Gradiente 50%-57% B en 12 min); Tiempos de retención: NAO14, 4.5 min; NAO17, 5.5 min. Fase A:  $\text{H}_2\text{O}$  0.1% ácido fórmico; Fase B: ACN 0.1% ácido fórmico.

El primer método fue desarrollado con el objetivo de detectar a los compuestos en el plasma humano y en soluciones a diferentes pH. Por el contrario, el segundo método fue desarrollado para analizar la incorporación de los compuestos a las lipoproteínas humanas *in vitro*.

#### 4.2.7b) Estudios de estabilidad en plasma y en soluciones a diferentes pH del NAO14.

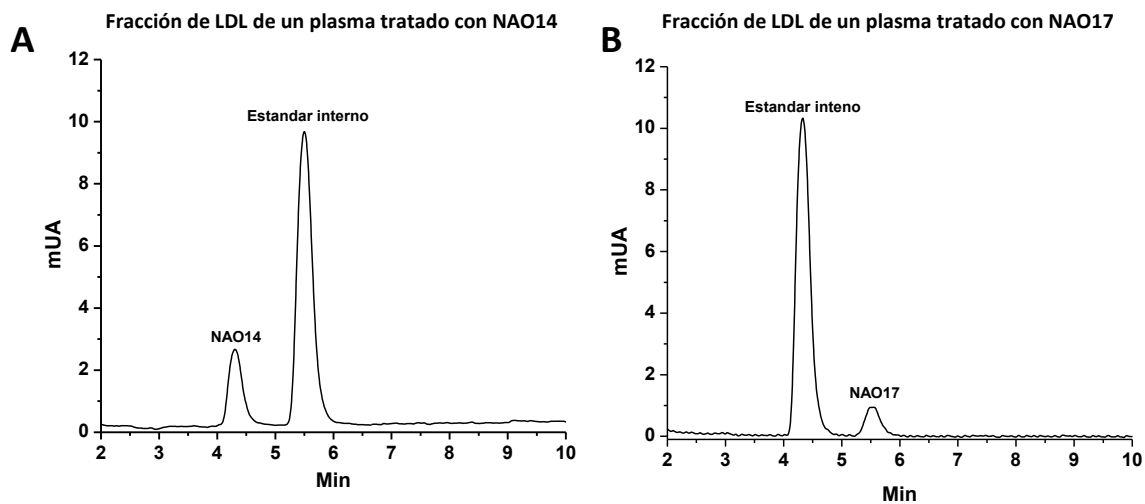
Para este propósito, considerando que NAO14 y NAO17 tienen los mismos grupos funcionales con similitudes estructurales, seleccionamos uno de ellos para realizar estos estudios. Por lo tanto, incubamos al NAO14 en plasma durante diferentes períodos de tiempo y luego extrajimos las moléculas pequeñas del plasma precipitando las proteínas con acetona a 4°C. El sobrenadante fue analizado por HPLC en fase reversa. De la misma manera, NAO14 se incubó en diferentes buffer a distintos pHs durante 45 min, luego se extrajo y se analizó mediante HPLC en fase reversa. Se observó que en las condiciones evaluadas a 37 °C, NAO14 era estable en plasma (figura 53A) y en soluciones acuosas básicas a ligeramente ácidas (pH 9 a 4.5). En soluciones ácidas (pH 1), como el líquido presente en la luz del estómago, causan una pérdida significativa de la estabilidad de NAO14 (figura 53B) como era de esperar para un nitrato orgánico en medio ácido fuerte. Estos resultados deben considerarse cuando se utilice este compuesto *in vivo*, ya que, en caso de administración oral, la biodisponibilidad puede verse muy afectada.



**Figura 53. Estabilidad de NAO14 en plasma y en distintos pH.** **A)** Cromatogramas correspondientes a la incubación de NAO14 (0.32 mM) en plasma humano durante 0 h (a), 2 h (b), 4 h (c). **B)** Cromatogramas correspondientes a la incubación de NAO14 (0.32 mM) en diferentes soluciones a distintos valores de pHs durante 45 min (a: HCl 20 mM pH 1, b: AcONH<sub>4</sub> 20 mM pH 4.5, c: K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 6.6, d: K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 7.4, e: AcONH<sub>4</sub> 20 mM de pH 9). Se utilizó  $\alpha$ -TOH como estándar interno.

#### 4.2.7c) Estudio de la incorporación *in vitro* de los compuestos a lipoproteínas humanas.

A continuación, evaluamos si los compuestos liberadores de  $\cdot$ NO podrían incorporarse a las lipoproteínas humanas en el plasma. Para esto, los compuestos se incubaron con plasma humano a 37 °C durante 6 h y luego se purificaron las lipoproteínas por ultracentrifugación en gradiente de KBr para obtener las fracciones de VLDL y LDL, así como una fracción de plasma de alta densidad que contiene a las HDL. Luego, las diferentes fracciones lipoproteicas se extrajeron con acetonitrilo (ACN) y se analizaron mediante HPLC en fase reversa. Una cantidad significativa de los compuestos fueron recuperados en las fracciones VLDL/quilomicrones y LDL (tabla 9). Los cromatogramas para la fracción de LDL se ilustran en la figura 54. El área bajo los picos se usó para determinar el porcentaje de compuestos liberadores de  $\cdot$ NO recuperados en esta fracción de lipoproteína. En las condiciones ensayadas, aproximadamente el 15% y el 10% de la cantidad total (25 nmol) de NAO14 y NAO17 incubados con el plasma, fueron recuperados en la fracción de LDL, respectivamente.



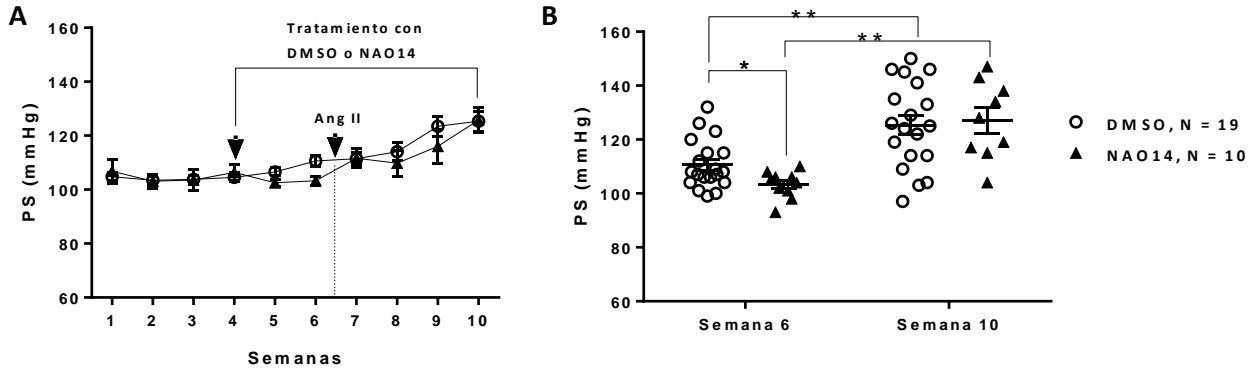
**Figura 54. Incorporación de los compuestos liberadores de NO a lipoproteínas humanas.** Se incubó plasma humano (1mL) con 25 nmol de NAO14 o NAO17 durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente, cada fracción de lipoproteína se obtuvo por ultracentrifugación en gradiente de KBr. La incorporación de NAO14 o NAO17 a lipoproteínas se evaluó mediante una extracción orgánica con ACN (9:1 v/v) de cada fracción lipoproteica y posterior inyección al HPLC. Como control, se añadió un patrón interno (ISTD, 15 nmol) a la fracción de lipoproteína antes de la extracción. El panel A y B muestran cromatogramas representativos de las fracciones de LDL obtenidas de plasma incubadas con NAO14 y NAO17 respectivamente.



#### **4.2.8) ANÁLISIS *IN VIVO* DEL EFECTO NAO14 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATONES C57BL/6.**

Por último, examinamos el efecto del NAO14 sobre un modelo de hipertensión arterial inducido por Ang II en ratones C57BL/6. Para ello se utilizaron ratones C57BL/6 a los cuales tratamos con NAO14 (20 mg/kg/día, n = 10) o vehículo (DMSO, n = 19). El diseño experimental implicó un registro basal de la presión arterial (PA) durante de 4 semanas. Luego, se realizó una etapa de registro y pre-tratamiento (antes de la colocación de las bombas) por 2 semanas y administración de NAO14 20mg/kg/día o vehículo (DMSO) vía sub cutánea, en forma trisemanal (lunes, miércoles, viernes). Posteriormente se procedió a la cirugía para la colocación de las bombas osmóticas que infunden Ang II (1 mg/kg/día; ver materiales y métodos). Finalmente, se realizó la etapa de registro y tratamiento (luego de la colocación de bombas) durante 4 semanas, la cual consistió en el registro de la PA en los ratones a la vez que se continuaba con el tratamiento con NAO14 o vehículo. El gráfico 55 muestra los valores de PS en función del tiempo para los grupos tratados con DMSO (grupo control) y NAO14. En la observación longitudinal, los promedios de PS basales se mantuvieron estables en ambos grupos. En la figura 55B se observa que el promedio de PS en la semana 6 fue  $111 \pm 2$  y  $103 \pm 2$  mmHg para el grupo control y NAO14, respectivamente. Encontramos en estos valores una diferencia estadísticamente significativa. Ambos grupos incrementan su PS por el tratamiento con Ang II al comparar la semana 6 vs la semana 10. El grupo tratado con NAO14 presentó un incremento en su PS de 22% respecto de la semana 6 (valor promedio PS de la semana 10 =  $126 \pm 5$  mmHg). El grupo control presentó un incremento de la PS a partir de la semana 6 de 13% (valor promedio PS de la semana 10 =  $125 \pm 4$

mmHg). Los valores de PS de ambos grupos para la semana 10 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.



**Figura 55. Efectos del NAO14 en un modelo de hipertensión arterial inducida por Ang II. A)** Valores promedios de PS dependiendo de las semanas para los grupos tratados con vehículo (DMSO) o NAO14. Los valores se expresan  $\pm$  SEM. Flecha izquierda: indica el inicio del pretratamiento. La duración total del tratamiento está definida. Flecha derecha: indica el inicio del tratamiento con AngII. **B)** Valores individuales de Presión Sistólica (PS) en las semanas 6 y 10 de los grupos DMSO y NAO14. El promedio de PS de la semana 10 en ambos grupos son mayores respecto de la semana 6 con una diferencia estadísticamente significativa (test de t para muestras pareadas, el valor  $p^{**}$  del grupo control es 0.0032 y del grupo NAO14 es  $p^{**}$  0.0021). La PS de la semana 6 en el grupo control es mayor respecto del grupo NAO14, con una diferencia estadísticamente significativa (test de t muestras no pareadas valor  $p^*$  0.026).

## V) DISCUSIÓN

## V) DISCUSIÓN.

Las enfermedades metabólicas crónicas, en particular las cardiovasculares, representan desde el punto de vista de su prevalencia y costos un problema importante para la mayor parte de los sistemas de salud en todo el mundo. Los estilos de vida modernos, que incluyen el sedentarismo y las dietas altas en calorías (incluyendo un alto consumo diario de azúcar) han llevado a un aumento dramático en la incidencia de estas patologías, de las cuales las enfermedades cardiovasculares son las más importantes en términos de morbilidad [69]. Entre las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis es un problema de salud muy importante, que provoca entre el 30 y el 50% de las muertes en todo el mundo [259].

Aunque la patogénesis precisa de la enfermedad es compleja y aún no se comprende por completo, en la última década, se ha reconocido que un proceso inflamatorio crónico, leve y estéril tiene un rol fundamental en el desarrollo y progresión de esta patología [140, 260]. Durante el proceso patogénico de la aterosclerosis existen varios eventos importantes como ser la pérdida de la función normal del endotelio (disfunción endotelial), retención y acumulación de lipoproteínas en el espacio subendotelial, reclutamiento de células inmunes, y formación de células espumosas (figura 9). Todos estos procesos llevan a la formación, desarrollo y ruptura de una placa de ateroma en sitios particularmente susceptibles del lecho arterial vascular. La inflamación y el estrés oxidativo vascular (predominio de la formación y reacciones de los oxidantes sobre la de los antioxidantes), particularmente cuando se asocia con la modificación/oxidación de la LDL, son un componente patogénico principal en el proceso aterogénico [141-143] (figura 9).

***El objetivo general de mi tesis doctoral fue el desarrollo de una nueva estrategia farmacológica para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis.*** Para ello tuvimos en cuenta las propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas del óxido nítrico y de los nitroalquenos endógenos (ácidos grasos insaturados y nitrados) así como el metabolismo del  $\alpha$ -TOH, el cual está íntimamente asociado al de las lipoproteínas.

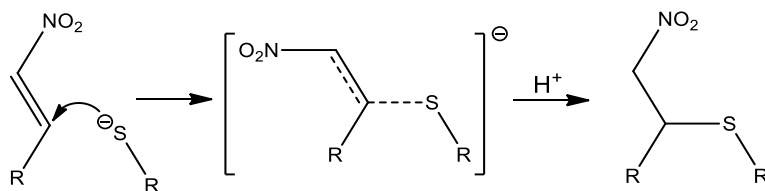
A la luz de los nuevos conocimientos que jerarquizan el rol de la inflamación crónica, a bajo ruido y estéril como un elemento central en la patogenia de la aterosclerosis, diseñamos, sintetizamos

y desarrollamos un nitroalqueno derivado del  $\alpha$ -tocoferol incorporándole a su anillo cromanol un grupo nitroalquenilo, con propiedades antiinflamatorias reconocidas (figuras 14 y 18). El objetivo del diseño de este potencial fármaco era lograr un compuesto que tuviera dos propiedades juntas en una misma molécula: 1. acciones anti-inflamatorias/anti-aterogénicas; 2. transporte selectivo en el organismo a través de las lipoproteínas y capacidad de llegar hasta los sitios mismos de las lesiones, donde podrán ejercer sus efectos antiinflamatorios. Por otro lado, y dado que otro conjunto de ECV no dependen exclusivamente del proceso aterogénico (HTA, diabetes tipo II, etc.), pero que también en su patogenia se reconoce un rol clave a la respuesta inflamatoria crónica, nos propusimos sintetizar un segundo compuesto que presentase propiedades antiinflamatorias no convencionales, pero una farmacocinética y farmacodinamia diferente y no asociada al metabolismo de las lipoproteínas. Para ello, utilizamos como núcleo estructural del nuevo compuesto al análogo hidrosoluble de la Vitamina E, Trolox<sup>®</sup>, al que le incorporamos un grupo nitroalquenilo (figura 19, **4b**).

La síntesis de ambos compuestos se hizo de acuerdo a rutas propuestas en la literatura y pudimos comprobar por RMN y espectrometría de masa de alta resolución que los productos de las mismas fueron los esperados. *En las figuras 20 y 21 se muestran los espectros de <sup>1</sup>H RMN del NATOH y NATxME donde observamos todas las señales correspondientes a los diferentes protones de los compuestos, en particular los del grupo nitroalquenilo donde a partir de las constantes de acoplamiento podemos inferir que en ambos casos se obtuvo el isómero E únicamente.* Además, examinamos el producto final de la síntesis por espectrometría de masa de alta resolución y como se observa *en las figuras 22 y 23, vemos que los productos tenían la relación masa/carga y, la fragmentación, esperada.*

Luego de la síntesis de los compuestos, procedimos a su caracterización fisicoquímica. Primero obtuvimos los espectros UV-Visible de los nitroalquenos análogos del tocoferol y luego calculamos el coeficiente de extinción molar a su  $\lambda$  máxima de absorción para ambos compuestos (figura 24 A y B; respectivamente). A continuación, analizamos las propiedades electrofílicas de estos compuestos, primero incubándolos con  $\beta$ ME siguiendo la reacción por espectrofotometría UV-Vis y RP-HPLC, demostrando que los compuestos son electrófilos (figuras 25 y 26). Más aun, nos propusimos estudiar a fondo la cinética de la reacción entre los nitroalquenos derivados del

tocoferol y nucleófilos de baja masa molecular como el  $\beta$ ME y GSH, tanto en soluciones acuosas como en sistemas heterogéneos como son las soluciones micelares con diferentes detergentes y liposomas. *Nuestros estudios cinéticos mostraron que la reacción de adición entre nuestros nitroalquenos de síntesis y los tioles de baja masa molecular difiere significativamente cuando la reacción se lleva a cabo en un sistema microheterogéneo como la dispersión micelar vs. una solución acuosa [261] (figura 27 y tabla 3). La tendencia esperada de la reactividad en solución acuosa es que el GSH debe ser más rápido que el  $\beta$ ME a pH neutro, dado que el tior de GSH es un ácido más fuerte que el del  $\beta$ ME y, por lo tanto, una fracción más alta de tiorato estará disponible para la reacción a ese pH (tabla 3). Los efectos de las micelas en las reacciones electrófilas en general son complejos y multifactoriales y han sido estudiados a través de numerosos enfoques experimentales y a lo largo de mucho tiempo. En este trabajo, intentamos analizar los diferentes efectos de las micelas, aprovechando las propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad), ácido-base y ópticas tanto del NATOH como del NATxME, que comparten el mismo grupo funcional y cromóforo, pero difieren en su solubilidad en agua. *La dispersión micelar ejerce al menos tres efectos sobre la velocidad de reacción. Primero, el pH en la interfaz surfactante-agua se ve afectado por la carga de los grupos de cabeza de los detergentes. Por ejemplo, las micelas aniónicas de SDS atraen iones  $H^+$  causando una caída en el pH interfacial con relación a la solución en general. En segundo lugar, el estado de transición de la reacción de adición tiene una carga negativa que también se estabiliza diferencialmente por la carga de la micela y, en todos los casos, se desestabiliza por la menor constante dieléctrica del interior hidrofóbico (figura 56).**



**Figura 56.** Mecanismo de la reacción de adición de tioles a nitroalquenos.

*Por lo tanto, se espera que la reacción sea más lenta debido al medio hidrofóbico y más si la carga de la micela es negativa. Finalmente, la carga del nucleófilo afecta su partición en el interior hidrofóbico de la micela. En este aspecto, tanto GSH como  $\beta$ ME como tioratos son*

nucleófilos aniónicos, pero GSH tiene las cargas adicionales de los grupos amino y los dos grupos carboxilatos, lo que lo hace mucho menos estable en entornos hidrofóbicos. Los dos primeros efectos son compartidos por ambos tioles ya que las reacciones se enlentecen por el entorno hidrofóbico de la micela y se afectan de manera similar por el pH superficial de las micelas cargadas (tabla 3). La partición diferencial de los tiolatos favorece a  $\beta$ ME más que a GSH. La constante de velocidad a pH 7.1 de las reacciones de  $\beta$ ME con NATxME en una solución acuosa fue mayor que la de NATOH en micelas CHAPS (349 frente a  $83 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , tabla 3). Esto es probablemente debido a la desestabilización tanto del nucleófilo del tiolato como del estado de transición aniónico de la reacción debido a la menor constante dieléctrica en la micela. La misma comparación para las reacciones de GSH produce una caída más dramática en las constantes de velocidad (1370 frente a  $100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , tabla 3), lo que subraya la importancia relativa de la carga del nucleófilo. En el contexto de la actividad biológica de NATOH, su división en compartimentos hidrofóbicos (tales como membranas, lipoproteínas o el área de almacenamiento de grasa de los adipocitos) determinará una parte importante de su reactividad electrofílica. La superficie de dichos compartimentos está compuesta de lípidos aniónicos, neutros y zwitteriónicos que disminuirán significativamente la velocidad de reacción con tioles cargados tales como GSH, evitando así su rápida excreción. Por otro lado, un tiol de una proteína capaz de interactuar con una interfaz lípido-agua y, si tanto el tiolato de ataque como el estado de transición de la reacción de adición, se estabilizan por el entorno proteico, el resultado sería una interacción específica capaz de producir efectos biológicos incluso a bajas concentraciones del electrófilo. En definitiva, los efectos de la partición hidrofóbica y la carga en la interfaz lípido-agua pueden proteger electrófilos tales como NATOH de la adición a GSH y otros tioles inespecíficos y solubles en agua.

Por último y para terminar con los estudios fisicoquímicos de los compuestos, nos propusimos analizar si la adición del grupo nitroalquenilo a la subestructura del  $\alpha$ -TOH podría afectar su capacidad antioxidante. En la figura 30 podemos observar que la adición de este grupo antiinflamatorio no afectó de forma significativa la capacidad antioxidante, de manera que cuando evaluemos sus efectos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, sabremos que si encontramos diferencias con respecto al  $\alpha$ -TOH, entonces estos efectos solo serían debidos a la presencia del grupo nitroalquenilo.

Los ácidos grasos insaturados y nitrados son nitroalquenos endógenos electrofílicos que reaccionan con residuos de histidina y cisteína de proteínas susceptibles a través de la reacción de adición de Michael, induciendo alteraciones en la estructura, función y distribución subcelular de dichas proteínas [174, 262]. Estas moléculas ejercen efectos pleiotrópicos anti-inflamatorios y citoprotectores actuando sobre una serie de vías de señalización claves que facilitan la resolución de los procesos de inflamación *in vivo* [195, 262]. En esta tesis, no solo hemos cambiado la cadena de acilo del nitroalqueno, sino que diseñamos y sintetizamos dos compuestos donde el grupo nitroalquenilo está conjugado con un anillo de cromanol, con el objetivo de mantener las propiedades biológicas del grupo nitroalquenilo pero dotándolo de nuevas propiedades farmacológicas al cambiar su biodisponibilidad y sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, en función del núcleo estructural elegido para su diseño (el  $\alpha$ -tocoferol).

Nuestros datos demuestran que *in vitro* el NATOH inhibe la vía de señalización de NF- $\kappa$ B: 1. inhibió la translocación de p65 al núcleo (figura 34), 2. así como la expresión de IL-6, MCP-1 e IL-1 $\beta$  *in vitro* (figura 35 y 36). Además, su análogo hidrosoluble, el NATxME, no solo fue capaz de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B (IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ ) (figura 37), sino que además demostramos que este compuesto inhibe al inflamasoma NLRP3 (figura 38). Cabe destacar que ese complejo proteico tiene un rol principal en muchas patologías, como las enfermedades cardiovasculares en general, y la aterosclerosis en particular [60, 63, 84, 263]. Además, *in vitro*, ambos compuestos fueron capaces de inducir el sistema Nrf2-Keap1 (figura 39 y 40), un importante regulador de las respuestas citoprotectoras al estrés endógeno y exógeno mediado por especies reactivas de oxígeno/nitrógeno y electrófilos, y desempeña un papel importante en la protección contra la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares [190, 204, 233, 264].

Está bien establecido que entre todos los isómeros incluidos bajo el nombre genérico de Vitamina E, el  $\gamma$ -TOH es el más abundante en la dieta, mientras que el  $\alpha$ -TOH es el más abundante en el organismo [265]. Y este último es casi exclusivamente el único en las lipoproteínas de síntesis endógena. Yoshida et al. aisló y caracterizó una proteína de unión a tocoferol del citosol de células de hígado de rata [266]. Esta proteína incorpora preferentemente  $\alpha$ -TOH en partículas



de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), de síntesis hepática [29, 265, 266]. Las otras formas de vitamina E se absorben de forma similar al  $\alpha$ -TOH y alcanzan el hígado en restos de quilomicrones, pero en su mayor parte se excretan en la bilis con el exceso de  $\alpha$ -TOH [29, 267, 268]. Por lo tanto, fue muy importante para nuestro estudio demostrar que la modificación que introducimos en la estructura de cromanol de la molécula de tocoferol no inhibiría ni su absorción intestinal ni su posterior distribución a través del plasma a lo largo del cuerpo, incluido su transporte asociado a las lipoproteínas de síntesis endógena (VLDL/LDL). Mostramos que el NATOH se incorporó a las LDL humanas *ex vivo* (figura 31) utilizando el mismo protocolo que se desarrolló para aumentar el contenido de  $\alpha$ -TOH de LDL [227]. Pero lo más importante fue que demostramos que cuando tratamos ratones ApoE knockout con NATOH por vía oral, el compuesto estaba presente en el plasma (figura 41) y en la fracción de las VLDL/LDL (figura 42). Además, pudimos demostrar que el mismo es capaz de llegar a las placas de ateroma (figura 43), pilar importante de nuestra estrategia farmacológica. Particularmente en nuestros experimentos, buscamos el NATOH en la fracción de lipoproteínas VLDL/LDL porque los ratones ApoE knockout demuestran un perfil de lipoproteínas diferente que el de los humanos, con más VLDL que LDL debido precisamente a la ausencia de apolipoproteína E [238, 239].

Las modificaciones oxidativas y de otro tipo confieren propiedades a las LDL que se consideran relevantes para la aterogénesis, lo que conduce a la "hipótesis de modificación oxidativa" de la aterosclerosis [72, 141-143]. Como consecuencia, los antioxidantes deberían reducir la aterosclerosis [72]. De hecho, se ha demostrado que la vitamina E enlentece la aterosclerosis en modelos animales [26, 240, 269], pero no así en humanos [270-272]. *Nuestros resultados demuestran que agregar un grupo funcional antiinflamatorio no convencional a la estructura de cromanol del  $\alpha$ -TOH mejora las propiedades antiaterogénicas de la vitamina E ya que los ratones tratados con NATOH desarrollaron menos placa de aterosclerosis que los tratados con la misma cantidad de  $\alpha$ -TOH, producto de una menor cantidad de lesiones (figura 44 A y B).* Esto es interesante, ya que en los humanos la efectividad del uso de vitamina E u otros fármacos antioxidantes en ensayos clínicos han sido, en el mejor de los casos, contradictorios [270-272]. Es importante destacar que en nuestros experimentos los animales fueron tratados por vía orogástrica y en una dosis similar a la utilizada para pacientes inscritos en diversos ensayos

clínicos con vitamina E (p. ej. 800 UI/día) [272]. En paralelo, encontramos que en estos animales los niveles de expresión de marcadores proinflamatorios (ICAM-1, VCAM-1, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) involucrados en el desarrollo de la enfermedad, estaban disminuidos de manera significativa a nivel de las lesiones presentes en la aorta (figura 44 D) de los animales tratados con NATOH vs. los tratados con  $\alpha$ -TOH. *La disminución de estos marcadores, podría ser al menos parcialmente, la explicación molecular de los efectos de nuestro compuesto.*

Desde una perspectiva clínica, un nuevo enfoque terapéutico se centra actualmente en la inhibición de la vía de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  como blanco terapéutico para el tratamiento de la aterosclerosis y sus complicaciones [273-275]. De hecho, Ridker et al. recientemente han demostrado que la inhibición de IL-1 $\beta$  con Canakinumab, un anticuerpo monoclonal humano anti-IL-1 $\beta$ , condujo a una tasa significativamente menor de eventos CV mayores versus el placebo [220, 276]. Como consecuencia no deseada, este anticuerpo se asoció con una mayor incidencia de infecciones mortales [220], lo que sugiere que una inhibición completa de la vía de señalización de IL-1 $\beta$  puede no ser deseable. Interesantemente, nuestro nuevo análogo nitroalqueno del tocoferol, NATOH, actuó como un fármaco antiinflamatorio no convencional que disminuye la secreción y la expresión de citoquinas proinflamatorias, incluyendo la IL-1 $\beta$  y moléculas de adhesión, implicadas en la patogénesis de la aterosclerosis.

También probamos los efectos del NATOH en un modelo de hipertensión arterial inducido por angiotensina II, demostrando que el mismo fue capaz de inhibir el aumento de la presión arterial inducida por este péptido vasoactivo (figura 45). Si bien nosotros no analizamos los mecanismos moleculares que podrían explicar este resultado, sabemos que en la génesis de la hipertensión arterial inducida por Ang II, juega un rol muy importante la formación de una respuesta inflamatoria a nivel vascular, con un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno debido a la activación de la NAD(P)H oxidasa vascular tanto de células endoteliales como de las células de músculo liso [277-281]. Por tanto, nuestro compuesto podría estar inhibiendo esta respuesta inflamatoria, actuando a través de las diferentes vías que ya comentamos (inhibición de NF- $\kappa$ B). Más aún, estos resultados también podrían explicarse a la luz de otros resultados reportados para los ácidos grasos nitrados, que muestran que estos

nitroalquenos inhiben el efecto de la angiotensina II actuando a nivel del receptor AT1 de esta hormona [206], o directamente a nivel de la NAD(P)H oxidasa vascular [207].

Finalmente, también analizamos los efectos del NATxME en un modelo de vertebrados de inflamación estéril aguda *in vivo* (figura 46). Para ello, utilizamos larvas de pez cebra transgénicas que expresan GFP en neutrófilos para poder seguir directamente, en tiempo real, el reclutamiento de neutrófilos a un sitio específico donde se infringe una lesión mecánica (corte con escalpelo). Este modelo ha sido extensamente caracterizado en los últimos diez años, demostrando la conservación de los mecanismos celulares y moleculares con procesos inflamatorios agudos en mamíferos [243, 282], y permitiendo el descubrimiento y prueba de compuestos antiinflamatorios [283, 284]. En este trabajo demostramos que NATxME inhibe el reclutamiento de neutrófilos en el tejido lesionado, lo que demuestra aún más sus propiedades antiinflamatorias (figura 46 B-C). Los mecanismos moleculares y celulares precisos involucrados en este sistema *in vivo* aún no los hemos determinado y serán el foco de nuestro futuro trabajo. No obstante, es interesante observar que varios estudios en el pez cebra han demostrado el requisito de la activación de NF- $\kappa$ B y la secreción de interleuquina en el sitio de la lesión como un paso crítico que regula el reclutamiento de leucocitos [285-287].

Por otra parte también, se completó la caracterización fisicoquímica y biológica de una serie de compuestos análogos de  $\alpha$ -tocoferol conteniendo un grupo liberador de  $\cdot$ NO de la quimioteca de nuestro grupo de investigación (serie 2, figura 18). El raciocinio del diseño de esta serie fue desarrollar compuestos tocoferol-miméticos liberadores de  $\cdot$ NO capaces de incorporarse a las lipoproteínas, particularmente LDL, para alcanzar lesiones ateroscleróticas donde el óxido nítrico pudiera ejercer sus acciones antioxidantes y vasodilatadoras, mejorando la disfunción endotelial. Estos nuevos compuestos se sintetizaron combinando la subestructura del anillo de cromano del tocoferol y un resto nitrooxilo unido a través de una N-acilhidrazona (figura 47). Estudios previos del grupo mostraron que los compuestos son capaces de liberar  $\cdot$ NO en un medio celular y de promover la vasodilatación de los vasos aórticos por un mecanismo dependiente de  $\cdot$ NO (figura 48 y 49, tabla 7). Además, utilizando un protocolo análogo al usado para el estudio de las propiedades fisicoquímicas del NATOH, demostramos por primera vez que este tipo de análogos de tocoferol es capaz de incorporarse a la fracción de LDL humana del plasma.

Al mismo tiempo, compañeros del grupo demostraron que exhibían citotoxicidad moderada y no eran mutagénicos ni genotóxicos (tablas 5 a 8). Estos resultados sumados a los míos de estabilidad en medios biológicos relevantes (figura 53), nos permitieron determinar la seguridad de su uso en futuros modelos preclínicos. Así, explotando el conocimiento adquirido en el transcurso de mi tesis, estudiamos el efecto de uno de estos compuestos híbridos liberadores de  $\cdot\text{NO}$ , NAO14, en el modelo animal de hipertensión arterial inducida por Ang II. Es bien sabido que el endotelio es el principal controlador de la homeostasis vascular, ejerciendo efectos vasoprotectores, tales como vasodilatación, supresión del crecimiento de células de músculo liso e inhibición de respuestas inflamatorias. Muchos de estos efectos están mediados por el  $\cdot\text{NO}$ , el vasodilatador endógeno más potente. El  $\cdot\text{NO}$  combate los efectos de los vasoconstrictores derivados del endotelio (endotelina y angiotensina II). Una biodisponibilidad de  $\cdot\text{NO}$  reducida, deficiencia en su producción o actividad (p. ej. en sitios de inflamación con cantidades crecientes de especies reactivas de oxígeno), conduce a disfunción endotelial, traducida por vasodilatación dependiente del endotelio alterada, y por lo tanto iniciando una serie de eventos que promueven o exacerbaban la aterosclerosis: aumento de la permeabilidad endotelial, agregación de plaquetas, adhesión de leucocitos y generación de citocinas. En este contexto, esperábamos que el NAO14 fuera capaz de aumentar la biodisponibilidad de  $\cdot\text{NO}$  para revertir la disfunción endotelial y mitigar la progresión de la enfermedad en el mencionado modelo animal. Sin embargo, en las condiciones ensayadas esta estrategia no demostró ser eficiente, quizás porque la dosis utilizada del compuesto fue insuficiente o debido a la propia farmacodinamia de este.

En suma, durante mis estudios doctorales desarrollamos exitosamente una **nueva estrategia farmacológica para el tratamiento de la aterosclerosis** basada en el papel patogénico principal que juegan las partículas de LDL y el proceso inflamatorio crónico en el desarrollo de la enfermedad. **Diseñamos y desarrollamos un compuesto híbrido formado por una estructura mimética del  $\alpha$ -tocoferol y un grupo nitroalquenilo.** Esta novedosa concepción farmacológica busca que la molécula híbrida se incorpore en las partículas de LDL durante el metabolismo lipoproteico normal, debido a la presencia del cromanol (estructura característica del  $\alpha$ -TOH) y a

la acción específica de las proteínas transferidora de  $\alpha$ -TOH. Una vez que el compuesto híbrido sea incorporado, la LDL será la encargada de transportarlo y distribuirlo por todo el organismo, incluyendo los sitios mismos de las lesiones ateromatosas, para que el compuesto pueda ejercer las acciones anti-inflamatorias/anti-aterogénicas de los nitroalquenos. ***Así, la partícula de LDL es utilizada como un transportador del compuesto híbrido “ $\alpha$ -tocoferol-nitroalqueno” a los sitios de lesión.***

## **VI) CONCLUSIONES**

## VI) Conclusiones.

En esta tesis doctoral, nos planteamos desarrollar una nueva estrategia farmacológica para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis, basada en el rol fundamental que tanto el proceso inflamatorio crónico como el metabolismo del  $\alpha$ -TOH y de la LDL tienen en esta patología.

Como principales conclusiones de mi tesis doctoral destacamos los siguientes hitos:

- diseñamos y sintetizamos dos nitroalquenos derivados del tocoferol;
- analizamos sus propiedades electrofílicas y estudiamos la cinética de la reacción entre estos compuestos y nucleófilos modelos en soluciones acuosas y ambientes heterogéneos con diferentes cargas;
- demostramos que en macrófagos estos compuestos son capaces de inhibir la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, de activar el sistema Nrf2-Keap-1 y, para el caso del NATxME, demostramos que es capaz de inhibir al inflammasoma en macrófagos humanos;
- estudiamos y demostramos que el NATOH es capaz de incorporarse *ex vivo* a lipoproteínas humanas, y más aún, en el modelo animal ApoE knockout, demostramos que el NATOH se absorbe y es transportado en el plasma a través de las lipoproteínas de síntesis endógena (VLDL/LDL), alcanzando a las lesiones ateroscleróticas en la aorta;
- finalmente demostramos que ambos compuestos tienen efectos biológicos *in vivo*. El NATOH fue capaz de reducir las lesiones ateroscleróticas en el modelo de ratones ApoE knockout y además fue capaz de inhibir el aumento de la presión arterial inducido por angiotensina II. Para el caso del NATxME, probamos sus efectos en un modelo de inflamación aguda en pez cebra, demostrando una potente inhibición del reclutamiento de neutrófilos al sitio de una lesión mecánica.

**En resumen, transformamos al  $\alpha$ -tocoferol en un compuesto antiinflamatorio no convencional aumentando sus propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas.**

## **VII) Perspectivas**



## VII) Perspectivas.

Nuestros hallazgos abrieron un camino para el desarrollo de nuevos fármacos novedosos para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación crónica (ej. síndrome metabólico, obesidad, diabetes tipo II, enfermedades neurodegenerativas, etc.). En el transcurso de mi tesis de doctorado, junto con el equipo de investigación diseñamos nuevas familias de anti-inflamatorios no convencionales que fueron patentados en los EEUU:

1. Rodriguez-Duarte, J. et al. Nitroalkene Trolox derivatives and methods of use thereof in the treatment and prevention of inflammation related conditions; WO/2018/037279 A1. USA, PCT patent (2018).
2. Rodriguez-Duarte, J. et al. Methods of treatment of inflammation related conditions using pluripotent anti-inflammatory and metabolic modulators; PCT/IB2017/056417. USA, PCT patent (2017).

Actualmente estamos estudiando los principales mecanismos de acción de estos nuevos antiinflamatorios no convencionales, así como sus principales efectos biológicos en diferentes enfermedades con una base inflamatoria.

## VIII) MATERIALES Y MÉTODOS

## VIII) MATERIALES Y MÉTODOS.

### 8.1) SERIE 1.

#### 8.1.1) SÍNTESIS.

**Química.** El argón y el nitrógeno se compraron a Linde Uruguay (Montevideo, Uruguay). Se compraron otros productos químicos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) o Applichem (Alemania) con la mayor pureza disponible. El compuesto **1b** se sintetizó de acuerdo con los métodos de la literatura [222]. El tocoferol utilizado a lo largo de la tesis fue siempre ( $\pm$ )- $\alpha$ -TOH (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Todos los demás materiales se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron tal como se recibieron. El NATOH para su caracterización fisicoquímica y estudios *in vitro* fue sintetizado en nuestro laboratorio como se describe inmediatamente a continuación. Para estudios *in vivo*, el NATOH fue suministrado por SIQUIMIA. Los controles de calidad se realizaron como antes y la pureza fue del 95% o superior. Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR se registraron en un instrumento Bruker DPX-400, con  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna. La completa caracterización es realizada con la combinación de experimentos COSY, HSQC y HMBC. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de  $\delta$  (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha. Los espectros de masas de impacto electrónico (EI) y electrospray (ES+) se obtuvieron a 70 eV en un Shimadzu GC-MS QP 1100 EX o en un espectrómetro Hewlett Packard 1100 MSD, respectivamente. La TLC se llevó a cabo con Alugram® Sil G / UV254 u óxido de aluminio sobre placas de poliéster. La cromatografía en columna (CC) se llevó a cabo en sílica gel (Merck, 60-230 mesh) u óxido de aluminio (Merck, 70-230 mesh). Todos los disolventes eran de calidad anhidra comprados a Aldrich Chemical Co. y utilizados tal como se recibieron.

#### Síntesis del NATOH.

**Acetato de 5-(bromometil)-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)croman-6-ilo (2a).** A una solución de ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol (**1a**, 1.38g, 3.20 mmol) en n-hexano seco (25 mL) se añadió gota a

gota una solución de bromo (1,05 equiv.) en n-hexano (10 mL) temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 3 h. El disolvente y el bromo en exceso se eliminaron por destilación a presión reducida a temperatura ambiente. En el mismo balón se llevó a cabo la reacción de acetilación del bromometilderivado obtenido como se describió anteriormente. Se añadieron  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (12 mL), AcOH (12 mL),  $\text{Ac}_2\text{O}$  (2.2 mL) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.2 mL). La mezcla oscura se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se añadió agua y se evaporó el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase acuosa se extrajo con hexano (3x100 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron posteriormente hasta neutralidad con agua, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra el agente desecante y se concentra a sequedad *in vacuo*. La purificación por cromatografía en columna (Hex: AcOEt, 10:1) proporcionó **2a** (1.24 g, R: 72%) como aceite denso amarillo. Los datos analíticos son consistentes con los que figuran en la literatura [223, 224, 288].  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.42 (sa, 2H), 2.80 (t, *J* 6.6 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.91-1.77 (m, 2H), 1.59-1.07 (m, 24H), 0.90-0.86 (m, 12H).

**Acetato de 5-formil-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecilo) croman-6-ilo (3a)**. A una solución de **2a** (1.24 g, 2.25 mmol) en acetonitrilo seco (20 mL), se añadió *N*-metilmorfolina-*N*-óxido (NMMO, 1.05 g, 9.00 mmol). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a presión reducida y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna (Hex:EtOAc, 15:1), proporcionando **3a** (1.01 g, R: 93%) como aceite denso amarillo. Los datos analíticos son consistentes con los que figuran en la literatura [223, 224, 288].  $^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.29 (s, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.09 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>), 2.09-1.63 (m, 2H), 1.41-1.08 (m, 24H), 0.90-0.86 (m, 12H).

**2,7,8-trimetil-5-((*E*)-2-nitrovinil)-2-(4,8,12-trimetiltridecilo)-croman-6-ol (4a, NATOH)**. Se añadió el aldehído **3a** (0.15 g, 0,30 mmol) a una mezcla de 1.2 mL de  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  anhidro y una cantidad equivalente de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ . La mezcla se agitó a 100 °C durante 2 h. Luego el disolvente se evaporó a presión reducida y se añadieron  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Et}_2\text{O}$ . La capa orgánica se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 50 ml), HCl 3N (2x25 ml) y NaCl acuoso saturado, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró el agente desecante y el disolvente se evaporó *in vacuo*. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (Hex:AcOEt, 9:1), obteniéndose NATOH (0.04 g, R: 27%) como un aceite denso de color amarillo.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.31 (d, *J* 13.4 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* 13.4 Hz, 2H), 2.88 (t,

$J$  2.9Hz, 2H), 2.21 (s, 6H), 1.92-1.80 (m, 2H), 1.63-1.07 (m, 24H), 0.90-0.85 (m, 12H).  $^{13}\text{C}$  NMR ((125 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  148.1, 146.5, 139.8, 132.7, 131.3, 120.6, 119.4, 112.8, 74.9, 39.3 (2C), 36.8 (4C), 31.7 (2C), 30.6, 28.1, 23.8 (2C), 22.3 (2C), 20.7 (2C), 20.4, 19.2 (2C), 11.5 (2C). HRMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^+$  486.3589, encontrado 486.3587.

#### Síntesis del NATxME.

**6-acetoxi-5-bromometil-2,7,8-trimetilcroman-2-carboxilato de metilo (2b).** En un balón con 1.58 g (6.00 mmol) de **1b**, se adicionan 33.0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad, y se añadió gota a gota una solución de 0.3 mL (6.00 mmol) de bromo en 4.5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La agitación continuó a temperatura ambiente durante 2 h después de completar la adición de bromo; la solución resultante era oscura, pero no se detectó color o vapor de bromo. La mezcla se purgó con una corriente de nitrógeno para eliminar la mayor parte del HBr presente, luego se evaporó a sequedad a presión reducida. El producto intermedio crudo se disolvió en 13 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se trató con 11.0 mL de ácido acético glacial, 3.0 mL de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla se trató con 60.0 mL de agua y se agitó durante 1 h. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación, se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro), se filtró el agente desecante y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (Hex:Et<sub>2</sub>O, 7:3), obteniéndose **2b** (2.0 g, R: 87%) como un sólido blanco. Los datos analíticos son consistentes con los dados en la bibliografía [289].  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.48–4.18 (sa, 2H), 3.69 (s, 3H); 2.88–2.81 (m, 1H), 2.68–2.59 (m, 1H), 2.49–2.42(m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.93–1.86 (m, 1H), 1.62 (s, 3H).

**6-acetoxi-5-formil-2,7,8-trimetilcromancarboxilato de metilo (3b).** Una solución de 2 g (5.20 mmol) de bromoacetato **2b** en 17 mL de acetonitrilo seco tratado con 1.58 g (15.60 mmol, 3 equiv) de NMMO se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se concentró hasta aproximadamente 5 mL a presión reducida, se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl al 5% y con salmuera, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtro el agente desecante y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se

purificó por cromatografía en columna (Hex:Et<sub>2</sub>O, 9:1), proporcionando **3b** (1.2 g, R: 71%) como un aceite naranja que cristalizó en la heladera. Los datos analíticos son consistentes con los dados en la bibliografía[289]. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  10.22 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.29–3.22 (m, 1H), 2.92–2.83 (m, 1H), 2.46–2.40 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.88–1.80 (m, 1H), 1.64 (s, 3H).

**6-hidroxi-2,7,8-trimetil-5-((E)-2-nitrovinil)croman-2-carboxilato de metilo (4b, NATxME)**. Se añadió aldehído **3b** (0.18 g, 0.56 mmol) a una mezcla de 2.5 mL de CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> anhidro y una cantidad equivalente de CH<sub>3</sub>COO NH<sub>4</sub>. La mezcla se agitó a 100 °C durante 2 h. Luego, el disolvente se evaporó a presión reducida y se añadieron H<sub>2</sub>O y Et<sub>2</sub>O. La capa orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (2 x 50 mL), HCl 3 N (2 x 25 ml) y salmuera, se secó y el disolvente se evaporó. El residuo bruto se purificó por cromatografía en columna (Hex:Et<sub>2</sub>O, 7: 3), proporcionando **4b** (NATxME, 0.032 g, R: 18%) como un aceite denso de color amarillo. <sup>1</sup>HRMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.21 (d, *J* 12.0 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* 12.0 Hz, 2H), 2.97-2.89 (s, 1H), 2.79-2.71 (s, 1H), 2.54-2.49 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.66 (s, 3H). <sup>13</sup>CNMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.7, 149.3, 146.2, 139.5, 133.9, 132.1, 131.3, 121.2, 118.9, 113.1, 77.8, 52.6, 30.2, 20.5, 13.0, 11.9. HRMS m/z calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub> [M-H]<sup>+</sup> 320.1140, encontrado 320.1137.

### 8.1.2) CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS NITROALQUENOS ANALOGOS DE TOCOFEROL.

**Espectroscopía UV-Visible.** Una vez sintetizados los nitroalquenos se empezó con la caracterización fisicoquímica. Primero se obtuvo el espectro UV-Visible de los dos nitroalquenos análogos de tocoferol en un espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50 BIO.

Luego se calculó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a 350 nm ( $\lambda$  max de absorción de los dos compuestos) en metanol (MeOH, J.T. Baker). Para esto se obtuvieron las medidas de absorbancia a 350 nm a diferentes concentraciones de los compuestos (obtenidos por pesada directa) y se graficaron en función de la concentración. De la pendiente de esta grafica se obtuvo el  $\epsilon_{350nm}$ .

**Espectrometría de masa.** Los compuestos nitroalquenos análogos de tocoferol fueron inyectados directamente en 80% ACN 20% H<sub>2</sub>O 0.1% ácido fórmico en un Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific) y en un LTQ XL (Thermo Scientific) en modo negativo.

**HPLC en fase reversa.** Se desarrollaron 2 métodos cromatógrafos para la detección de NATOH y tocoferoles por HPLC. En uno de los métodos, al cual llamaremos método A, se utilizó una columna Hypersil Gold C-18, 3  $\mu$ M de diámetro interno de 150 mm x 2.1 mm (Thermo Scientific) y las fases móviles fueron: A H<sub>2</sub>O; B MeOH. El método consistió en un gradiente de 92 a 96% de B en 10 min con flujo de 1.5mL/min con una detección a 295 nm y 350 nm en un sistema Agilent 1200 HPLC.

Mientras que en el otro método, el método B, se utilizó una columna YMC C-30 de 5  $\mu$ M de diámetro interno de 250 x 4,6 mm en un método isocrático de MEOH a un flujo de 1,5 ml/min con una detección a 295 nm y 350 nm en un sistema Agilent 1200 HPLC. En ambos métodos se utilizó al  $\delta$ -TOH como estándar interno.

#### **Reactividad electrofílica de los compuestos nitroalqueno tocoferol-miméticos.**

NATOH (100  $\mu$ M) se disolvió en buffer fosfato 20 mM (Merck) con 1% de SDS (Biosolve Chimie, Dieuze, Francia) pH 7.4 y se incubó con  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) 1 mM (Sigma-Aldrich). La reacción se controló mediante espectrofotometría UV-Vis (Varian Cary 50 bio UV-VIS, Agilent Technologies, Palo Alto, CA-EE. UU) a través de lecturas de absorbancia continuas (200-600 nm) cada 1 minuto durante los primeros 15 min de reacción). NATxME (100  $\mu$ M) se disolvió en buffer fosfato 20 mM pH 7,4 y se incubó con  $\beta$ ME, 1 mM. La reacción se controló como mencione anteriormente. La reacción entre el NATOH y  $\beta$ ME también se caracterizó por HPLC en fase reversa a pH 7,4 o 2,0 usando el método cromatográfico A.

#### **Reactividad electrofílica del NATOH incorporado en liposomas y en la lipoproteína de baja densidad LDL.**

NATOH (100  $\mu$ M) incorporado en liposomas (ver más adelante) fue incubado con  $\beta$ ME 1mM y la reacción fue seguida espectrofotometricamente como antes.

NATOH incorporado en la LDL (ver más adelante incorporación a lipoproteínas) fue incubado con  $\beta$ ME 1mM y la reacción fue seguida espectrofotometricamente como antes.

#### **Análisis de la cinética de reacción entre los derivados nitroalqueno tocoferol-miméticos y tioles de bajo peso molecular. Sistemas de buffers y micelas.**

Los buffers de fuerza iónica fija [290] utilizados para las mediciones de equilibrio y cinéticas consistieron en Tris 20 mM, Mes 10 mM y ácido acético 10 mM con NaCl 130 mM para llevar la

fuerza iónica a 0,15 M y DTPA 100  $\mu$ M (Buffer TMA20). Se usaron micelas de diferente carga para solubilizar NATOH y NATxME, los detergentes utilizados fueron dodecilsulfato de sodio (SDS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol (Triton X-100). Las concentraciones de los detergentes fueran elegidas de manera que la concentración de las micelas fuera mayor que la de los nitroalquenos permitiendo la asunción de una molécula de nitroalqueno por micela. Las concentraciones utilizadas fueron 25 g/L SDS (140  $\mu$ M), 10 g/L CHAPS (1.63 mM), 8 g/L Tritón X-100 (101  $\mu$ M), 10 g/L CTAB (450  $\mu$ M), los números en paréntesis son las concentraciones de micelas considerando el número de agregación en cada caso.

### **Cinética.**

La reacción entre los nitroalquenos y los tioles,  $\beta$ ME y glutatión reducido (GSH, Sigma), fue seguida por el cambio en la absorción UV a 350 nm para NATOH y NATxME. Las reacciones más rápidas se controlaron en un espectrómetro de flujo detenido SX20 (Applied Photophysics); las reacciones intermedias ( $t > 10$  s) se siguieron en un espectrofotómetro Varian Cary50 (Agilent) usando una unidad de flujo detenido de mezcla rápida "Stopped Flow" RX2000 (Applied Photophysics); y las reacciones más lentas ( $t > 600$  s) se estudiaron usando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo). Las reacciones se realizaron en el buffer TMA20 al pH especificado y a 25 °C. Los cursos temporales se ajustaron a una única función exponencial (ecuación 1) y las constantes de velocidad resultantes ( $k_{obs}$ ) se graficaron en función de la concentración de tiol para obtener las constantes de velocidad de adición ( $k_f$ ) y eliminación ( $k_r$ ).

$$Amp \times \exp(-k_{obs}t) + C \quad (1)$$

### **Determinación del $pK_a$ .**

NATOH y NATxME en buffer TMA20 a temperatura ambiente se titularon espectrofotométricamente mediante la adición de 5-10  $\mu$ L de NaOH 2M a una solución micelar o acuosa del nitroalqueno (30  $\mu$ M). Después de cada adición, se registraron el espectro UV-Vis y el pH. El pH inicial se ajustó con un pequeño volumen de HCl 2M. Las lecturas de absorbancia a 350 nm se graficaron en función del pH y se ajustaron a una sola función de  $pK_a$  (ecuación 2) donde A y B son la absorbancia de las formas ácidas y básicas del nitroalqueno.



$$Abs = A \frac{[H^+] + K_a}{[H^+]} + B \frac{[H^+] + K_a}{K_a} \quad (2)$$

### **Análisis de las propiedades antioxidantes del NATOH.**

La capacidad antioxidante del NATOH y  $\alpha$ -TOH se midió mediante la técnica de ORAC (del inglés "Oxygen Radical Absorbance Capacity"), utilizando el lector de microplacas multimodo LUX Varioskan (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EE. UU.). AAPH (2,2'-azobis (amidinopropano) dihidrocloruro),  $\alpha$ -TOH y fluoresceína (FL) se compraron de Sigma-Aldrich. Todos los ensayos se realizaron en buffer fosfato 10 mM (pH = 7,4) y la mezcla de reacción final fue de 200  $\mu$ L. NATOH o  $\alpha$ -TOH solubilizados en liposomas (25  $\mu$ L) y FL (150  $\mu$ L de una solución de FL 1  $\mu$ M) se colocaron en los pocillos (placa negra de 96 pocillos). La mezcla se preincubó durante 30 minutos a 37 ° C dentro del instrumento Varioskan LUX. A continuación, la reacción oxidativa se desencadenó dispensando 25  $\mu$ L de solución de AAPH de 50 mg/mL a los pocillos mediante un dispensador a bordo del Varioskan LUX. La fluorescencia se registró cada 30 s durante 90 min con excitación a 485 nm y emisión a 518 nm. Se llevaron a cabo un blanco (liposomas + FL + AAPH) usando buffer fosfato en lugar de antioxidante en cada ensayo. Las muestras se midieron a diferentes concentraciones (12.5-100  $\mu$ M). Toda la mezcla de reacción se preparó por duplicado, y se realizaron al menos tres ensayos independientes para cada muestra. Las curvas antioxidantes (fluorescencia frente al tiempo) se normalizaron primero a la curva del blanco correspondiente al mismo ensayo. Se compararon curvas de señal de liposomas,  $\alpha$ -TOH y NATOH

### **Incorporación de NATOH en lipoproteínas humanas.**

Se recolectó sangre de donantes sanos después de un ayuno nocturno en tubos que contenían heparina sódica y se centrifugó a 2.000 g durante 15 minutos a 4 ° C para obtener plasma. Luego el plasma humano (1 mL) se incubó con NATOH (0, 25, 50 o 100  $\mu$ M) durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente se aisló la LDL mediante ultracentrifugación en un gradiente de bromuro de potasio (KBr) (0,29 g/mL; 360.000 g por 60 min; Rotor Hitachi Sorvall Discovery M120 S100 AT6) [228]. Luego la fracción de lipoproteína LDL fue aislado manualmente y extraído con metanol (9: 1 v/v). La presencia de NATOH y  $\alpha$ -TOH endógeno en las lipoproteínas se analizaron por HPLC en fase reversa usando el método cromatográfico A.

### 8.1.3) ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y POSIBLES BLANCOS MOLECULARES MODULADOS POR LOS COMPUESTOS HÍBRIDOS.

Para los estudios *in vitro*, el NATOH y el  $\alpha$ -TOH fueron vehiculizados en liposomas compuestos de una mezcla 7: 3 de POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo- (1'-rac-glicerol) y POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) (Avanti, Polar Lipids Alabama, USA). Esto es debido a que estas moléculas son hidrofóbicas y precipitan en el medio de cultivo celular. La concentración final de la mezcla de liposomas en cada experimento *in vitro* fue de 200  $\mu$ M. Para la preparación de los liposomas, primero se añadieron los fosfolípidos y luego el  $\alpha$ -TOH o NATOH a un tubo eppendorf. Posteriormente se evaporó a sequedad mediante centrifugación por vacío (*speed vac*, centrivap concentrator, Labconco) durante 20 min y se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS) o medio de cultivo estériles y se incubó en un agitador termostatzado (thermomixer, Eppendorf) a 300 rpm a 30 °C durante 1 h. Finalmente los liposomas se sonicaron (Misonix Incorporated) 10 veces durante 10 segundos al 10% de la amplitud para lograr un tamaño de 100 nm. Antes de ser agregados a las células, los liposomas son esterilizados con filtros de cultivo de 45 $\mu$ m.

Para el caso de NATxME no tuvimos que vehiculizarlo, ya que a las concentraciones utilizadas en los experimentos este compuesto es soluble.

#### **Cultivo celular.**

Para los estudios celulares se utilizaron macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71, Manassas, VA) y monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202, Manassas, VA). Los macrófagos RAW 264.7 fueron mantenidos en medio completo DMEM (Gibco) conteniendo 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomina a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las células RAW264.7 se sembraron la noche anterior a cada tratamiento. Al día siguiente, las soluciones se prepararon en medios completos y las células se trataron para los puntos de tiempo y concentraciones correspondientes. Las células THP-1 fueron mantenidas en medio completo RPMI (Gibco) con 10% SFB, 100 U/mL y 100  $\mu$ g/mL de estreptomina a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> y se diferenciaron a macrófagos con Phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) 200 nM durante 48-72h. Al día siguiente se prepararon las soluciones en medios completos y trataron para los puntos de tiempo correspondiente.

### **Estudios de citotoxicidad.**

La viabilidad celular se realizó mediante el ensayo MTT. Los macrófagos RAW 264.7 y THP-1 se incubaron con diferentes concentraciones de NATxME (3–50  $\mu$ M), NATOH (5-200  $\mu$ M), o  $\alpha$ -TOH (5-200  $\mu$ M) durante 24 h. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular midiendo la reducción a nivel mitocondrial de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2il] -2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma) a formazan. Para ello, se añadió MTT a las células hasta una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubaron a 37 °C durante 1h. Después de eliminar el medio, los cristales de formazan se disolvieron en isopropanol (J.T. Baker) y la absorbancia a 570 nm se leyó usando un espectrofotómetro de placas (Multiscan EX Thermo Scientific). Los resultados se expresan como  $CI_{50}$  (concentración de compuesto que reduce al 50% la absorbancia control a 570 nm). Cada  $CI_{50}$  es el promedio de al menos cuatro determinaciones.

### **Efectos *in vitro* del NATOH.**

#### **Inhibición de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B.**

Los efectos sobre la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B fue estudiada por inmunohistoquímica. Para ello macrófagos THP-1 se trataron con NATOH o  $\alpha$ -TOH, 50  $\mu$ M, O.N. y luego se activaron con LPS (1  $\mu$ g/mL) por 30 minutos. Luego se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y posteriormente se permeabilizó con PBS-BSA 2% -Triton 0,3% durante 1 h. luego se incubo O.N. a 4 °C con anticuerpo de conejo anti p65 (cell signalling). Como anticuerpo secundario se usó un anti IgG de conejo acoplado a tetrametilrodamina (Invitrogen). Los núcleos se tiñeron usando DAPI (Sigma). Las imágenes se adquirieron usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 equipado con una cámara CCD Orca-Hamamatsu, un objetivo de inmersión en aceite 60x NA 1.25 y los siguientes filtros dicróicos: Excitación 360-370nm/Emisión 420-460nm para DAPI; Excitación 530- 550 nm/emisión 570 nm para tetrametilrodamina. Las imágenes se procesaron utilizando Image J 1.51h (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

#### **Inhibición de la expresión de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B.**

Los efectos del NATOH sobre la expresión a nivel del ARNm de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y MCP-1) dependientes del factor de transcripción NF- $\kappa$ B fue analizada por QRT-PCR. Para ello células THP-1 se diferenciaron en macrófagos y se trataron con NATOH (25 y 50  $\mu$ M) o  $\alpha$ -TOH (50

$\mu$ M) O.N. Después del tratamiento, las células se estimularon con LPS (100 ng/mL, durante 4 horas). Posteriormente el ARN se extrajo de células usando TRIzol (Invitrogen, Life Technologies). Luego se retro transcribió a ADNc usando el kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) con Oligo(dT) (IDT). Los ADNc para la PCR en tiempo real se obtuvieron en un termociclador Piko 24 (Thermo Scientific). El análisis de la expresión del ARNm se calculó usando el método ddCt con  $\beta$ -actina como gen constitutivo. IL-6 (fw: 5' ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3'; rv: 5'-CCATCTTTGGAAGGTTCCAGGTTG-3'); MCP-1 (fw: 5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'; rv: 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3') y Actina (fw:CATGTACGTTGCTATCCAGGC; rv:CTCCTTAATGTCACCCACGAT). La secuencia de los ARNm se obtuvieron de la base de datos de UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz) y los cebadores se diseñaron utilizando la herramienta informática Primer Blast de NIH (National Institut of Health, USA). Por último los cebadores se obtuvieron de IDT. Se usó SYBR Green (Roche) como sonda de unión a ADN y la QRT-PCR se realizó en un termociclador Eco Illumina.

#### **Inhibición de la secreción de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B.**

Para el análisis de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y MCP-1, se cultivaron células RAW 264.7 en DMEM 10% de FBS y luego se trataron durante 8 h con NATOH (10 y 25  $\mu$ M) o  $\alpha$ -TOH (25  $\mu$ M). Después, las células se estimularon con LPS (50 ng/mL) O.N. La expresión de IL-6 y MCP-1 se midió en el sobrenadante celular con un kit de ELISA disponible comercialmente (BD OptEIA).

#### **Inducción del sistema Nrf2-Keap-1 en macrófagos por NATOH.**

Los efectos del NATOH sobre la expresión a nivel del ARNm (ARN mensajero) de enzimas de fase 2 (HO-1 y GCLM) dependientes del sistema Nrf2-Keap-1 fue analizada por QRT-PCR. Para ello células THP-1 se diferenciaron en macrófagos y luego se trataron con NATOH o  $\alpha$ -TOH O.N. (del inglés "overnight"). Luego el ARN se extrajo de células usando TRIzol (Invitrogen, Life Technologies). Luego se retro transcribió a ADNc (ADN copia) usando el kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) con Oligo DT (IDT). Los ADNc para la PCR en tiempo real se obtuvieron en un termociclador Piko 24 (Thermo Scientific). El análisis de la expresión del ARNm se calculó usando el método ddCt con  $\beta$ -actina como gen constitutivo.

HO-1 fw: 5'-AAGACTGCGTTCCTGCTCAA-3'; HO-1 rv: 5'-GGGGGCAGAATCTTGCACTT-3';

GCLM fw: 5'-AGACGGGGAACCTGCTGAA-3'; GCLM rv: 5'-TCATGAAGCTCCTCGCTGTC-3') Actina fw: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'; Actina rv: 5'-CTCCTTAATGTCACCCACGAT-3').

La secuencia de los ARNm se obtuvieron de la base de datos de UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz) y los primers se diseñaron utilizando la herramienta informática Primer Blast de NIH (National Institut of Health, USA). Por último los primers se obtuvieron de IDT. Se usó SYBR Green (Roche) como sonda de unión a ADN y la QRT-PCR se realizó en un termociclador Eco Illumina.

Para los estudios de Western Blott los macrófagos RAW264.7 fueron incubados toda la noche con NATOH (10 y 25  $\mu$ M) y luego se lisaron las células con el buffer de lisis NETN (Tris HCl 20mM pH 8 NaCl 100mM EDTA 1mM 0.5% Nonidet P-40) suplementado con inhibidor de proteasas. Luego se cuantificaron las proteínas utilizando el método de Bradford. Posteriormente se corrió un gel de 12% de poliacrilamida y 10% SDS sembrando 40  $\mu$ g de proteínas por pocillo. Finalmente se hizo una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-HO-1 (Abcam, ab13248); anti-GCLM (Abcam, ab55436) y anti- $\alpha$ -tubulina (Abcam, ab7291). El anticuerpo secundario fue anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma, A9044). Se utilizó el Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific) para el revelado de las membranas.

### **Efectos *in vitro* del NATxME.**

#### **Inducción del sistema Nrf2-Keap-1 en macrófagos por NATxME.**

Células RAW264.7 se cultivaron DMEM 10% de FBS y luego se trataron durante 5 h con NATxME (1, 3 y 10  $\mu$ M). El ARN total se extrajo usando reactivo TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). El ARN se retro transcribió usando el kit de síntesis de ADNc de iScript (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) tal como se describió previamente [205]. La expresión génica se determinó mediante QRT-PCR utilizando los ensayos de expresión génica de TaqMan para hemo oxigenasa-1 (HMOX-1 **Mm00516005\_m1**), GCLM (GCLM **Mm00514996\_m1**) y NQO-1 (NQO1 **Mm01253561\_m1**) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) y se normalizó a GAPDH usando el método comparativo ddCt.

Para los ensayos de Western Blott los macrófagos RAW264.7 fueron incubados toda la noche con NATxME (5 y 10  $\mu$ M) y luego se lisaron las células con el buffer de lisis NETN (Tris HCL 20mM pH 8; NaCl 100mM; EDTA 1mM; 0.5% Nonidet P-40) suplementado con inhibidor de proteasas. Luego se cuantificaron las proteínas utilizando el método de Bradford. Posteriormente se corrió un gel de 12% de poliacrilamida y 10% SDS sembrando 40  $\mu$ g de proteínas por pocillo. Finalmente se hizo una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-HO-1 (Abcam, ab13248); anti-GCLM (Abcam, ab55436) y anti- $\alpha$ -tubulina (Abcam, ab7291). El anticuerpo secundario fue anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma, A9044). Se utilizó el Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific) para el revelado de las membranas.

#### **Análisis de las citoquinas proinflamatorias.**

Las células RAW 264.7 se cultivaron en DMEM 10% de FBS y luego se trataron durante 2 h con NATxME (1, 3 y 10  $\mu$ M). Después de eso, las células se estimularon con LPS (50 ng/ml) O.N. La expresión de MCP-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  se midieron en el sobrenadante con un kit de ELISA disponible comercialmente (BD OptEIA).

#### **Inhibición del inflamasoma NLRP3.**

Como el inflamasoma NLRP3 requiere de 2 señales para su activación y ensamblado, incubamos macrófagos THP-1 con LPS (250 ng/mL) como primera señal durante 3 h y luego con ATP (5 mM), como desencadenante de ensamblaje, durante 45 minutos. Para estudiar los efectos del NATxME sobre este inflamasoma, se incubó a 1, 3 y 10  $\mu$ M junto con la primera señal o a 0.2, 0.5, 1 y 5  $\mu$ M junto con la segunda señal. Se recogió el sobrenadante celular y se analizaron los niveles de IL-1 $\beta$  por ELISA (BD OptEIA) como se informó previamente [291]. Para los estudios de Western Blott se precipitaron las proteínas del sobrenadante utilizando el método de precipitación con acetona fría (Thermo) y se cuantificaron usando el método de Bradford. Las células fueron lisadas con el buffer de lisis RIPA (Tris 25mM; NaCl 150mM; 1% Nonidet P-40; 1% Deoxicolato de Sodio; 0.1% SDS) y las proteínas fueron cuantificadas. Se corrió un gel de 12.5 % de poliacrilamida y 10% SDS sembrando 30 $\mu$ g de proteína por pocillo. Finalmente se hizo una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  usado fue de Santa Cruz (H-153) y el de  $\beta$ -actina fue de

Abcam (ab8224). El anticuerpo secundario fue anti-IgG de conejo de Sigma (A0545) conjugado a peroxidasa. Se utilizó el Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific) para el revelado de las membranas.

#### **8.1.4) ESTUDIO DE LOS EFECTOS *IN VIVO* DE LOS NITROALQUENOS ANÁLOGOS DEL $\alpha$ -TOCOFEROL.**

##### **Efectos *in vivo* del NATOH.**

###### **Animales y diseño experimental.**

Todos los procedimientos y manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales (Protocolo Número 014-14) del Instituto Pasteur de Montevideo y todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas y regulaciones pertinentes. Los animales permanecieron durante todo el protocolo en el bioterio IPMON convencional en cajas de hasta 5 animales, con agua y alimento a voluntad. Se controlaron las condiciones ambientales de temperatura y luz (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad).

En cada diseño experimental se tuvo en cuenta situaciones que podían causar estrés y dolor en los animales. El reconocimiento de tales situaciones se realizó en base a cambios en el comportamiento, en las características fenotípicas y reflejos naturales. Según cada situación en la que se detectó estrés o dolor se analizó la necesidad de analgesia o anestesia y eventualmente determinación de punto final humanitario. Este último punto se refiere al criterio usado para finalizar un estudio experimental con el fin de evitar el dolor o estrés en los animales. La decisión de realizar la eutanasia de un animal se basó en el juicio clínico, en conjunto con el equipo de la UATE del IPMON. Los métodos de eutanasia que se utilizaron al final de cada experimento o en situaciones que fueran necesarias fueron la dislocación cervical, un método rápido, seguro y que produce el menor estrés en el animal. En cuanto a los agentes químicos, se utilizó también eutanasia mediante cámara de CO<sub>2</sub>, realizado por la UATE según protocolo dispuesto en una atmósfera a 70% CO<sub>2</sub>

Se alimentaron ratones C57BL/6 o ApoE knockout (Jackson Laboratory) con una dieta alta en grasas sin adición extra de  $\alpha$ -tocoferol (HFD, 42% de calorías derivadas de grasa y 0,25% de

colesterol, LabDiet®, St. Louis, Missouri, USA). Se administró NATOH o  $\alpha$ -TOH (en 100  $\mu$ L de aceite de girasol) por vía oral utilizando sondas orogástricas (Instech Laboratories).

### **Detección de NATOH y $\alpha$ -TOH en plasma y en lipoproteínas de ratones.**

Para la detección de NATOH y  $\alpha$ -TOH en plasma de ratones tratados con vehículo,  $\alpha$ -TOH o NATOH mediante HPLC en fase reversa, ratones ApoE knockout (24 semanas de edad) alimentados con un HFD (42% de calorías derivadas de grasa y 0,25% de colesterol), sin agregado adicional de vitamina E (LabDiet®, St. Louis, Missouri, EE. UU.) se administraron vía oral con vehículo (n = 5),  $\alpha$ -TOH (n = 5) o NATOH (n = 5) durante 14 días (200 mg/kg/día en aceite de girasol). Se sacrificaron los ratones y se extrajeron 100  $\mu$ L de plasma en ayunas tomado 12 horas después de la última administración con MeOH como antes. La presencia de NATOH y tocoferoles endógenos se analizaron mediante HPLC en fase reversa (columna YMC C30, 5  $\mu$ M, 250 x 4,6 mm ID, método isocrático, 1,5 mL/min MeOH, detección a 295 nm y 350 nm, sistema Agilent 1200 HPLC) usando  $\delta$ -TOH como estándar interno como antes [227, 229].

La fracción de lipoproteínas VLDL/LDL se aisló mediante flotación del mismo plasma (400  $\mu$ L) ajustando la densidad del plasma a 1,06 g/mL con KBr. El plasma se ultracentrifugó a 360.000 g durante 4 horas (Hitachi Sorvall Discovery M120 rotor S100 AT6[228]). La fracción de lipoproteínas VLDL/LDL se aisló manualmente desde la parte superior del gradiente (banda de flotación) y se extrajo con MeOH (9: 1 v/v) La fracción inferior también se extrajo para analizar la presencia de NATOH en la fracción de albúmina/HDL. La presencia de NATOH y tocoferoles endógenos en ambas fracciones se analizaron mediante HPLC en fase reversa (columna YMC C30, 5  $\mu$ M, 250 x 4,6 mm ID, método isocrático, 1,5 ml/min MeOH, detección a 295 nm y 350 nm; sistema Agilent 1200 HPLC) utilizando  $\delta$ -TOH como un estándar interno como antes [227, 229].

### **Detección de NATOH en las aortas.**

Ratones ApoE Knockout (8 semanas de edad) fueron alimentados durante 14 semanas con HFD. En la semana 12, los animales (n = 4 por grupo) se randomizaron para recibir por vía oral todos los días el vehículo (100  $\mu$ L de aceite de girasol) o NATOH (200 mg/kg/día en aceite de girasol) durante las 2 semanas restantes del experimento. Al final del mismo, los ratones se sacrificaron y el arco aórtico o las aortas abdominales de ambos grupos se aislaron, se diseccionaron y se



homogeneizaron usando un mortero hecho por Luis Inchausti del Departamento de mantenimiento del IPMON. El tejido homogeneizado se extrajo O.N. con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ , J.T. Baker calidad HPLC). La fase líquida se secó bajo flujo de  $\text{N}_2$  y se resuspendió en MeOH. Posteriormente se analizó la presencia de NATOH y tocoferoles endógenos mediante HPLC en fase reversa (columna YMC C30, 5  $\mu\text{M}$ , 250 x 4,6 mm ID, método isocrático, 1,5 ml/min MeOH, detección a 295 nm y 350 nm; sistema Agilent 1200 HPLC) utilizando  $\delta$ -TOH como un estándar interno como antes [227, 229].

#### **Cuantificación de la aterosclerosis *in vivo*.**

Ratones ApoE Knockout (8 semanas de edad) alimentados con HFD se trataron con NATOH (n = 12) o  $\alpha$ -TOH (n = 11) vía oral a una dosis de 100 mg/kg de lunes a viernes durante 14 semanas. Luego se sacrificaron los ratones, se aisló la aorta y se disecó utilizando una lupa binocular (Nikon SMZ800N) y material quirúrgico. Las lesiones ateroscleróticas de toda la aorta se detectaron mediante la tinción con Oil Red O y se fotografiaron con cámara Nikon y cuantificaron con el software Image J como antes [292]. La cuantificación de la placa y el área de formación de la placa se realizaron con doble ciego.

#### **Análisis de marcadores inflamatorios en aortas de ratones tratados con NATOH y $\alpha$ -TOH.**

Ratones ApoE knockout (8 semanas de edad) se trataron con NATOH (n = 4) o  $\alpha$ -TOH (n = 4) por vía oral a una dosis de 100 mg/kg/día de lunes a viernes durante 14 semanas. Los ratones fueron sacrificados y se extrajo la aorta como antes. El ARN se extrajo de aortas usando TRIzol Reagent (Invitrogen, Life Technologies). Para la extracción de ARN aorta, las muestras se homogeneizaron primero con un mortero casero. El ARN purificado se retrotranscribió a ADNc usando el kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) con Oligo(dT)(IDT). El ADNc para la PCR en tiempo real se obtuvo con un termociclador Piko 24 (Thermo Scientific). El análisis de expresión de ARNm se calculó usando el método ddCt con GAPDH como gen constitutivo y se normalizó con las muestras de  $\alpha$ -TOH. Se usó SYBR Green (Roche) como colorante de unión a ADN y la QRT-PCR se realizó en un termociclador Eco Illumina.

Secuencias de primers: 5'3': GAPDH fw: CTA CAG CAA CAG GGT GG; GAPDH rv: TAT GGG GGT CTG GGA TGG; ICAM-1 fw: GTG ATG CTC AGG TAT CCA TCC A; ICAM-1 rv: CAC AGT TCT CAA AGC ACA

GCG; VCAM-1 fw: ATT TTC TGG GGC AGG AAG TT; VCAM-1 rv: ACG TCA GAA CAA CCG AAT CC; IL-1 $\beta$  fw: TGG GCC TCA AAG GAA AGA AT; IL-1 $\beta$  rv: CAG GCT TGT GCT CTG CTT GT; MCP-1 fw: TTA AAA ACC TGG ATC GGA ACC AA; MCP-1 rv: GCA TTA GCT TCA GAT TTA CGG GT; TNF- $\alpha$  fw: TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC; TNF- $\alpha$  rv: CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A.

### **Efectos del NATOH en un modelo de hipertensión arterial inducida por Angiotensina II.**

Contamos en nuestro laboratorio con el sistema de monitoreo CODA (Kent Scientific-Torrington, CT, EEUU) para el registro no invasivo de la PA. Este sistema es capaz de medir la PA en hasta 8 ratones en forma simultánea. Este método, ofrece una medida de PA a través de la determinación del volumen de sangre caudal utilizando un sensor con tecnología VPR (*Volume Pressure Recording*) para la medida de la PA y un manguito de oclusión. Se pueden medir hasta 6 parámetros: presión arterial diastólica (PD), presión arterial sistólica (PS), presión arterial media, frecuencia cardíaca, volumen de sangre en la cola y flujo de sangre. Es un método ampliamente validado que ofrece medidas de alta precisión, con una correlación de hasta 99% con los registros de telemetría y otras medidas de presión arterial directa. El método VPR subestima la PS medida por telemetría en 0.25 mmHg y la PD en 12.2 mmHg en promedio [293]. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las pautas para el cuidado y uso de animales aprobadas por el UATE, Instituto Pasteur Montevideo (IPMON)

Se utilizó Angiotensina II (Ang II, #A9525, Sigma, St. Louis Mo, EEUU) para preparar una solución en suero fisiológico (SF, NaCl 0.9%) con una concentración tal que se logre una dosis de 1mg/Kg/día para una duración total de 28 días de acuerdo al flujo de las bombas osmóticas utilizadas (Alzet Modelo 2004, DURECT Corporation, Cupertino, CA, EEUU). El volumen de llenado de cada bomba es de  $237.7 \pm 4.6 \mu\text{L}$ . La diferencia de presión osmótica determina que la solución con la que se carga la bomba sea liberada con una tasa promedio de  $0.25 \pm 0.01 \mu\text{L/hora}$  durante 28 días. El inicio de la liberación de la solución desde la bomba ocurre a partir de las 48 horas desde su implante en el animal.

**Colocación de las bombas:** Se utilizó un equipo de anestesia inhalatoria con una mezcla de isoflurano y Oxígeno 100% (Kent Scientific corporation, Torrington, CT, EEUU). Se colocó al animal en una cámara plástica para la inducción anestésica con una concentración de isoflurano de 3% y un flujo de la mezcla de 1L/h durante al menos 2.5 minutos. Luego se abre la cámara de

inducción y tras observar la ausencia del reflejo patelar y/o corneano por estimulación, se coloca al animal en decúbito ventral, sobre una manta térmica. Continuando la anestesia por vía inhalatoria a través de la colocación de una máscara en el hocico por el que pasa la mezcla de gases a un flujo de 0.5L/h. La concentración de Isoflurano inicial es de 2.5% y se va reduciendo hasta valores de 1.5 % de acuerdo a la profundidad de la anestesia según patrón y frecuencia respiratoria. Se realiza limpieza del sitio quirúrgico con alcohol al 70% y se realiza una pequeña incisión con bisturí en sentido transversal de menos de 0.5 cm de longitud por debajo del plano de implantación de las orejas, a nivel interescapular. Posteriormente se confecciona un bolsillo subcutáneo y se hace trayecto con una pinza de punta roma, que recorre todo el plano paravertebral derecho subcutáneo hasta el miembro inferior derecho, tratando de que no coincida este trayecto con el corte inicial en la piel. Así se asegura que la bomba no se salga una vez colocada si la sutura de la piel no cicatriza rápidamente. Posteriormente se coloca la minibomba osmótica dentro del bolsillo subcutáneo. Se procede al cierre de la piel con adhesivo tisular de uso veterinario (3M VetBond – cianoacrilato de n-butilo) y por encima 1 o 2 grapas a presión para reforzar el cierre de la herida. La duración total del procedimiento es de unos 8 minutos. Los animales recuperan rápidamente sus funciones en unos 4 – 5 min luego de finalizado el procedimiento. Sólo entonces se retiran de las cajas individuales en las que van despertando espontáneamente y se vuelven a colocar en sus respectivas cajas compartidas. Se realiza un control estricto pos cirugía, a las 24 hs, y luego cada 48 hs, de las constantes vitales y la herida quirúrgica, valorando elementos infecciosos.

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad los cuales se dividieron en dos grupos: tratado con NATOH (50 mg/kg/día, n = 8) o vehículo (aceite de girasol, n = 13). El diseño experimental implicó un registro basal de la PA de 4 semanas de duración, en dos días consecutivos de la semana, los cuales se mantuvieron fijos, con el objetivo de lograr valores de PA estables. Posteriormente se confeccionan grupos homogéneos considerando los valores de PA, y peso corporal. Luego la etapa de registro y pre-tratamiento (antes de la colocación de las bombas) con una duración 2 semanas y administración de NATOH 50mg/kg/día o vehículo (aceite de girasol) vía orogástrica, en forma trisemanal. Posteriormente la colocación de las bombas de Ang II como fue indicado. Finalmente la etapa de registro y tratamiento (luego de la colocación

de bombas) con una duración 4 semanas, la cual consistió en el registro de la PA en ratones con bombas y a su vez la continuación del tratamiento con NATOH o vehículo. Estos experimentos fueron hechos en colaboración con Adriana Carlomagno del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento del IPMON.

### **Efectos *in vivo* del NATxME.**

#### **Mantenimiento del pez cebra y modelo inflamatorio de reclutamiento de neutrófilos.**

El pez cebra se crió y se mantuvo de acuerdo con los protocolos estándar[294]. Todos los procedimientos experimentales con el pez cebra fueron aprobados por el comité de ética en el IPMON. La línea de cebra Tg (mpx: GFP) i114 específica de neutrófilos, denominada Tg (mpx: GFP), se utilizó para todos los ensayos de inflamación y de seguimiento de neutrófilos a los 3 días post-fertilización (3 dpf) como se describió anteriormente [243]. En todos los ensayos de inflamación, las larvas se preincubaron durante 2 h con NATxME (1, 2.5 y 4 $\mu$ M) o ibuprofeno (20 $\mu$ M). Posteriormente las aletas de la cola se cortaron transversalmente con un bisturí estéril en la región indicada en la figura 46 y luego las larvas se incubaron en presencia de compuestos durante 4 h. Después de eso, las larvas se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche. Para evaluar el número de neutrófilos, se realizó la inmunohistoquímica de montaje completo como se describe [295] usando anti-GFP policlonal de conejo (Invitrogen A-11122). Las imágenes se capturaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus) con un aumento de 10x, y se contaron los neutrófilos en la región posterior al ciclo circulatorio.

## **8.2) SERIE 2.**

### **8.2.1) CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS DERIVADOS DEL $\alpha$ -TOCOFEROL-LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO.**

Los nitrooxi-derivados tocoferol-miméticos utilizados en los estudios a continuación fueron tomados de la quimioteca de nuestro laboratorio de síntesis orgánica [250].

**Caracterización por espectrometría de masa.** Los compuestos fueron inyectados directamente en 60% Acetonitrilo (ACN) 0.1% Acido fórmico en una trampa iónica lineal con una fuente de ionización de tipo "Electrospray" (LTQ Velos, Thermo Scientific)

**HPLC en fase reversa.** Se desarrollaron 2 métodos cromatográficos por HPLC en fase reversa para la detección de los compuestos liberadores de \*NO. En el método al que llamamos método A, utilizo una columna C18 VYDAC (250 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m de diámetro interno) con un gradiente: 50-100% de B en 15 minutos. Fases móviles: A: 0.1% de ácido fórmico en H<sub>2</sub>O y B: 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (ACN) a un flujo de 0.5 mL/min con una detección a 295 nm en un sistema Agilent 1200 HPLC. En el método cromatografico B, Se utilizó una columna Hypersil Gold C-18, 3  $\mu$ M de diámetro interno de 150 mm x 2.1 mm y las fases móviles fueron: A H<sub>2</sub>O; B ACN. El método consistió en un gradiente de 50 a 57% de B en 12 min con flujo de 1.5ml/min con una detección a 295 nm. Tiempos de retención: NAO14 4.5 min; NAO17 5.5 min.

**Estabilidad en plasma.** Plasma humano se preincubó 5 minutos a 37 °C antes de la adición de los compuestos híbridos a una concentración final de 0,32 mM (1% de DMSO máximo). Las incubaciones realizadas en tubos tipo eppendorf en un baño de agua con agitación mantenido a 37 °C, se realizaron durante 0, 2 y 4 h. Luego se inactivaron mediante la adición de un volumen de acetona y  $\alpha$ -TOH (Sigma) como estándar interno (EI). Después de la centrifugación, los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC en fase reversa usando una columna C18 VYDAC (250 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m de diámetro interno). Gradiente: 50-100% de B en 15 minutos. Fase móvil: A: 0.1% de ácido fórmico en H<sub>2</sub>O, B: 0.1% de ácido fórmico en ACN.

**Estabilidad en soluciones a diferentes pHs.** Los estudios de estabilidad se realizaron en diferentes soluciones a distintos valores de pH (HCl 20 mM, pH 1, AcONH<sub>4</sub> 20 mM, pH 4,5 y 9, y K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 6,6 y 7,4). Las soluciones se preincubaron 5 minutos a 37 °C antes de la adición

de los compuestos híbridos a una concentración final de 0.32 mM (1% de DMSO máximo). Las incubaciones realizadas en tubos eppendorf en un baño de agua con agitación mantenido a 37 °C, se realizaron durante 45 min y se inactivaron mediante la adición de un volumen de acetona y Et. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se analizaron por HPLC en fase reversa como en los estudios de estabilidad en plasma.

#### **Incorporación a lipoproteínas.**

El plasma de donantes normolipidémicos sanos (1mL) se incubó con NAO14 o NAO17 (25 nmol disueltos en DMSO) a 37 °C durante 6 h. Luego, las lipoproteínas (VLDL/quilomicrones, LDL, plasma/HDL) se purificaron por ultracentrifugación en el gradiente de bromuro de potasio (KBr) [296]. A 100  $\mu$ L de cada una de las fracciones lipoproteicas se le agregaron 15 nmoles de estándar interno y se extrajeron con 900  $\mu$ L de ACN, se agitaron en un vortex 3 veces durante 10 segundos y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. La concentración del compuesto en cada fracción lipoproteica se determinó mediante la inyección de 100  $\mu$ L del sobrenadante de la extracción orgánica en el HPLC en fase reversa con detección UV (295 nm). Los análisis se realizaron en una columna Hypersil GOLD Thermo Scientific C18 (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m de diámetro interno) con una fase A: H<sub>2</sub>O y Fase B: ACN en un gradiente de 50 a 60% de B en 10 minutos. El análisis cuantitativo se realizó comparando las áreas de los picos con las curvas estándar correspondientes y los valores fueron corregidos por la recuperación del estándar interno. Cuando se estudió la incorporación de NAO14 a las lipoproteínas se usó como estándar interno al NAO17 y viceversa.

### **8.2.2) ESTUDIOS *IN VIVO* DE NAO14.**

#### **Animales.**

Los animales fueron provistos por la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE del Instituto Pasteur de Montevideo). El protocolo experimental fue aprobado por la CEUA correspondiente al IPMON, y así mismo se respetaron las normas vigentes (Nº protocolo 014-14; Nº Registro CNEA 002/11).

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 8 a 10 semanas de edad con un peso promedio de 25g. Los animales permanecieron durante todo el protocolo en el bioterio convencional del IPMON

en cajas de hasta 5 animales, con agua y comida "*ad libitum*". Las condiciones ambientales de temperatura y luz son controladas (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad).

**Análisis *in vivo* del efecto NO14 en un modelo de hipertensión arterial inducido por Angiotensina II.**

Para los estudios de los efectos de NAO14 sobre la hipertensión arterial, se usó el mismo protocolo utilizado para los estudios de NATOH en este modelo (diseño experimental, colocación de bombas etc.). Los animales se dividieron en dos grupos: tratado y vehículo (DMSO). El grupo tratado (n = 10) se administró por vía subcutánea (sc) con NAO14 a una dosis de 20 mg/kg/día 3 veces por semana. El grupo de vehículos se trató con vehículo 0.1 ml/día/sc 3 veces por semana. La presión arterial se registró dos veces por semana en dos días consecutivos durante 10 semanas. Antes de las grabaciones, a los animales se les permitió una aclimatación de 1 h (temperatura ambiente 30°C). El diseño experimental implicó un registro basal de la PA de 4 semanas de duración, en dos días consecutivos de la semana, los cuales se mantuvieron fijos, con el objetivo de lograr valores de PA estables. Posteriormente se confeccionan grupos homogéneos considerando los valores de PA, y peso corporal. Luego la etapa de registro y pre-tratamiento (antes de la colocación de las bombas) con una duración 2 semanas y administración de NAO14 20mg/kg/día o vehículo (DMSO) vía subcutánea, en forma trisemanal. Posteriormente la colocación de las bombas de Ang II como fue indicado. Finalmente la etapa de registro y tratamiento (luego de la colocación de bombas) con una duración 4 semanas, la cual consistió en el registro de la PA en ratones con bombas y a su vez la continuación del tratamiento con NAO14 o DMSO. Estos experimentos fueron hechos en colaboración con Adriana Carlomagno del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento del IPMON.

## **IX) REFERENCIAS**



## IX) REFERENCIAS.

1. WHO. *The top 10 causes of death*. 2014 May 2014; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Ministerio de Salud Pública, U., <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/> <http://www.msp.gub.uy/publicacion/C3%B3n/factores-de-riesgo-de-enfermedades-cr%C3%B3nicas-no-transmisibles>. 2013.
3. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis>.
4. Bonow, R.O., et al., *World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic*. *Circulation*, 2002. **106**(13): p. 1602-5.
5. Lopez, A.D. and C.C. Murray, *The global burden of disease, 1990-2020*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1241-3.
6. George, S.J. and C. Lyon, *Pathogenesis of Atherosclerosis*, in *Atherosclerosis*. 2010, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-20.
7. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis*, in *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, E. Braunwald, Editor. 1996, Saunders - Division of Harcourt Brace & Company: Philadelphia. p. 1105-1125.
8. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 515-81.
9. SUDEAT, *2º Consenso Uruguayo sobre Dislipemias*. 1998, Montevideo-Uruguay: Sociedad Uruguaya de Aterosclerosis.
10. Allahverdian, S., P.S. Pannu, and G.A. Francis, *Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation*. *Cardiovasc Res*, 2012. **95**(2): p. 165-72.
11. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 365-72.
12. Mahmood, S.S., et al., *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. *The Lancet*. **383**(9921): p. 999-1008.
13. Dawber, T.R., G.F. Meadors, and F.E. Moore, *Epidemiological Approaches to Heart Disease: The Framingham Study*. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 1951. **41**(3): p. 279-286.
14. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. *Nature*, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
15. *Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentration and smoking: a preliminary report from the Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group*. *JAMA*. 1990;264:3018- 3024. . *Journal of the American Medical Association*, 1990(264): p. 3018-3024.
16. Clarkson, T.B., et al., *A study of atherosclerosis regression in Macaca mulatta. V. Changes in abdominal aorta and carotid and coronary arteries from animals with atherosclerosis induced for 38 months and then regressed for 24 or 48 months at plasma cholesterol concentrations of 300 or 200 mg/dl*. *Exp Mol Pathol*, 1984. **41**(1): p. 96-118.
17. Holme, I., et al., *Risk factors and raised atherosclerotic lesions in coronary and cerebral arteries. Statistical analysis from the Oslo study*. *Arteriosclerosis*, 1981. **1**(4): p. 250-6.
18. Cresanta, J.L., et al., *Serum lipoprotein levels in children: epidemiologic and clinical implications*. *J Chronic Dis*, 1982. **35**(1): p. 41-51.
19. Cresanta, J.L., et al., *Serum lipid and lipoprotein cholesterol grids for cardiovascular risk screening of children*. *Am J Dis Child*, 1984. **138**(4): p. 379-87.

20. Newman, W.P., 3rd, et al., *Relation of serum lipoprotein levels and systolic blood pressure to early atherosclerosis. The Bogalusa Heart Study.* N Engl J Med, 1986. **314**(3): p. 138-44.
21. Strong, J.P., et al., *Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study.* JAMA, 1999. **281**(8): p. 727-35.
22. Organization, W.H., *The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life*  
*World health report, ISSN 1020-3311.* 2002. p. 248.
23. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
24. Gotto, A.M., *The ILIB Lipid Handbook for clinical practice.* 1995, Houston, Tx 77030, USA: International Lipid Information Bureau.
25. Gotto, A.M., Jr., H.J. Pownall, and R.J. Havel, *Introduction to the plasma lipoproteins.* Methods Enzymol, 1986. **128**: p. 3-41.
26. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.* Free Radic Biol Med, 1992. **13**(4): p. 341-90.
27. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(10): p. 2804-8.
28. Goldstein, J.L., et al., *Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction.* J Clin Invest, 1973. **52**(7): p. 1533-43.
29. Rigotti, A., *Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E.* Mol Aspects Med, 2007. **28**(5-6): p. 423-36.
30. WHO, *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic: The MPOWER Package.* 2008: p. 688-699.
31. Hatsukami, D.K., L.F. Stead, and P.C. Gupta, *Tobacco addiction.* Lancet, 2008. **371**(9629): p. 2027-38.
32. Davis, R.M., et al., *The Hitchhiker's Guide to Tobacco Control: a global assessment of harms, remedies, and controversies.* Annu Rev Public Health, 2007. **28**: p. 171-94.
33. Doll, R., et al., *Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors.* Br J Cancer, 2005. **92**(3): p. 426-9.
34. Harris, M.I., *Classification and diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance.* Prim Care, 1988. **15**(2): p. 205-25.
35. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030.* Diabetes Res Clin Pract, 2011. **94**(3): p. 311-21.
36. Gu, K., C.C. Cowie, and M.I. Harris, *Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults.* JAMA, 1999. **281**(14): p. 1291-7.
37. *Prevalence of small vessel and large vessel disease in diabetic patients from 14 centres. The World Health Organisation Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics.* Diabetologia, 1985: p. 615-640.
38. Haffner, S.M., et al., *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction.* N Engl J Med, 1998. **339**(4): p. 229-34.
39. Garcia, M.J., et al., *Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study.* Diabetes, 1974. **23**(2): p. 105-11.
40. WHO, *Información general sobre la HIPERTENSIÓN en el mundo.* 2013.
41. ACC/AHA, *2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults.* J Am Coll Cardiol, 2017.

42. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
43. Collaboration, N.C.D.R.F., *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10026): p. 1377-1396.
44. Hubert, H.B., et al., *Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study*. Circulation, 1983. **67**(5): p. 968-77.
45. Fildes, A., et al., *Probability of an Obese Person Attaining Normal Body Weight: Cohort Study Using Electronic Health Records*. Am J Public Health, 2015. **105**(9): p. e54-9.
46. Berrington de Gonzalez, A., et al., *Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults*. N Engl J Med, 2010. **363**(23): p. 2211-9.
47. Flegal, K.M., et al., *Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity*. JAMA, 2007. **298**(17): p. 2028-37.
48. Zheng, W., et al., *Association between body-mass index and risk of death in more than 1 million Asians*. N Engl J Med, 2011. **364**(8): p. 719-29.
49. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
50. Lumeng, C.N. and A.R. Saltiel, *Inflammatory links between obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2111-7.
51. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
52. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, *Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 875-80.
53. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
54. Hertzfel, A.V., et al., *Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E814-23.
55. Hotamisligil, G.S., et al., *Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1377-9.
56. Hotamisligil, G.S., et al., *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance*. Science, 1996. **271**(5249): p. 665-8.
57. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
58. Choi, A.J. and S.W. Ryter, *Inflammasomes: molecular regulation and implications for metabolic and cognitive diseases*. Mol Cells, 2014. **37**(6): p. 441-8.
59. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, *The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 707-35.
60. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
61. Garg, N.J., *Inflammasomes in cardiovascular diseases*. Am J Cardiovasc Dis, 2011. **1**(3): p. 244-54.
62. Lu, X. and V. Kakkar, *Inflammasome and atherogenesis*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(1): p. 108-24.
63. Mezzaroma, E., et al., *The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(49): p. 19725-30.
64. Yin, Y., et al., *Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation*. Front Biosci (Landmark Ed), 2013. **18**: p. 638-49.
65. Arend, W.P., G. Palmer, and C. Gabay, *IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 20-38.
66. Feve, B. and J.P. Bastard, *The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(6): p. 305-11.

67. Spranger, J., et al., *Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 812-7.
68. Kotas, M.E. and R. Medzhitov, *Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility*. Cell, 2015. **160**(5): p. 816-27.
69. Kearns, C.E., L.A. Schmidt, and S.A. Glantz, *Sugar Industry and Coronary Heart Disease Research: A Historical Analysis of Internal Industry Documents*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(11): p. 1680-1685.
70. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.
71. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
72. Diaz, M.N., et al., *Antioxidants and atherosclerotic heart disease*. N Engl J Med, 1997. **337**(6): p. 408-16.
73. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(2): p. 131-8.
74. Hansson, G.K., et al., *Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis*. Circ Res, 2002. **91**(4): p. 281-91.
75. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
76. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
77. Lamkanfi, M. and V.M. Dixit, *Mechanisms and functions of inflammasomes*. Cell, 2014. **157**(5): p. 1013-22.
78. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
79. Dinarello, C.A., *Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 447S-455S.
80. Thornberry, N.A., et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
81. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
82. Stutz, A., D.T. Golenbock, and E. Latz, *Inflammasomes: too big to miss*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3502-11.
83. Masters, S.L., *Specific inflammasomes in complex diseases*. Clin Immunol, 2013. **147**(3): p. 223-8.
84. Takahashi, M., *Role of the inflammasome in myocardial infarction*. Trends Cardiovasc Med, 2011. **21**(2): p. 37-41.
85. Sutterwala, F.S., S. Haasken, and S.L. Cassel, *Mechanism of NLRP3 inflammasome activation*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1319**: p. 82-95.
86. Lu, A., et al., *Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1193-1206.
87. Srinivasula, S.M., et al., *The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21119-22.
88. Stehlik, C., et al., *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6154-63.
89. Ozaki, E., M. Campbell, and S.L. Doyle, *Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives*. J Inflamm Res, 2015. **8**: p. 15-27.

90. Vanaja, S.K., V.A. Rathinam, and K.A. Fitzgerald, *Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(5): p. 308-15.
91. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 155-61.
92. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 787-91.
93. Hornung, V. and E. Latz, *Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 620-3.
94. Compan, V., et al., *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling*. J Immunol, 2015. **194**(3): p. 1261-73.
95. Munoz-Planillo, R., et al., *K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1142-53.
96. Petrilli, V., et al., *Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
97. Subramanian, N., et al., *The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation*. Cell, 2013. **153**(2): p. 348-61.
98. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
99. Gimbrone, M.A.J. and J.N. Topper, *Biology of the vessel wall*, in *Molecular basis of cardiovascular disease*. 1999. p. 331-348.
100. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
101. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
102. 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.
103. Goss, S.P., N. Hogg, and B. Kalyanaraman, *The antioxidant effect of spermine NONOate in human low-density lipoprotein*. Chem Res Toxicol, 1995. **8**(5): p. 800-6.
104. Hogg, N., et al., *Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors*. J Lipid Res, 1995. **36**(8): p. 1756-62.
105. O'Donnell, V.B., et al., *Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol*. Biochemistry, 1997. **36**(49): p. 15216-23.
106. 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.
107. 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.
108. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance*. Eur J Clin Invest, 1991. **21**(4): p. 361-74.
109. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
110. Pepine, C., *Endothelial dysfunction and its role in the cycle of cardiovascular disease*. Can J Cardiol, 1998. **14 Suppl D**: p. 5D-7D.
111. Bauersachs, J., et al., *Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production*. Circulation, 1999. **100**(3): p. 292-8.

112. Busse, R. and I. Fleming, *Endothelial dysfunction in atherosclerosis*. J Vasc Res, 1996. **33**(3): p. 181-94.
113. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. Lancet, 1992. **340**(8828): p. 1111-5.
114. Clarkson, P., et al., *Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1989-94.
115. Clarkson, P., et al., *Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3378-83.
116. Harrison, D.G., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2153-7.
117. Lekakis, J.P., et al., *Peripheral vascular endothelial dysfunction in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(3): p. 541-6.
118. Levine, G.N., et al., *Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease*. Circulation, 1996. **93**(6): p. 1107-1112.
119. Motoyama, T., et al., *Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 2): p. H1644-50.
120. Motoyama, T., et al., *Flow-mediated, endothelium-dependent dilatation of the brachial arteries is impaired in patients with coronary spastic angina*. Am Heart J, 1997. **133**(3): p. 263-7.
121. Pepine, C.J., *Clinical implications of endothelial dysfunction*. Clin Cardiol, 1998. **21**(11): p. 795-9.
122. Greenland, P., et al., *Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III*. Circulation, 2000. **101**(1): p. E16-22.
123. Kinderlerer, A.R., et al., *Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1598-607.
124. Deramaudt, B.M., et al., *Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis*. J Cell Biochem, 1998. **68**(1): p. 121-7.
125. Li Volti, G., et al., *Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(5-6): p. 704-10.
126. Li Volti, G., et al., *Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(5): p. 1077-82.
127. Nakagami, T., et al., *A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1158**(2): p. 189-93.
128. True, A.L., et al., *Heme oxygenase-1 deficiency accelerates formation of arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide*. Circ Res, 2007. **101**(9): p. 893-901.
129. Babior, B.M., *NADPH oxidase*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 42-7.
130. 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.
131. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
132. Jeremy, J.Y., et al., *Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 580-94.
133. Jeremy, J.Y., et al., *Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease*. J Card Surg, 2002. **17**(4): p. 324-7.

134. 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.
135. Muzaffar, S., N. Shukla, and J.Y. Jeremy, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs?* Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(8): p. 278-82.
136. Clempus, R.E. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 216-25.
137. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
138. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 551-61.
139. Pentikainen, M.O., et al., *Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima*. J Intern Med, 2000. **247**(3): p. 359-70.
140. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
141. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
142. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
143. Witztum, J.L., *The oxidation hypothesis of atherosclerosis*. Lancet, 1994. **344**(8925): p. 793-5.
144. Miller, Y.I., et al., *Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1561-8.
145. West, X.Z., et al., *Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 972-6.
146. Hurt-Camejo, E., et al., *Phospholipase A(2) in vascular disease*. Circ Res, 2001. **89**(4): p. 298-304.
147. Lonn, E., et al., *Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial*. JAMA, 2005. **293**(11): p. 1338-47.
148. Mann, J.F., et al., *Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in people with chronic kidney disease--results of the renal Hope-2 study*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(2): p. 645-53.
149. Investigators, S., et al., *Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease*. N Engl J Med, 2014. **370**(18): p. 1702-11.
150. O'Donoghue, M.L., et al., *Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial*. JAMA, 2014. **312**(10): p. 1006-15.
151. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
152. Nakashima, Y., et al., *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 842-51.
153. Fowler, S., H. Shio, and N.J. Haley, *Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations*. Lab Invest, 1979. **41**(4): p. 372-8.
154. Robbins, C.S., et al., *Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis*. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1166-72.
155. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 136-45.
156. Buono, C., et al., *Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1373-81.

157. Rajamaki, K., et al., *Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11765.
158. Loppnow, H. and P. Libby, *Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 731-8.
159. Maier, W., et al., *Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein*. Circulation, 2005. **111**(11): p. 1355-61.
160. Biasucci, L.M., et al., *Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(5): p. 874-7.
161. Richardson, P.D., M.J. Davies, and G.V. Born, *Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques*. Lancet, 1989. **2**(8669): p. 941-4.
162. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I*. Circulation, 2003. **108**(14): p. 1664-72.
163. van der Wal, A.C., et al., *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 36-44.
164. Kubo, T., et al., *Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(10): p. 933-9.
165. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
166. Delmastro-Greenwood, M., B.A. Freeman, and S.G. Wendell, *Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 79-105.
167. 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.
168. Bonacci, G., et al., *Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration*. J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44071-82.
169. Ferreira, A.M., et al., *Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 223-34.
170. Freeman, B.A., et al., *Nitro-fatty acid formation and signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15515-9.
171. Rudolph, V., et al., *Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 155-66.
172. 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.
173. 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.
174. 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.
175. Lundberg, J.O. and E. Weitzberg, *Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract*. Gut, 2013. **62**(4): p. 616-29.
176. Vitturi, D.A., et al., *Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(7): p. 504-10.
177. Schopfer, F.J., C. Cipollina, and B.A. Freeman, *Formation and signaling actions of electrophilic lipids*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5997-6021.



178. Napetschnig, J. and H. Wu, *Molecular basis of NF-kappaB signaling*. Annu Rev Biophys, 2013. **42**: p. 443-68.
179. Chen, J. and Z.J. Chen, *Regulation of NF-kappaB by ubiquitination*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 4-12.
180. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
181. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
182. Ambrozova, G., et al., *Nitro-oleic acid modulates classical and regulatory activation of macrophages and their involvement in pro-fibrotic responses*. Free Radic Biol Med, 2016. **90**: p. 252-260.
183. Cui, T., et al., *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
184. Villacorta, L., et al., *Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts*. Cardiovasc Res, 2013. **98**(1): p. 116-24.
185. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 401-26.
186. Mitsuishi, Y., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 200.
187. Motohashi, H. and M. Yamamoto, *Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism*. Trends Mol Med, 2004. **10**(11): p. 549-57.
188. Canning, P. and A.N. Bullock, *New strategies to inhibit KEAP1 and the Cul3-based E3 ubiquitin ligases*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 103-7.
189. Zhang, D.D., et al., *Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30091-9.
190. Kansanen, E., et al., *Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14019-27.
191. Kobayashi, A., et al., *Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 221-9.
192. 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.
193. Ahmadian, M., et al., *PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 557-66.
194. 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.
195. Khoo, N.K. and B.A. Freeman, *Electrophilic nitro-fatty acids: anti-inflammatory mediators in the vascular compartment*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(2): p. 179-84.
196. Li, Y., et al., *Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 865-7.
197. De Maio, A., *Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams*. Shock, 1999. **11**(1): p. 1-12.
198. Pockley, A.G., et al., *Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease*. Hypertension, 2000. **36**(2): p. 303-7.
199. Dybdahl, B., et al., *Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 685-90.
200. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 558-61.

201. Ali, A., et al., *HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in Xenopus oocytes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 4949-60.
202. Shi, Y., D.D. Mosser, and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 654-66.
203. Dayalan Naidu, S., R.V. Kostov, and A.T. Dinkova-Kostova, *Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(1): p. 6-14.
204. Kansanen, E., et al., *Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33233-41.
205. Khoo, N.K., et al., *Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(2): p. 230-9.
206. Zhang, J., et al., *Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension*. Circ Res, 2010. **107**(4): p. 540-8.
207. 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.
208. Gonzalez-Perilli, L., et al., *Nitroarachidonic acid (NO2AA) inhibits protein disulfide isomerase (PDI) through reversible covalent adduct formation with critical cysteines*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1861**(5 Pt A): p. 1131-1139.
209. Rudolph, T.K., et al., *Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(5): p. 938-45.
210. Cole, M.P., et al., *Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 965-72.
211. Liu, Y., et al., *Combined losartan and nitro-oleic acid remarkably improves diabetic nephropathy in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(11): p. F1555-62.
212. Rudolph, V., et al., *Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1461-73.
213. 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.
214. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, . 20th Edition ed. 2018: Merck Research Laboratories.
215. Bohula, E.A., et al., *Achievement of dual low-density lipoprotein cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein targets more frequent with the addition of ezetimibe to simvastatin and associated with better outcomes in IMPROVE-IT*. Circulation, 2015. **132**(13): p. 1224-33.
216. Nissen, S.E., et al., *Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(1): p. 29-38.
217. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy*. N Engl J Med, 2005. **352**(1): p. 20-8.
218. Ridker, P.M., et al., *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2195-207.
219. Ridker, P.M., et al., *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. N Engl J Med, 2001. **344**(26): p. 1959-65.
220. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
221. Larsen, C.M., et al., *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1517-26.
222. Tanaka, K., Y. Kyuuko, and T. Hidaka, *Process for producing chroman compound*, in *WO PCT*, I. Mitsubishi Gas Chemical Company, Editor. 2005, Mitsubishi Gas Chemical Company, INC.: JAPAN.

223. Browne, E.C., S.J. Langford, and B.M. Abbott, *Synthesis and effects of conjugated tocopherol analogues on peptide nucleic acid hybridisation*. *Org Biomol Chem*, 2013. **11**(39): p. 6744-50.
224. Mazzini, F., et al., *Approaches to the Preparation of 4-Benzyloxy-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -D3)methylphenol, a Building Block for Labeled  $\delta$ -Tocopherol, and a New Synthesis of R,R,R-5-D3- $\alpha$ -Tocopherol*. *Eur. J. Org. Chem.*, 2004. **23**: p. 4864 – 4869.
225. Koufaki, M., et al., *Synthesis and biological evaluation of benzopyran analogues bearing class III antiarrhythmic pharmacophores*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(19): p. 6666-78.
226. Turell, L., et al., *The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(4): p. 1145-1159.
227. Teissier, E., et al., *Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins*. *Clin Chem*, 1996. **42**(3): p. 430-5.
228. Batthyany, C., et al., *Direct evidence for apo B-100-mediated copper reduction: studies with purified apo B-100 and detection of tryptophanyl radicals*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **384**(2): p. 335-40.
229. Botti, H., et al., *Peroxynitrite-mediated alpha-tocopherol oxidation in low-density lipoprotein: a mechanistic approach*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(2): p. 152-62.
230. Gistera, A. and G.K. Hansson, *The immunology of atherosclerosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2017. **13**(6): p. 368-380.
231. Solomon, S.D., et al., *Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas*. *Circulation*, 2006. **114**(10): p. 1028-35.
232. Kansanen, E., H.K. Jyrkkanen, and A.L. Levonen, *Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **52**(6): p. 973-82.
233. Kansanen, E., et al., *The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. *Redox Biol*, 2013. **1**: p. 45-9.
234. Reiter, E., Q. Jiang, and S. Christen, *Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol*. *Mol Aspects Med*, 2007. **28**(5-6): p. 668-91.
235. Li, X., et al., *Activation of Nlrp3 inflammasomes enhances macrophage lipid-deposition and migration: implication of a novel role of inflammasome in atherogenesis*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87552.
236. Zheng, F., et al., *NLRP3 Inflammasomes Show High Expression in Aorta of Patients with Atherosclerosis*. *Heart, Lung and Circulation*, 2013.
237. He, Y., et al., *3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(2): p. 1142-50.
238. Garber, D.W., K.R. Kulkarni, and G.M. Anantharamaiah, *A sensitive and convenient method for lipoprotein profile analysis of individual mouse plasma samples*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(6): p. 1020-6.
239. Yin, W., et al., *Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(1): p. 51-65.
240. Pratico, D., et al., *Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. *Nat Med*, 1998. **4**(10): p. 1189-92.
241. Shing, C.M., et al., *Effect of tocopherol on atherosclerosis, vascular function, and inflammation in apolipoprotein E knockout mice with subtotal nephrectomy*. *Cardiovasc Ther*, 2014. **32**(6): p. 270-5.
242. Thomas, S.R., et al., *Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(4): p. 585-93.
243. Renshaw, S.A., et al., *A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation*. *Blood*, 2006. **108**(13): p. 3976-8.
-

244. Robertson, A.L., et al., *A zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(225): p. 225ra29.
245. Cabrera, M., et al., *Genetic toxicology and preliminary in vivo studies of nitric oxide donor tocopherol analogs as potential new class of antiatherogenic agents*. *Drug Chem Toxicol*, 2011. **34**(3): p. 285-93.
246. Lopez, G.V., et al., *Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs*. *Bioorg Med Chem*, 2005. **13**(20): p. 5787-96.
247. Lopez, G.V., et al., *Second generation of alpha-tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization*. *Bioorg Med Chem*, 2007. **15**(18): p. 6262-72.
248. Lopez, G.V., et al., *Interaction studies between human alpha-tocopherol transfer protein and nitric oxide donor tocopherol analogues with LDL-protective activity*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(24): p. 8143-8.
249. Ingold, M., G.V. López, and W. Porcal, *Green Conditions for Passerini Three-Component Synthesis of Tocopherol Analogues*. *ACS Sust Chem Eng.*, 2014. **2**: p. 1093-1097.
250. Gómez, L.E., *Tesina de graduación: "Nuevos análogos sintéticos de la vitamina E liberadores de ·NO: estudios de liberación de ·NO en células y determinación de capacidad vasoactiva."* Facultad de Ciencias, 2009. 2009.
251. 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.
252. Gibson, Q.H. and F.J. Roughton, *The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin*. *J Physiol*, 1957. **136**(3): p. 507-24.
253. Mellion, B.T., et al., *Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators*. *Blood*, 1981. **57**(5): p. 946-55.
254. Maron, D.M. and B.N. Ames, *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. *Mutat Res*, 1983. **113**(3-4): p. 173-215.
255. OECD, *The Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001. Test No. 471: Mammalian Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.* [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test\\_9789264071247-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en) (accessed March 19, 2018). 2001.
256. Chu, K.C., et al., *Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays*. *Mutat Res*, 1981. **85**(3): p. 119-32.
257. OECD, *The Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.* <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264264762-en> (accessed February 9, 2018). 2018.
258. OECD, *The Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001. Test No. 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.* <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071049-en> (accessed February 9, 2018). . 2001.
259. Organization, W.H., *Cardiovascular diseases (CVDs)*. WHO Fact sheet, 2017. **Updated May 2017**.
260. Mayerl, C., et al., *Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow*. *Virchows Arch*, 2006. **449**(1): p. 96-103.
261. 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.
-

262. Baker, P.R., et al., *Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(8): p. 989-1003.
263. Grebe, A., F. Hoss, and E. Latz, *NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis*. Circ Res, 2018. **122**(12): p. 1722-1740.
264. Mann, G.E., et al., *Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(2): p. 139-45.
265. Brigelius-Flohe, R. and M.G. Traber, *Vitamin E: function and metabolism*. FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1145-55.
266. Yoshida, H., et al., *Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol*. J Lipid Res, 1992. **33**(3): p. 343-50.
267. Kayden, H.J. and M.G. Traber, *Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans*. J Lipid Res, 1993. **34**(3): p. 343-58.
268. Mardones, P. and A. Rigotti, *Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease*. J Nutr Biochem, 2004. **15**(5): p. 252-60.
269. Peluzio, M.C., et al., *Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(12): p. 1539-45.
270. GISSI, *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial*. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Lancet, 1999. **354**(9177): p. 447-55.
271. Stephens, N.G., et al., *Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)*. Lancet, 1996. **347**(9004): p. 781-6.
272. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study, I., et al., *Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients*. N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 154-60.
273. Couzin-Frankel, J., *Cardiovascular disease. Massive trials to test inflammation hypothesis*. Science, 2012. **337**(6099): p. 1158.
274. Hansson, G.K., *Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy*. Circulation, 2017. **136**(20): p. 1875-1877.
275. Ridker, P.M. and T.F. Luscher, *Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease*. Eur Heart J, 2014. **35**(27): p. 1782-91.
276. Ridker, P.M., et al., *Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)*. Am Heart J, 2011. **162**(4): p. 597-605.
277. Fukui, T., et al., *Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension*. Circ Res, 1999. **85**(1): p. 23-8.
278. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
279. Griendling, K.K. and M. Ushio-Fukai, *Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 21-7.
280. Hanna, I.R., et al., *NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(6): p. 899-914.
281. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
282. Mathias, J.R., et al., *Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(11): p. 1212-7.

283. Loynes, C.A., et al., *Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(2): p. 203-12.
284. Wang, X., et al., *Inhibitors of neutrophil recruitment identified using transgenic zebrafish to screen a natural product library*. Dis Model Mech, 2014. **7**(1): p. 163-9.
285. Hasegawa, T., et al., *Transient inflammatory response mediated by interleukin-1beta is required for proper regeneration in zebrafish fin fold*. Elife, 2017. **6**.
286. Nguyen-Chi, M., et al., *TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae*. Cell Death Dis, 2017. **8**(8): p. e2979.
287. Ogryzko, N.V., et al., *Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase-dependent amplification of the inflammatory response*. Dis Model Mech, 2014. **7**(2): p. 259-64.
288. Mazzini, F.N., T. Salvadori, P., *Easy route to labeled and unlabeled R,R,R- $\gamma$ -tocopherol by aryl demethylation of  $\alpha$ -homologues*. Tetrahedron, 2005(61): p. 813-817.
289. Hyatt, J.A., *Convenient Preparation of 2,7,8-Trimethyl-6-hydroxychroman-2-carboxylic Acid (gamma-Troxol)*. Synthetic Communications, 2008 p. 8-14.
290. Ellis, K.J. and J.F. Morrison, *Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes*. Methods Enzymol, 1982. **87**: p. 405-26.
291. Eugenia Schroeder, M., et al., *Pro-inflammatory Ca(++)-activated K(+) channels are inhibited by hydroxychloroquine*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 1892.
292. Escande, C., et al., *Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype*. Diabetes, 2015. **64**(1): p. 12-22.
293. Feng, M., et al., *Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements*. Am J Hypertens, 2008. **21**(12): p. 1288-91.
294. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
295. Kamaid, A., et al., *Betaglycan knock-down causes embryonic angiogenesis defects in zebrafish*. Genesis, 2015. **53**(9): p. 583-603.
296. Chung, B.H., et al., *Single vertical spin density gradient ultracentrifugation*. Methods Enzymol, 1986. **128**: p. 181-209.

## **X) Anexos**

## XI) Anexo I: Manuscrito Nro 1.

www.nature.com/scientificreports

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Electrophilic nitroalkene-tocopherol derivatives: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory signaling responses

Received: 21 May 2018  
Accepted: 14 August 2018  
Published online: 24 August 2018

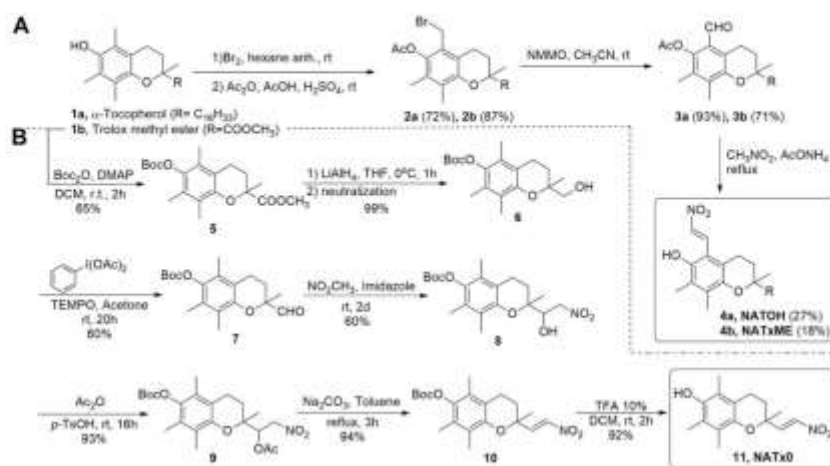
Jorge Rodríguez-Duarte<sup>1,2,3</sup>, Rosina Dapuerto<sup>1,2,3</sup>, Germán Galliussi<sup>1,2</sup>, Lucía Turell<sup>4</sup>, Andrés Kamaid<sup>3,5</sup>, Nicholas K. H. Khoo<sup>6</sup>, Francisco J. Schopfer<sup>6</sup>, Bruce A. Freeman<sup>6</sup>, Carlos Escande<sup>3,7</sup>, Carlos Batthyány<sup>1,3,5</sup>, Gerardo Ferrer-Sueta<sup>8</sup> & Gloria V. López<sup>1,2,3</sup>

Inflammation plays a major role in the onset and development of chronic non-communicable diseases like obesity, cardiovascular diseases and cancer. Combined, these diseases represent the most common causes of death worldwide, thus development of novel pharmacological approaches is crucial. Electrophilic nitroalkenes derived from fatty acids are formed endogenously and exert anti-inflammatory actions by the modification of proteins involved in inflammation signaling cascades. We have developed novel nitroalkenes derived from  $\alpha$ -tocopherol aiming to increase its salutary actions by adding anti-inflammatory properties to a well-known nutraceutical. We synthesized and characterized an  $\alpha$ -tocopherol-nitroalkene (NATOH) and two hydrosoluble analogues derived from Trolox (NATxME and NATxO). We analyzed the kinetics of the Michael addition reaction of these compounds with thiols in micellar systems aiming to understand the effect of hydrophobic partition on the reactivity of nitroalkenes. We studied NATxME *in vitro* showing it exerts non-conventional anti-inflammatory responses by inducing Nrf2-Keap1-dependent gene expression and inhibiting the secretion of NF- $\kappa$ B dependent pro-inflammatory cytokines. NATxME was also effective *in vivo*, inhibiting neutrophil recruitment in a zebrafish model of inflammation. This work lays the foundation for the rational design of a new therapeutic strategy for the prevention and treatment of metabolic and inflammation-related diseases.

Chronic non-communicable diseases (CNCD) constitute the major cause of mortality in the world, accounting for 70% of all deaths<sup>1</sup>. Modern life styles, which include sedentarism and high-caloric diets concomitant with a high daily sugar intake has led to a dramatic increase in the incidence of these pathologies<sup>2</sup>. Among cardiovascular diseases, atherosclerosis is a major health issue, leading to 30 to 50% of deaths worldwide<sup>3</sup>. In the last decade, low grade, chronic and sterile inflammation have been associated with the activation of different cellular signaling pathways (mainly NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation) and has appeared as an important player in the pathogenesis of these chronic diseases<sup>1-5</sup>. The inflammatory response promotes the olefinic nitration of unsaturated fatty acids such as conjugated linoleic acid, resulting in the formation of

<sup>1</sup>Laboratory of Vascular Biology and Drug Development, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. <sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>INDICYO Program, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. <sup>4</sup>Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. <sup>5</sup>Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Montevideo, Uruguay. <sup>6</sup>Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. <sup>7</sup>Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. <sup>8</sup>Laboratorio de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.B. (email: batthyany@pasteur.edu.uy) or G.F.-S. (email: gfe@fmed.edu.uy) or G.V.L. (email: vlopez@fq.edu.uy)





**Figure 1.** Synthesis of novel nitroalkene analogues of  $\alpha$ -tocopherol. (A) Synthesis of NATOH and NATxME; (B) Synthesis of NATx0.

nitroalkenes<sup>10,11</sup>. These molecules exert pleiotropic anti-inflammatory responses due to the post-translational modification of functionally-significant proteins<sup>12</sup> that are critically involved in regulating inflammatory and metabolic signaling. Nitroalkenes are activators of Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ), Heat-Shock-Response (HSR) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Kelch ECH associating protein 1 (Nrf2-Keap1), whilst they inhibit pro-inflammatory responses regulated by the transcription factor NF- $\kappa$ B<sup>16,17</sup>. Due to these interesting signaling properties, unsaturated fatty acid nitroalkene derivatives have been tested in preclinical animal models of CNCD. Their principal pharmacological applications include the treatment of atherosclerosis, systemic and pulmonary hypertension and diabetes. In fact, nitrated unsaturated fatty acids have shown promising results in animal models of all these diseases<sup>18–22</sup>. However, nitroalkenes derived from fatty acids have metabolic disadvantages due to their metabolism and inactivation via  $\beta$ -oxidation, olefin saturation and thiol conjugation<sup>23</sup>. These limitations, as well as other factors, affirm the need for novel approaches to improve efficacy while maintaining similar anti-inflammatory activity.

Aiming to develop novel pharmacological compounds for the prevention and treatment of inflammatory and metabolic diseases (e.g. cardiovascular, hypertension, obesity-induced insulin resistance, type II diabetes), we have developed nitroalkene analogues of  $\alpha$ -tocopherol as novel dual anti-oxidant and anti-inflammatory mediators.

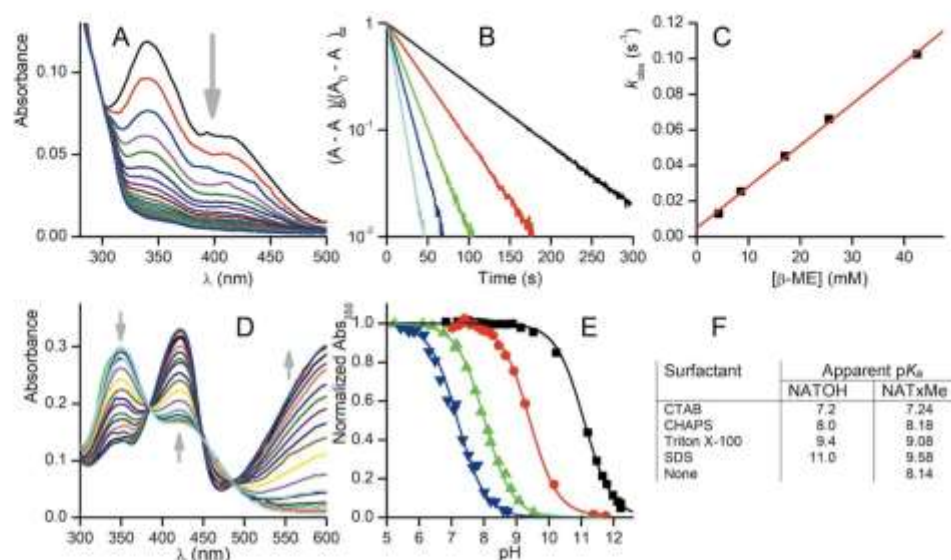
Dietary  $\alpha$ -tocopherol, the most biologically active form of vitamin E, is preferentially incorporated into nascent lipoproteins by the action of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP) in the liver, and from there distributed to the organism. Thus, we took advantage of this scaffold and used the lipoproteins to transport the nitroalkene-tocopherol analogue as cargo. The nitroalkene derivative of  $\alpha$ -tocopherol (NATOH, Fig. 1) was designed to be distributed by lipoproteins, reaching the vasculature and, importantly, the atheroma plaque, the characteristic lesion of atherosclerosis.

In parallel, we designed and synthesized nitroalkenes derived from Trolox<sup>TM</sup> (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a water-soluble analogue of  $\alpha$ -tocopherol (NATxME and NATx0, Fig. 1), aiming to develop other non-conventional anti-inflammatory compounds with different physicochemical and absorption, distribution, metabolism and excretion properties. NATxME possesses the nitroalkenyl group in the same position as NATOH, meanwhile NATx0 have this electrophilic group in another position, not conjugated with the aromatic ring. The structural differences allow us to study how the position of the nitroalkene group may modulate their electrophilicity and therefore their biological effects.

The predominant mechanism by which nitroalkenes exert signaling actions is a consequence of the Michael addition of nucleophiles such as cysteine and, at higher concentrations, histidine residues in proteins<sup>12,24</sup>. Such reaction involves a charged transition state that is expected to be disfavored in hydrophobic media<sup>25</sup>. Therefore, reaction kinetics in aqueous solution only partially describes the fate and target selectivity of nitroalkenes *in vivo*. In that respect, the study of the reactivity of NATOH and its less hydrophobic analogues represents an opportunity to assess the effect of membrane partition on the reactivity and selectivity of electrophiles.

Additionally, we evaluated the anti-inflammatory properties for nitroalkenyl-containing compounds in cell culture, and to move further, we examined whether these hybrid compounds may exert their protective effects *in vivo* using a zebrafish model of inflammation.

In summary, we performed a physicochemical study to understand determinants of nitroalkenes reactivity, and tested their anti-inflammatory actions *in vitro* and *in vivo*. This study established foundations to rationally modify a specific synthetic molecule in order to improve its pharmacological properties.



**Figure 2.** Reaction of synthetic nitroalkenes with nucleophiles in different environments. **(A)** Spectral change upon reaction of 10  $\mu$ M NATOH with 0.1 mM  $\beta$ ME in TMA20 buffer at pH 8.1 containing 2.5 g/L SDS. **(B)** First-order plots obtained at different concentrations of  $\beta$ ME measuring absorbance at 350 nm. **(C)** Second-order plot for the same experiment, linear fit parameters  $k_1$  (slope) = 2.3 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>,  $k_2$  (intercept) = 5  $\times$  10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>. **(D)** Spectral change upon titration of NATOH in CHAPS micelles. The arrows indicate the change upon increase in pH of the bulk solution. **(E)** Titration curves of NATOH at 350 nm in TMA20 buffer and different micelle suspensions, from left to right, CTAB, CHAPS, Triton X-100 and SDS. The absorbance was normalized to the acidic and alkaline extrapolated values of the fit. **(F)** Apparent pK<sub>a</sub> results of NATOH and NATxME in different micellar media.

## Results

**Synthesis of nitroalkene analogues of  $\alpha$ -tocopherol and Trolox: NATOH, NATxME, NATx0.** In the first two compounds (Fig. 1A), the nitroalkenyl group is located on the 5-position of the chroman ring of  $\alpha$ -tocopherol **1a** or on its water soluble analogue, methyl 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-3-carboxylate (Trolox methyl ester) **1b**, obtained as described<sup>27</sup>. The synthetic route by which these derivatives were obtained is depicted in Fig. 1. Alpha-tocopherol or Trolox methyl ester were transformed to the corresponding bromoacetate by treatment with bromine followed by *O*-acetylation<sup>28,29</sup>. Then, the 6-*O*-acetyl-5a-bromo derivative **2** oxidation with *N*-methylmorpholine *N*-oxide yields the corresponding aldehyde **3** as described in the literature<sup>30,31</sup>. Finally, condensation of **3** with nitromethane, in the presence of ammonium acetate, gave the desired nitroalkene **4a** (NATOH) or **4b** (NATxME) (Fig. 1A)<sup>12</sup>. Due to the coupling constant of the doublets of the alkene observed in the <sup>1</sup>H NMR spectra, the configuration of both nitroalkenes is consistent with an *E* isomer (Fig. 1A).

Additionally, a derivative with the nitroalkenyl group located on the side chain at the 2-position of the chroman ring was synthesized as described in Fig. 1B. The phenolic group of **1b** was protected by treatment with di-*tert*-butyl dicarbonate to produce the ester **5**<sup>32</sup>. Then, the methyl ester was reduced to a primary alcohol<sup>14</sup> and subsequently oxidized to produce the aldehyde derivative **7**. The  $\beta$ -nitro alcohol intermediate **8** was obtained via condensation of **7** with nitromethane in the presence of imidazole, followed by acetylation and elimination to render the nitroalkene **10** with almost quantitative yields. Finally, phenol deprotection gave the desired product **11** (NATx0, Fig. 1B) with an *E* configuration as suggested by the coupling constant observed in the <sup>1</sup>H NMR spectra.

**Electrophilic behavior of NATOH, NATxME and NATx0.** The accepted mode of action driving the biological activity of nitroalkenes is by addition reactions with nucleophiles, mainly thiols<sup>12,26</sup>. We approached the kinetic characterization of the addition of thiols to our synthetic nitroalkenes taking advantage of their optical and partition properties. The three novel nitroalkenes synthesized were observed to react with glutathione (GSH) and  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ ME). In the case of NATOH and NATxME the addition reaction disrupts the chromophore formed by the nitroalkene conjugated to the aromatic chroman, leading to a dose dependent decrease in UV-Visible absorption (Fig. 2A and Figure S1). This decrease in absorbance was used to monitor the reaction at the  $\lambda_{max}$  350 nm. In the case of NATx0 there is no disruption of the chromophore because the nitroalkene is not conjugated to the chromane. Eventhough the reaction was followed spectrophotometrically at 285 nm (consumption of the nitroalkene) and at 260 nm (production of the adduct) (Figure S1B)<sup>16</sup>. This reaction shows similar spectrophotometric behaviors as the one exerted by nitrated unsaturated fatty acids with nucleophiles<sup>16</sup>.

Surfactant	NATOH			
	Electrophilic reactivity			
	Thiol	pH	$k_1$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )
CTAB	GSH	7.1	576	0.36
	$\beta$ -ME	7	343	0.13
CHAPS	GSH	6.7	34	$1.7 \times 10^{-2}$
		7.0	100	$4 \times 10^{-2}$
		7.3	140	$6.2 \times 10^{-2}$
	$\beta$ -ME	6.9	53	$9.9 \times 10^{-4}$
		7.1	83	$1.5 \times 10^{-2}$
		8.3	383	0.15
Triton X-100	GSH	7.1	0.8	N.D.
	$\beta$ -ME	7	6.5	$1.8 \times 10^{-3}$
SDS	GSH	7.2	0.2	
		7.5	0.63	$3 \times 10^{-6}$
	$\beta$ -ME	7.8	1.0	$4.9 \times 10^{-4}$
		8.1	2.3	$5 \times 10^{-6}$
<b>NATxMe</b>				
None	GSH	7.1	1370	N.D.
	$\beta$ -ME	7.1	349	
<b>NATx0</b>				
None	GSH	7.1	71	N.D.
	$\beta$ -ME	7.1	21	
	GAPDH	7.4	220	

**Table 1.** Rate constants of nucleophilic addition of NATOH and NATxME to GSH and  $\beta$ -ME in micellar suspension and aqueous solution. Addition rate constant of NATx0 to GSH,  $\beta$ -ME and GAPDH.

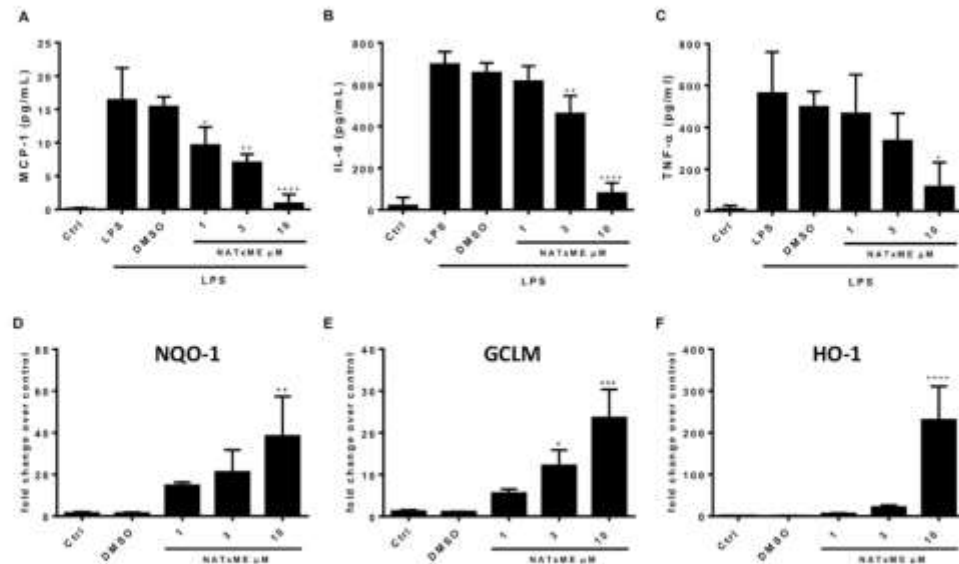
The reaction is first order in nitroalkene (Fig. 2B) and first order in thiol with a nonzero intercept (Fig. 2C), implying a reversible Michael addition reaction, as expected<sup>26</sup>. The expected trend of the apparent second-order rate constants in neutral aqueous solution is higher for GSH than for  $\beta$ ME, given that GSH is more acidic than  $\beta$ ME and therefore a higher fraction of the more reactive thiolate is available. That trend is observed in the absence of surfactants with NATxME and NATx0 (Table 1) and also with cationic CTAB micelles with NATOH. Nevertheless, the trend is mostly absent in zwitterionic CHAPS micelles and reversed in neutral (Triton X-100) and anionic (SDS) micelles (Table 1).

In both NATOH and NATxME, the chromophore contains an ionizable phenol, thus the acid-base equilibrium of the phenol also conveys a large change in absorbance (Fig. 2D). The titration of both nitroalkenes with NaOH allows the determination of their apparent  $pK_a$  in the same micellar systems and thus, reflects the bulk pH as perceived in the micelle interior. The  $pK_a$  values for NATOH span a range of 3.8 units with the expected trend of most acidic in cationic CTAB micelles and least acidic in anionic SDS (Fig. 2E). The trend is similar for NATxME but within a narrower range of nearly 2.4 units (Fig. 2E,F). The  $pK_a$  of NATxME was determined both in micellar suspension and in aqueous solution in an attempt to separate the effect of apparent pH from the effects of partitioning of the nucleophiles and on the reaction rate itself. We observed (Fig. 2F and Figure S2) that the  $pK_a$  of NATxME in aqueous solution and in zwitterionic CHAPS micelles are essentially equal and very similar to the  $pK_a$  of NATOH in CHAPS micelles (8.14, 8.18 and 8.0, respectively). Then, and as a first approximation, CHAPS micelles cancel out the effect of surface pH as perceived by the nitroalkene.

Comparing the reaction of  $\beta$ ME with NATOH in CHAPS and with NATxME in aqueous solution, we found a four-fold decrease in the rate constant at pH 7.1. If this comparison is made for the corresponding reactions with GSH, the rate constant is more than ten-fold lower in the CHAPS micelles. The difference may be explained in terms of the extra charges in GSH that further destabilize its presence in the hydrophobic core of the micelles. Furthermore, neutral and anionic micelles provoke a further decrease of two to three orders of magnitude in the rate constant for thiol reaction with NATOH and NATxME, and in all cases, the decrease is most marked for GSH (Table 1).

**Anti-inflammatory properties of NATxME *in vitro* and *in vivo*.** Since NATxME was shown to be the most electrophilic compound in all our experimental setups (see Table 1) and it is also water soluble in all concentrations used (important property for the *in vivo* model used herein, see below), we decided to initially study the biological properties of this compound, leaving the others for future works.

**NATxME effects in macrophages.** Since our main goal is to target the prevention and treatment of inflammation related diseases, we focused first on two of the main inflammatory signaling pathways known to be modulated by nitro-fatty acids: NF- $\kappa$ B-dependent expression of pro-inflammatory cytokines and Nrf2-Keap1 regulated gene expression<sup>27</sup>. We analyzed NATxME effects in macrophages (RAW 264.7 cells), since they are key players in



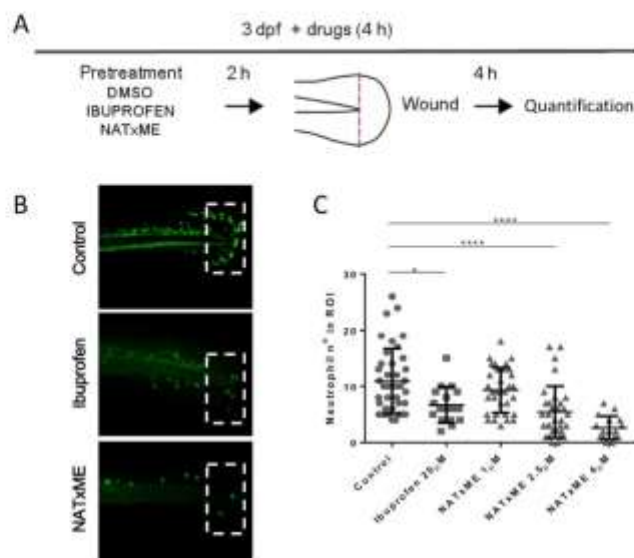
**Figure 3.** NATxME anti-inflammatory and cytoprotective effects. NATxME inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines (A–C). RAW 264.7 macrophages were treated with NATxME 1, 3 and 10  $\mu$ M for 2 h and then stimulated with LPS (50 ng/ml) for 18 h. The secretion of inflammatory cytokines MCP-1 (A), IL-6 (B) and TNF- $\alpha$  (C) was analyzed by ELISA in the supernatant. Values are shown as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis: one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparison test. (A) \* = 0.0294; \*\* = 0.0017; \*\*\*\* = 0.0001. (B) \*\* = 0.013; \*\*\*\* = 0.0001. (C) \* = 0.0131. vs. LPS. NATxME induces the Nrf2-Keap-1 system (D–F). Raw 264.7 macrophages were treated with NATxME 1, 3 and 10  $\mu$ M for 5 h. The expression of NQO1 (D), GCLM (E) and HO-1 (F) were analyzed by quantitative RT-PCR. Values are shown as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis: one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparison test. (D) \*\* = 0.0038. (E) \* = 0.0310; \*\*\* = 0.0001. (F) \*\*\* = 0.0001. vs control.

inflammatory responses and disease pathogenesis<sup>4</sup>, and chose NATxME as a starting molecule for characterization, given its electrophilic and hydrophilic properties.

We started evaluating the doses at which NATxME should be used in culture, measuring the cytotoxicity of NATxME in RAW 264.7 macrophages, and found that the IC<sub>50</sub> was 25  $\mu$ M (Figure S3). Then, to determine if NATxME modulates the NF- $\kappa$ B signaling cascade, we incubated RAW 264.7 macrophages with NATxME (1, 3 and 10  $\mu$ M; Fig. 3) for 2 h before cells were stimulated with lipopolysaccharides (LPS) and we compared these results to the vehicle control (DMSO). Cell supernatant was then analyzed by ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) for NF- $\kappa$ B-dependent cytokine secretion (Fig. 3A–C). We observed a marked inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) secretion. These effects were dose-dependent, reaching ~80% inhibition at 10  $\mu$ M NATxME.

Similarly, we used the same NATxME doses for analyzing Nrf2-Keap1 regulated gene expression. In this case, the expression of phase 2 detoxification genes were measured by qRT-PCR. Remarkably, all three transcripts: NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO-1), glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) and heme oxygenase-1 (HO-1) were significantly up-regulated by NATxME in a dose-dependent manner (Fig. 3D–F).

**NATxME inhibits neutrophil recruitment in zebrafish *in vivo*.** We then tested the anti-inflammatory effects of NATxME *in vivo*, using transgenic zebrafish larvae (Tg:mpx:GFP) in which neutrophils express Green Fluorescent Protein (GFP). This is a widely validated experimental setup in which the inflammatory response can be followed *in vivo* by directly measuring neutrophil recruitment in response to a localized mechanical injury<sup>36</sup>. Figure 4A shows a diagram of these experiments, in which Tg:mpx:GFP larvae at 3 days post-fertilization (3 dpf) were incubated for 2 h with DMSO (vehicle), ibuprofen (positive control)<sup>37</sup> or NATxME. Then, their caudal fins were wounded by transection with a scalpel and incubated again for 4 h. At this time, we counted the number of neutrophils recruited to the site of injury, as it is when they reach the maximum<sup>36</sup>. As expected, control (DMSO) larvae displayed the typical neutrophil recruitment (mean = 10.9, n = 40) and the anti-inflammatory ibuprofen (20  $\mu$ M) significantly reduced this number (mean = 6; n = 17; p = 0.0164). Remarkably, NATxME also significantly reduced the number of neutrophils recruited, even at lower concentrations (2.5  $\mu$ M; mean = 5.4; n = 32, p = 0.0001; Fig. 4C). This effect was dose dependent and at 4  $\mu$ M, NATxME showed a more pronounced decrease in neutrophil number (mean = 2; n = 16, p = 0.0001; Fig. 4C).



**Figure 4.** NATxME inhibits neutrophil recruitment in zebrafish. (A) Diagram of acute inflammation assay. At 3 dpf zebrafish larvae were pre-treated for 2 h with DMSO, ibuprofen or NATxME. Wounding was performed in tail fins by transection with a scalpel, and larvae were incubated again in the presence of drugs. Neutrophils at the site of injury were imaged and counted 4 h post transection. (B) Representative pictures used for quantification, corresponding to DMSO, 20  $\mu$ M ibuprofen and 4  $\mu$ M NATxME. Dotted rectangles indicate the wounded region of interest (ROI) where neutrophils were counted. (C) Quantification of neutrophil recruitment to wounded fins at 4 h under different treatments. Larvae number were: DMSO<sup>10</sup>, 20  $\mu$ M ibuprofen<sup>17</sup>, 1  $\mu$ M NATxME<sup>15</sup>, 2.5  $\mu$ M NATxME<sup>15</sup>, 4  $\mu$ M NATxME<sup>17</sup>. Statistical analysis: one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparison test, \* = 0.0164; \*\*\*\* < 0.0001.

## Discussion

The aim of the present work was to develop novel nitroalkene analogues of  $\alpha$ -tocopherol designed for the prevention and treatment of inflammation related diseases. These hybrid compounds were synthesized by incorporating a nitroalkenyl moiety, with recognized anti-inflammatory properties, to well-known nutraceuticals:  $\alpha$ -tocopherol or trolox, (Fig. 1). By using this strategy, we synthesized two kinds of nitroalkene derivatives, one hydrophobic, designed to be incorporated into lipoproteins (NATOH, Fig. 1A) and two water soluble (NATxME, Fig. 1A; and NATx0, Fig. 1B). In fact, due to structural differences, these compounds exhibited different electrophilic behavior as discussed below.

Our kinetic studies showed that the addition reaction between nitroalkenes and thiols, differ significantly when the reaction is carried out in a microheterogeneous system such as micellar dispersion (Fig. 2 and Table 1)<sup>16</sup>. The expected trend of the reactivity in aqueous solution is that GSH should be faster than  $\beta$ ME at neutral pH, given that the thiol of GSH is a stronger acid than that of  $\beta$ ME and therefore a higher fraction of thiolate is available (Table 1).

The effects of the micelles on the electrophilic reactions in general are complex and multifactorial, they have been studied through numerous experimental approaches for a long time<sup>20</sup>. In this work, we attempted to dissect the different effects taking advantage of the acid-base and optical properties of NATOH and NATxME, which share the same functional group and chromophore but differ in their water solubility. The micelle dispersion exerts at least three effects on the reaction rate. First, the pH at the surfactant-water interface is affected by the charge of the head groups. For instance, anionic SDS micelles attract  $H^+$  ions causing a drop in the interfacial pH relative to the bulk solution. Second, the transition state of the addition reaction has a negative charge that is also differentially stabilized by the charge of the micelle and, in all cases, destabilized by the lower dielectric constant of the hydrophobic interior. Therefore, the reaction is expected to be slower due to the hydrophobic medium and more so if the charge of the micelle is negative. Finally, the charge of the nucleophile affects its partition into the hydrophobic interior of the micelle. In this aspect, both GSH and  $\beta$ ME as thiolates are anionic nucleophiles, but GSH has the additional charges of the amino and the two carboxylate groups, making it much less stable in hydrophobic environments. The first two effects are shared by both thiols as the reactions are slowed down by the hydrophobic environment of the micelle and similarly affected by the surface pH of charged micelles (Table 1).

The differential partitioning of the thiolates favors  $\beta$ ME more than GSH. The narrow range of  $pK_a$  observed during the titration of NATxME in comparison with NATOH, may be due to the partitioning of the two nitroalkenes, which differ in their hydrophobicity (Fig. 2F). Thus, NATOH, which has a trimethyldecyl side chain

of tocopherol, is expected to partition almost quantitatively into the hydrophobic phase. On the other hand, NATxME is partially water-soluble thus the measured  $pK_a$  most likely reflects the mixture of NATxME molecules both inside and outside of micelles. The rate constant at pH 7.1 of the reactions of 3ME with NATxME in an aqueous solution was higher than that of NATOH in CHAPS micelles ( $349$  vs.  $83 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Table 1). This is probably due to the destabilization of both the thiolate nucleophile and the anionic transition state of the reaction. The same comparison for the reactions of GSH yields a more dramatic drop in rate constants ( $1370$  vs.  $100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Table 1) underscoring the relative importance of the charge of the nucleophile.

In the context of the biological activity of NATOH, its partition to hydrophobic compartments (such as membranes, lipoproteins or the fat storage area of adipocytes) will dictate a significant portion of its electrophilic reactivity. The surface of such compartments is composed of anionic, neutral and zwitterionic lipids that will significantly diminish the rate of reaction with charged thiols such as GSH, thus preventing its rapid excretion. On the other hand, a protein thiol able to interact with a lipid-water interface and, if both the attacking thiolate and the transition state of the addition reaction, are stabilized by the protein environment, the result would be a specific interaction able to yield biological effects even at low concentrations of the electrophile.

NATx0 showed relatively slower reactions with both  $\beta$ -ME and GSH ( $21$  and  $71 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively) compared to NATxME. The  $\beta$ -carbons of NATxME and NATOH resulted more electrophilic than those of NATx0 (Table 1). NATx0 is similar to nitro fatty acids, and the second order rate constants with GSH are consistently similar to those of nitro oleic acid ( $64 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pH 7.4,  $25^\circ\text{C}$ ) and nitro conjugated linoleic acid ( $34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pH 7.4,  $25^\circ\text{C}$ )<sup>26</sup>. Even though NATx0 is the slowest electrophile studied herein, its reaction with GAPDH is significantly faster than with GSH (Table 1, Figure S4) pointing to the importance of a protein active site containing an acidic thiol and cationic residues in the vicinity that could stabilize the anionic transition state.

To sum up the reactivity results, the effects of the hydrophobic partition and the charge at the lipid-water interface may protect electrophiles such as NATOH from addition to GSH and other unselective and water-soluble thiols. Conversely, a cysteine residue in a protein able to interact with a lipidic microenvironment, and with cationic residues that could stabilize the transition state of the addition, may represent a selectivity mechanism of an otherwise general electrophile.

Fatty acid nitroalkenes are pleiotropic modulators of anti-inflammatory and anti-oxidant cell signaling responses *in vitro* and *in vivo*<sup>28</sup>. We showed that the new compound NATxME displayed two of these important functions in a macrophage cell line, the RAW264.7, which is relevant because macrophages act as major players in inflammatory responses<sup>6</sup>. First, when the RAW264.7 cells were activated with LPS, NATxME inhibited the secretion of pro-inflammatory cytokines MCP-1, IL-6 and tumor TNF- $\alpha$ . This is a well characterized macrophage response mediated by NF- $\kappa$ B, critical for initiating inflammation responses<sup>17</sup>. Second, we showed that NATxME induced the transcription of three phase II enzymes regulated by the antioxidant-response element, regulated by Nrf2<sup>29</sup>. Because oxidative stress and inflammation are two intertwined processes, Nrf2-regulated genes are critical in mediating cell defense against oxidative stress by expressing antioxidant and detoxifying enzymes that limit inflammation and reactive species (RS)-induced damage<sup>18</sup>.

In addition to this, we went a step further and analyzed NATxME effects on a vertebrate model of acute sterile inflammation *in vivo*. Using transgenic zebrafish larvae that express GFP in neutrophils<sup>30</sup>, we were able to directly follow neutrophil recruitment to a specific injured site, *in vivo* and in real time. This model has been extensively characterized in the last ten years, demonstrating conservation of cellular and molecular mechanisms with mammalian inflammatory processes<sup>30,36,41</sup> and allowing discovery and testing of anti-inflammatory compounds<sup>42,43</sup>.

Remarkably, in this work we showed that NATxME greatly inhibited the recruitment of neutrophils to the injured tissue, further demonstrating its anti-inflammatory properties. The precise cellular and molecular mechanisms involved in this system *in vivo* remains to be determined and will be the focus of future work. Nonetheless, it is interesting to note that several studies in zebrafish have shown the requirement of NF- $\kappa$ B activation and interleukin secretion at the site of injury as a critical step regulating leucocyte recruitment<sup>44–46</sup>. Also, another nitro-fatty acid, nitrooleic acid (OA-NO<sub>2</sub>), has been shown to activate Nrf2 in a transgenic zebrafish that expresses green fluorescent protein (GFP) in response to Nrf2 activators<sup>47</sup>.

Thus, our findings highlight these tocopherol-nitroalkene analogues as lead compounds for the development of novel drugs for the prevention and treatment of inflammation related diseases. Moreover, our work set the foundations to modify a specific nitroalkene-based synthetic compound in order to improve its pharmacological properties to better tackle each specific inflammatory related disease.

## Experimental Section

**Chemistry.** Argon and nitrogen were purchased from Linde Uruguay (Montevideo, Uruguay). Other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (Milwaukee, WI) or Applichem (Germany) at the highest purity available. The tocopherol used along the study was always ( $\pm$ )- $\alpha$ -TOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Compound **1b** was synthesized according to literature methods<sup>27</sup>. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-400 instrument, with CDCl<sub>3</sub> as solvent and tetramethylsilane as the internal reference. Electron impact (EI) and electrospray (ES+) mass spectra were obtained at 70 eV on a Shimadzu GC-MS QP 1100 EX or on a Hewlett Packard 1100 MSD spectrometer, respectively. TLC was carried out on Alugram<sup>®</sup> Sil G/UV254 or Aluminum oxide on polyester plates. Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck, 60–230 mesh) or aluminum oxide (Merck, 70–230 mesh). All solvents were of anhydrous quality purchased from Aldrich Chemical Co. and used as received.

**5-(bromomethyl)-2,7,8-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl acetate (2a).** To a solution of ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol (**1a**, 1.38 g, 3.20 mmol) in dry n-hexane (25.0 mL) a solution of bromine (1.05 equiv) in n-hexane (10.0 mL) was added dropwise at room temperature. The mixture was stirred for 3 h. Solvent and remaining bromine were removed *in vacuo* at room temperature. In the same flask

was then carried out the acetylation reaction to bromomethyl derivative obtained as described above, were added  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (12.0 mL), AcOH (12.0 mL),  $\text{Ac}_2\text{O}$  (2.2 mL) and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.2 mL). The dark mixture was stirred overnight at room temperature. Then water was added and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  evaporated. The aqueous phase was extracted with hexane ( $3 \times 100$  mL). The combined organic extracts were subsequently washed to neutrality with water, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated to dryness. Purification by column chromatography (Hex:EtOAc, 10:1) afforded **2a** (1.24 g, 72% yield from **1a**) as yellow dense oil. Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>31,40,48</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.42 (bs, 2H), 2.80 (t,  $J$  6.6 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.91–1.77 (m, 2H), 1.59–1.07 (m, 24H), 0.90–0.86 (m, 12H).

**Methyl 6-acetoxy-5-bromomethyl-2,7,8-trimethylchroman-2-carboxylate (2b).** A round-bottom flask was charged with 1.58 g (6.00 mmol) of **1b**, 33.0 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The mixture was stirred at room temperature in the dark, and a solution of 0.3 mL (6.00 mmol) of bromine in 4.5 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added dropwise. Stirring continued at room temperature for 2 h after completion of the bromine addition; the resulting solution was dark, but no bromine color or vapor was detectable. The mixture was purged with a stream of nitrogen to remove most of the HBr present, then stripped to dryness under reduced pressure. The crude intermediate product was dissolved with 13 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and treated with 11.0 mL of glacial acetic acid, 3.0 mL of acetic anhydride, and 1 drop of concentrated sulfuric acid. After stirring overnight at room temperature, the mixture was treated with 60.0 mL of water and stirred for 1 h. The mixture was transferred to a separatory funnel and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl (brine), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and solvent evaporated under reduced pressure. The crude residue purified by column chromatography (Hex:Et<sub>2</sub>O, 7:3), affording **2b** (2.0 g, 87% yield) as white solid. Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>30</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.48–4.18 (bd, 2H), 3.69 (s, 3H); 2.88–2.81 (m, 1H), 2.68–2.59 (m, 1H), 2.49–2.42 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.93–1.86 (m, 1H), 1.62 (s, 3H).

**5-formyl-2,7,8-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl acetate (3a).** To a solution of **2a** (1.24 g, 2.25 mmol) in dry acetonitrile (20 mL), NMMO (*N*-methylmorpholine-*N*-oxide, 1.05 g, 9.00 mmol) was added. After stirring overnight at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue purified by column chromatography (Hex:EtOAc, 15:1), affording **3a** (1.01 g, 93%) as yellow dense oil. Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>31,40,48</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.29 (s, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.09 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>), 2.09–1.63 (m, 2H), 1.41–1.08 (m, 24H), 0.90–0.86 (m, 12H).

**Methyl 6-acetoxy-5-formyl-2,7,8-trimethylchroman carboxylate (3b).** A solution of 2.00 g (5.20 mmol) of bromoacetate **2b** in 17 mL of dry acetonitrile treated with 1.58 g (15.60 mmol, 3 equiv) of NMMO was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was concentrated to about 5 mL under reduced pressure. This concentrated solution was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with 5% HCl and with brine, dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and solvent evaporated under reduced pressure. The crude residue purified by column chromatography (Hex:Et<sub>2</sub>O, 9:1), affording **3b** (1.2 g, 71% yield) as orange oil that crystallized on stand. Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>30</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.22 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.29–3.22 (m, 1H), 2.92–2.83 (m, 1H), 2.46–2.40 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.88–1.80 (m, 1H), 1.64 (s, 3H).

**2,7,8-trimethyl-5-((E)-2-nitrovinyl)-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-6-ol (4a, NATOH).** Aldehyde **3a** (0.15 g, 0.30 mmol) was added in a mixture of 1.2 mL anhydrous  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  and equivalent amount of  $\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COO}$ . The mixture was stirred at 100 °C for 2 h. The solvent is then evaporated under reduced pressure and  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Et}_2\text{O}$  were added. The organic layer was washed with  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 50$  mL), 3 N HCl ( $2 \times 25$  mL), and saturated aqueous NaCl, dried, and the solvent was evaporated. The crude residue purified by column chromatography (Hex:EtOAc, 9:1), affording NATOH (0.04 g, 27%) as yellow dense oil.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.31 (d,  $J$  13.4 Hz, 2H), 8.14 (d,  $J$  13.4 Hz, 2H), 2.88 (t,  $J$  2.9 Hz, 2H), 2.21 (s, 6H), 1.92–1.80 (m, 2H), 1.63–1.07 (m, 24H), 0.90–0.85 (m, 12H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  148.1, 146.5, 139.8, 132.7, 131.3, 120.6, 119.4, 112.8, 74.9, 39.3 (2C), 36.8 (4C), 31.7 (2C), 30.6, 28.1, 23.8 (2C), 22.3 (2C), 20.7 (2C), 20.4, 19.2 (2C), 11.5 (2C). HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_4$  [ $M - \text{H}$ ]<sup>+</sup>: 486.3589, found 486.3587.

**Methyl (E)-6-hydroxy-2,7,8-trimethyl-5-(2-nitrovinyl)chroman-2-carboxylate (4b, NATxME).** Aldehyde **3b** (0.18 g, 0.56 mmol) was added in a mixture of 2.5 mL anhydrous  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  and an equivalent amount of  $\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COO}$ . The mixture was stirred at 100 °C for 2 h. The solvent was then evaporated under reduced pressure and  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Et}_2\text{O}$  were added. The organic layer was washed with  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 50$  mL), 3 N HCl ( $2 \times 25$  mL), and brine, dried, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by column chromatography (Hex:Et<sub>2</sub>O, 7:3), affording **4b** (NATxME, 0.032 g, 18%) as a yellow dense oil.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.21 (d,  $J$  12.0 Hz, 2H), 8.09 (d,  $J$  12.0 Hz, 2H), 2.97–2.89 (s, 1H), 2.79–2.71 (s, 1H), 2.54–2.49 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.98–1.89 (m, 1H), 1.66 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.7, 149.3, 146.2, 139.5, 133.9, 132.1, 131.3, 121.2, 118.9, 113.1, 77.8, 52.6, 30.2, 20.5, 13.0, 11.9. HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}_6$  [ $M - \text{H}$ ]<sup>+</sup>: 320.1140, found 320.1137.

**Methyl 6-((tert-butoxycarbonyloxy)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylate (5).** To methyl ester **1b**<sup>37</sup> (1.50 g, 5.70 mmol) solution in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under  $\text{N}_2$  flux, di-*tert*-butyl dicarbonate (1.1 g, 5.11 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (0.07 g, 0.57 mmol), were added. After 2 hours of agitation at room temperature, the reaction was stopped, the solvent was evaporated, EtOAc was added (20 mL) and then washed with HCl 10% (50 mL) and saturated  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL). The resulting organic layers were dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,

filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography in  $\text{SiO}_2$  and Hex:EtOAc (7:3) as mobile phase rendered the desired product as a white solid (1.30 g, 65%). Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>17</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.70 (s, 3H), 2.69 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.88 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.57 (s, 9H).

**6-((tert-butoxycarbonyloxy)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-methanol (6).** To a suspension of  $\text{LiAlH}_4$  (0.07 g, 1.80 mmol) in dry THF (2 mL) cooled to 0 °C in a water-salt bath under nitrogen atmosphere, **5** (0.60 g, 1.65 mmol) dissolved in 4.0 mL of dry THF was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 45 min and poured into a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (6 mL) and extracted with EtOAc (3  $\times$  10 mL). The combined organic layers were washed with water (1  $\times$  10 mL), brine (1  $\times$  10 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure, to give a white solid (0.53 g, 99%). No further purification was required. Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>17</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.70 (m, 2H, 4H), 2.70 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.00 (m, 1H), 1.91 (t, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.58 (s, 9H), 1.25 (s, 3H).

**6-((tert-butoxycarbonyloxy)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbaldehyde (7).** To a solution of **6** (0.50 g, 1.50 mmol) in acetone, TEMPO (0.05 g, 0.32 mmol) and (diacetoxyiodo)benzene (0.65 g, 2.00 mmol) was added. After 20 h of stirring at room temperature the reaction mixture was poured into water (10 mL) and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (4  $\times$  10 mL). The organic layers were dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The liquid residue was purified by column chromatography (Hex:EtOAc, 95:5) to afford a white solid (0.30 g, 60%). Analytical data are consistent with those given in the literature<sup>17</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.65 (s, 1H), 2.67 (m, 2H), 2.31 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.87 (m, 1H), 1.58 (s, 9H), 1.42 (s, 3H).

**6-((tert-butoxycarbonyloxy)-2-(1-hydroxy-2-nitroethyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman (8).** To a solution of imidazole (0.09 g, 1.30 mmol) in  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  (3.5 mL, 65.00 mmol), **7** (0.22 g, 0.65 mmol) was added. After 2 days of stirring at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was poured into brine and extracted with EtOAc. The organic layers were dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The liquid residue was purified by column chromatography (Hex:EtOAc, 8:2) to afford a white solid (0.15 g, 60%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.81 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 2.84 (d,  $J$  4.0 Hz, 1H), 2.74 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.26 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  77.1, 73.2, 28.2, 27.5, 19.5, 18.8, 12.8. MS (EI, 70 eV):  $m/z$ (%) 395( $M^+$ , 3), 334(4), 295(38), 234(37), 205(100), 189(5), 177(4).

**2-(1-acetoxy-2-nitroethyl)-6-((tert-butoxycarbonyloxy)-2,5,7,8-tetramethylchroman (9).** A solution of **8** (0.04 g, 0.09 mmol) in acetic anhydride (0.28 mL, 2.90 mmol) and a catalytic amount of *p*-toluenesulphonic acid, was kept in agitation for 16 h under  $\text{N}_2$  flow. Then, water (10 mL) was added and agitation continued for 10 more minutes to remove the excess acetic anhydride as acetic acid. The product was extracted with diethyl ether (4 mL) and the organic layer was washed with water (3  $\times$  5 mL). The organic layer was dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain a white solid (0.04 g, 93%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.85 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.74 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.90 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.29 (s, 3H).

**6-((tert-butoxycarbonyloxy)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(E)-2-nitrovinyl]chroman (10).** To a solution of **9** (0.04 g, 0.09 mmol) in dry toluene, sodium carbonate was added (0.03 g, 0.09 mol) and the mixture was heated at 110 °C for 2 h. After the reaction mixture reached room temperature, it was poured into brine (10 mL) and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (3  $\times$  5 mL) to obtain a yellow solid (0.03 g, 94%) with no further purification.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.28 (d,  $J$  12.0 Hz, 1H), 7.02 (d,  $J$  12.0 Hz, 1H), 2.76 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.28 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  152.1, 147.9, 144.6, 141.8, 139.6, 127.9, 125.6, 122.8, 116.7, 82.9, 74.1, 31.4, 30.3, 29.7, 27.7, 25.9, 20.5, 12.7, 11.9 (2C). MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 377 ( $M^+$ , 6), 277 (100), 164 (55).

**6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(E)-2-nitrovinyl]chroman (11, NATX0).** To a solution of **10** (0.03 g, 0.08 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TFA (0.14 mL, 1.75 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. Then, the reaction mixture was washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL) and brine (5 mL). The organic layer was dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The liquid residue was purified by column chromatography (Hex:EtOAc, 8:2) to afford a yellow solid (0.02 g, 92%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.28 (d,  $J$  13.2 Hz, 1H), 6.99 (d,  $J$  13.2 Hz, 1H), 4.31 (s, 1H), 2.77 (m, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.53 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  145.5, 144.8, 144.2, 139.6, 122.3, 121.7, 118.6, 116.6, 73.7, 31.8, 26.0, 20.8, 12.2, 11.8, 11.3. HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$  [ $M$ ]<sup>+</sup> 277.1314, found 277.1321.

**Buffer systems and micelles.** The buffers of fixed ionic strength<sup>41</sup> used for the equilibrium and kinetic measurements consisted of 20 mM Tris, 10 mM Mes and 10 mM acetic acid with 130 mM NaCl to take the ionic strength to 0.15 M and 100  $\mu\text{M}$  dtpa (TMA20 buffer). Micelles of different charge were used to solubilize NATOH and NATXME, the surfactants used were sodium dodecyl sulfate (SDS), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), hexa-decyltrimethylammonium bromide (CTAB) and 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton X-100). Surfactant concentrations were chosen so the concentration of micelles was actually higher than that of the nitroalkene allowing the assumption of one nitroalkene molecule per micelle. The concentrations used were 25 g/L SDS (140  $\mu\text{M}$ ), 10 g/L CHAPS (1.63 mM),



8 g/L Triton X-100 (101  $\mu$ M), 10 g/L CTAB (450  $\mu$ M), the numbers in parentheses are the micelle concentrations considering the aggregation number in each case.

**Kinetics.** The reaction between the nitroalkenes and the thiols  $\beta$ ME and GSH was followed through the change in UV absorption of the nitroalkene, at 350 nm for NATOH and NATxME or 260 nm for NATxO. The fastest reactions were monitored in a SX20 stopped-flow spectrometer (Applied Photophysics); intermediate reactions ( $t > 10$  s) were followed in a Varian Cary50 spectrophotometer (Agilent) using a RX2000 rapid mixing stopped-flow unit (Applied Photophysics); and the slowest reactions ( $t > 600$  s) were studied using a Varioskan Flash plate reader (Thermo). The reactions were performed in TMA20 buffer at the specified pH and 25 °C. The time courses were fitted to a single exponential function (equation 1) and the resulting rate constants ( $k_{obs}$ ) were plotted vs the thiol concentration to obtain the rate constants of addition ( $k_i$ ) and elimination ( $k_e$ ).

$$Abs = Amp \times \exp(-k_{obs}t) + C \quad (1)$$

**pK<sub>a</sub> determination.** NATOH and NATxME in TMA20 buffer at room temperature were titrated spectrophotometrically by adding 5–10  $\mu$ L of 2 M NaOH to a micellar or aqueous solution of the nitroalkene (30  $\mu$ M). After each addition the pH and UV-Vis spectrum were recorded. If necessary, the initial pH was adjusted with a small volume of 2 M HCl. The absorbance readings at selected wavelengths were plotted as a function of pH and fitted to a single pK<sub>a</sub> function (equation 2)

$$Abs = A \frac{[H^+] + K_a}{[H^+]} + B \frac{[H^+] + K_a}{K_a} \quad (2)$$

where A and B are the absorbance of the acidic and basic forms of the nitroalkene.

**Cell culture.** Murine RAW264.7 macrophages were obtained from American Type Culture Collection (ATCC® TIB-71™, Manassas, VA), maintained in complete media (DMEM containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. RAW264.7 cells were seeded the night before treatment. The next day, solutions in complete media were prepared and treated for the corresponding time points. The control group only had the media replaced at the time of treatment.

**Cell viability.** Cell viability was performed by the MTT assay. Raw 264.7 macrophages were incubated with different concentrations of NATxME (3–50  $\mu$ M) for 24 h. Afterwards, cell viability was assessed by measuring the mitochondrial-dependent reduction of MTT to formazan. For that purpose, MTT was added to cells to a final concentration of 0.5 mg/mL and cells were incubated at 37 °C for 1 h. After removing the media, formazan crystals were dissolved in isopropanol, and the absorbance at 570 nm was read using a microplate spectrophotometer. Results are expressed as IC<sub>50</sub> (compound concentration that reduced 50% control absorbance at 570 nm). Every IC<sub>50</sub> is the average of at least four determinations. (Figure S3)

**Analysis of the pro-inflammatory cytokines.** RAW 264.7 cells were grown in 10% FBS/DMEM (Gibco) and then treated for 2 h with NATxME (1, 3 and 10  $\mu$ M). After that, cells were stimulated with LPS (50 ng/mL) overnight. MCP-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured in the supernatant with a commercially available ELISA kit (BD OptEIA).

**Quantitative real-time PCR.** RAW264.7 cells were grown 10% FBS/DMEM (Gibco) and then treated for 5 h with NATxME (1, 3 and 10  $\mu$ M). Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was reverse-transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (BioRad, Hercules, CA, USA) as previously described<sup>19</sup>. Gene expression was determined by quantitative real-time (RT)-PCR (qPCR) using TaqMan gene expression assays for heme oxygenase-1 (HMOX-1 Mm00516005\_m1), GCLM (GCLM Mm00514996\_m1) and NQO-1 (NQO1 Mm01253561\_m1) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and normalized to GAPDH using the comparative Ct method.

**Zebrafish husbandry and inflammation assay.** Zebrafish were raised and maintained according to standard protocols<sup>20</sup>. All experimental procedures with zebrafish were approved by the ethical committee at the Institut Pasteur de Montevideo. The neutrophil-specific zebrafish line Tg (mpx:GFP)<sup>i114</sup>, referred to as Tg(mpx:GFP), was used for all inflammation assays, and neutrophil tracking assays at 3 dpf as previously described<sup>20</sup>. In all inflammation assays, larvae were preincubated for 2 h with compounds at the doses indicated in each figure. Tail fins were transected with a sterile scalpel at the region indicated in Fig. 4A and larvae were incubated in the presence of compounds for 4 h, and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. To assess neutrophil number, whole mount immunohistochemistry was performed as described<sup>21</sup> using rabbit polyclonal anti-GFP (Invitrogen A-11122). Images were captured in an inverted fluorescence microscope (Olympus) at 10x magnification, and neutrophils in the region posterior to the circulatory loop were counted (Fig. 4B).

## References

1. Cardiovascular diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (2017).
2. Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K. & Flegal, K. M. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA* **311**, 806–814, <https://doi.org/10.1001/jama.2014.732> (2014).
3. Anders, H. J. & Muruve, D. A. The inflammasomes in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* **22**, 1007–1018, <https://doi.org/10.1681/ASN.2010080798> (2011).
4. Gao, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* **21**, 677–687, <https://doi.org/10.1038/nm.3893> (2015).

5. Hansson, G. K. Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy. *Circulation* **136**, 1875–1877, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030484> (2017).
6. Hansson, G. K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology* **12**, 204–212, <https://doi.org/10.1038/ni.2001> (2011).
7. Mayerl, C. *et al.* Atherosclerosis research from past to present—on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* **449**, 96–103, <https://doi.org/10.1007/s00428-006-0178-7> (2006).
8. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**, 278–286, <https://doi.org/10.1038/nature10759> (2012).
9. Wen, H., Ting, J. P. & O'Neill, L. A. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases—did Warburg miss inflammation? *Nature immunology* **13**, 352–357, <https://doi.org/10.1038/ni.2228> (2012).
10. Bonacci, G. *et al.* Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *The Journal of biological chemistry* **287**, 44071–44082, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401356> (2012).
11. Salvatore, S. R. *et al.* Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *Journal of lipid research* **54**, 1998–2009, <https://doi.org/10.1194/jlr.M037804> (2013).
12. Bathiany, C. *et al.* Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids *in vivo*. *The Journal of biological chemistry* **281**, 20450–20463, <https://doi.org/10.1074/jbc.M602814200> (2006).
13. 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. *The Journal of biological chemistry* **280**, 42464–42475, <https://doi.org/10.1074/jbc.M504212200> (2005).
14. Ferreira, A. M. *et al.* Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *The Biochemical journal* **417**, 223–234, <https://doi.org/10.1042/BJ20080701> (2009).
15. Groeger, A. L. *et al.* Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nature chemical biology* **6**, 433–441, <https://doi.org/10.1038/nchembio.367> (2010).
16. Schopfer, F. J. *et al.* Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free radical biology & medicine* **46**, 1250–1259, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.025> (2009).
17. Cui, Y. *et al.* Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *The Journal of biological chemistry* **281**, 35686–35698, <https://doi.org/10.1074/jbc.M603357200> (2006).
18. Cole, M. P. *et al.* Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circulation research* **105**, 965–972, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199075> (2009).
19. Khoo, N. K. *et al.* Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free radical biology & medicine* **48**, 230–239, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.046> (2010).
20. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**, 938–945, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201582> (2010).
21. Rudolph, V. *et al.* Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular research* **85**, 155–166, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp275> (2010).
22. Schopfer, F. J. *et al.* Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *The Journal of biological chemistry* **285**, 12321–12333, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091512> (2010).
23. Zhang, J. *et al.* Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circulation research* **107**, 540–548, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218404> (2010).
24. Rudolph, V. *et al.* Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *The Journal of biological chemistry* **284**, 1461–1473, <https://doi.org/10.1074/jbc.M802298200> (2009).
25. Baker, L. M. *et al.* Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *The Journal of biological chemistry* **282**, 31085–31093, <https://doi.org/10.1074/jbc.M704085200> (2007).
26. Turvill, L. *et al.* The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid. *J Biol Chem* **292**, 1145–1159, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756288> (2017).
27. Tanaka, K., Kyuuko, Y. & Hidaka, T. Process for producing chroman compound. JAPAN patent; WO/2005/073212 (2005).
28. Rosenau, T. & Habicher, W. D. Novel Tocopherol Compounds I. Bromination of alpha-tocopherol - reaction mechanism and synthetic applications. *Tetrahedron* **51**, 7919–7926, [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00421-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00421-4) (1995).
29. Rosenau, T. & Habicher, W. D. Novel Tocopherol Compounds VII.  $\gamma$ -Tocopherol-5-carboxylic Acid - a Novel Route to  $\gamma$ -Tocopherol. *Synlett* **1997**, 208–209, <https://doi.org/10.1055/s-1997-730> (1997).
30. Hyatt, J. A. Convenient Preparation of 2,7,8-Trimethyl-6-hydroxychroman-2-carboxylic Acid ( $\gamma$ -Trolox). *Synthetic Communications* **8–14**, <https://doi.org/10.1080/00397910701648728> (2008).
31. Mazzini, F., Mandoli, A., Salvadori, P., Netscher, T. & Rosenau, T. Approaches to the Preparation of 4-Benzoyloxy-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -D3)methylphenol, a Building Block for Labeled  $\delta$ -Tocopherol, and a New Synthesis of R,R,R-5-D3- $\alpha$ -Tocopherol. *Eur. J. Org. Chem.* **23**, 4864–4869, <https://doi.org/10.1002/ejoc.200400535> (2004).
32. Koufaki, M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of benzopyran analogues bearing class III antiarrhythmic pharmacophores. *Bioorganic & medicinal chemistry* **14**, 6666–6678, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.065> (2006).
33. Ingold, M. *et al.* A green multicomponent synthesis of tocopherol analogues with antiproliferative activities. *European journal of medicinal chemistry* **143**, 1888–1902, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.003> (2018).
34. Salamone, S. *et al.* Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *European journal of medicinal chemistry* **51**, 206–215, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.02.044> (2012).
35. Mathias, J. R. *et al.* Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Developmental and comparative immunology* **33**, 1212–1217, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.005> (2009).
36. Remshaw, S. A. *et al.* A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* **108**, 3976–3978, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024075> (2006).
37. Robertson, A. L. *et al.* A zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism. *Science translational medicine* **6**, 225ra229, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007672> (2014).
38. Schopfer, F. J. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *The Journal of biological chemistry* **280**, 19289–19297, <https://doi.org/10.1074/jbc.M414689200> (2005).
39. Buntun, C. A. In *Nucleophilicity Advances in Chemistry Series* (eds J. Milton Harris & Samuel P. McManus) Ch. 29, 425–442 (American Chemical Society, 1987).
40. Browne, E. C., Langford, S. J. & Abbott, B. M. Synthesis and effects of conjugated tocopherol analogues on peptide nucleic acid hybridisation. *Organic & biomolecular chemistry* **11**, 6744–6750, <https://doi.org/10.1039/c3ob41613e> (2013).
41. Ellis, K. J. & Morrison, J. E. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods in enzymology* **87**, 405–426, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)87025-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)87025-0) (1982).
42. Wang, X. *et al.* Inhibitors of neutrophil recruitment identified using transgenic zebrafish to screen a natural product library. *Disease models & mechanisms* **7**, 163–169, <https://doi.org/10.1242/dmm.012047> (2014).

43. Loynes, C. A. *et al.* Pisotol Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *Journal of leukocyte biology* **87**, 203–212, <https://doi.org/10.1189/jlb.0409255> (2010).
44. Hasegawa, T. *et al.* Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 $\beta$  is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. *at life* **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.22716> (2017).
45. Nguyen-Chi, M. *et al.* TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell death & disease* **8**, e2979, <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.374> (2017).
46. Ogryzko, N. V. *et al.* Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase-dependent amplification of the inflammatory response. *Disease models & mechanisms* **7**, 259–264, <https://doi.org/10.1242/dmm.013029> (2014).
47. Tsujita, T. *et al.* Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: a study using green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* **16**, 46–57, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01466.x> (2011).
48. Mazzini, E., Netscher, T. & Salvadori, P. Easy route to labeled and unlabeled R,R, $\gamma$ -tocopherol by aryl demethylation of  $\alpha$ -homologues. *Tetrahedron*, 813–817, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.11.047> (2005).
49. Bordessa, A. *et al.* Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: towards more active and less toxic compounds. *European journal of medicinal chemistry* **83**, 129–140, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.015> (2014).
50. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, R. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **203**, 253–310, <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302> (1995).
51. Kamaid, A. *et al.* Betaglycan knock-down causes embryonic angiogenesis defects in zebrafish. *Genesis*, <https://doi.org/10.1002/dvg.22876> (2015).

### Acknowledgements

We would like to acknowledge the Microscopy and the the Zebrafish Units of the Institut Pasteur de Montevideo for their technical support. We would also like to thank Alexandra Elbakyan for her contributions to this scientific work. Dr. Virginia López is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. This work was supported by CABBIO, CSIC (Universidad de la República), FOCEM, ANII, PEDECIBA, PROINBIO, INNOVA II Institutional Program, Institut Pasteur de Montevideo, JR-D, RD and GG and were granted with ANII fellowships.

### Author Contributions


J.R.D. performed all experiments and helped with manuscript writing; R.D. performed NATX0 synthesis and performed *in vitro* experiments; G.G., L.T. helped with *in vitro* experiments; A.K., supervised and performed zebrafish experiments and acquisition and processing of images and helped with manuscript corrections; G.V.L. was responsible for the synthesis of all molecules described; N.K., E.J.S. and B.A.F. participated in the development of nitroalkenes *in vitro* experiments and helped with manuscript corrections; C.E., C.B., G.F.S. and G.V.L. developed the idea, designed and supervised all experiments and wrote the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31218-7>.

**Competing Interests:** C.B., C.E., G.V.L. acknowledge financial interest in EOLO Pharma S.A.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## XII) Anexo II: Manuscrito Nro 2.

British Journal of Pharmacology



### **A novel nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in ApoE knockout mice**

Journal:	<i>British Journal of Pharmacology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rodriguez-Duarte, Jorge; Institut Pasteur de Montevideo Galliusi, Germán; Institut Pasteur de Montevideo, Laboratory of Vascular Biology & Drug Development Daputo, Rosina; Institut Pasteur de Montevideo, Laboratory of Vascular Biology & Drug Development Rossello, Jessica; Institut Pasteur de Montevideo Malacrida, Leonel; Institut Pasteur de Montevideo Kamaid, Andrés; Institut Pasteur de Montevideo Schopfer, Francisco; University of Pittsburgh, Department of Pharmacology and Chemical Biology Escande, Carlos; Institut Pasteur de Montevideo López, Gloria; Universidad de la Republica Uruguay Batthyany, Carlos; Institut Pasteur de Montevideo, Laboratory of Vascular Biology & Drug Development
Major area of pharmacology:	Atherosclerosis
Cross-cutting area:	Inflammation, Drug delivery
Additional area(s):	NF-kappa-B, Cytokines

SCHOLARONE™  
Manuscripts

British Pharmacological Society

**A novel nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in apoE knockout mice**

*Jorge Rodríguez-Duarte<sup>1,2</sup>, Germán Gallinssi<sup>1</sup>, Rosina Daputo<sup>1,2</sup>, Jessica Rossello<sup>2</sup>, Leonel Malacrida<sup>3,4</sup>, Andrés Kamaid<sup>5</sup>, Francisco J. Schopfer<sup>5</sup>, Carlos Escande<sup>6,\*</sup>, Gloria V. López<sup>1,2,\*</sup>, Carlos Batthyány<sup>1,3,\*</sup>*

*\* co-corresponding authors*

<sup>1</sup>Laboratory of Vascular Biology and Drug Development, INDICYO Program, Institut Pasteur de Montevideo; Mataojo 2020; CP 11400; Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República; Av. Gral. Flores 2124; CP 11800; Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo; Mataojo 2020; CP 11400; Montevideo, Uruguay

<sup>4</sup>Pathophysiology Department, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República; Av. Italia s/n; CP 11600; Montevideo, Uruguay

<sup>5</sup>Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, E1314 Biomedical Science Tower, 200 Lothrop Street, Pittsburgh, PA 15213 PA, USA;

<sup>6</sup>Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, INDICYO Program, Institut Pasteur de Montevideo; Mataojo 2020; CP 11400; Montevideo, Uruguay

**KEYWORDS.** Atherosclerosis, tocopherol, nitroalkene, anti-inflammatory, inflammation.

**Running head:** NATOH inhibits inflammation and atherosclerosis in mice

### Abstract

**Background and purpose:** Atherosclerosis, a progressive inflammatory disease of the arteries, is characterized by chronic low-grade inflammation with concomitant lipid accumulation in the arterial wall. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties have been described for a novel class of endogenous, nitrated fatty acids formed during inflammation and digestion/absorption processes. The prime, lipid-associated antioxidant  $\alpha$ -tocopherol is transported systemically by LDL particles. To capitalize on overlapping and complementary salutary properties of endogenous nitroalkenes and  $\alpha$ -tocopherol, we designed and synthesized a novel NitroAlkene- $\alpha$ -Tocopherol analog (NATOH) to address chronic inflammation and atherosclerosis.

**Experimental Approach:** We synthesized NATOH, determined its electrophilicity and antioxidant capacity and studied its effects over pro-inflammatory and cytoprotective pathways in macrophages *in vitro*. Moreover, we described its incorporation into lipoproteins and tissue both *in vitro* and *in vivo* and finally, we analyzed the effect of NATOH on atherosclerosis and inflammatory responses *in vivo* using the ApoE knockout mice model.

**Key results:** NATOH has similar antioxidant capacity than  $\alpha$ -tocopherol and, due to the presence of the nitroalkenyl group it exerts electrophilic reactivity as endogenous-nitroalkenes do. NATOH is incorporated *in vivo* into the VLDL/LDL lipoproteins particles reaching the atheroma lesions. Furthermore, oral administration of NATOH down-regulates NF- $\kappa$ B-dependent expression of pro-inflammatory markers (including IL-1 $\beta$  and adhesion molecules) and ameliorates atherosclerosis in ApoE knockout mice.

**Conclusions and implications:** *In toto*, data presented herein describe a novel pharmacological strategy for the prevention of atherosclerosis showing anti-inflammatory actions of NATOH and reveal significant potential for clinical application.

### Abbreviations

LDL, Low Density Lipoprotein; NATOH, NitroAlkene- $\alpha$ -Tocopherol; NF- $\kappa$ B, Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor alpha; IL-6, Interleukin-6; IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 beta; ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule 1; VCAM-1, Vascular cell adhesion protein 1; PPAR- $\gamma$ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma; Nrf2-Keap1, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2-Kelch-like ECH-associated protein 1;  $\alpha$ -TOH,  $\alpha$ -TOCOPHEROL; NMMO, *N*-Methylmorpholine *N*-Oxide; BME,  $\beta$ -Mercaptoethanol; SDS, sodium dodecyl sulfate; RP-HPLC, Reversed Phase- High Performance Liquid Chromatography; POPC, 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-PhosphatidylCholine; POPG, 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-PhosphatidylGlycerol; LPS, lipopolysaccharide; qPCR, quantitative Polymerase Chain Reaction; ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein 1; HO-1, Heme Oxygenase-1; GCLM, Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit; HFD, High Fat Diet; AAPH, 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride; FL, fluorescein;  $\delta$ , chemical shift; DAPI, 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride; SDS, Sodium dodecyl sulfate.

## Introduction

Atherosclerosis is a progressive, chronic inflammatory disease of the arterial wall and as such, a leading cause of death worldwide and the main cause of heart attack and stroke (Weber *et al.*, 2011; WHO, 2017).

Atherosclerosis affects conduit arteries with the atheroma plaque characterized by a focal accumulation of lipids in the intima layer of the artery wall. Lesions are formed by an adipose nucleus (cholesterol, cholesterol esters, their oxidation products and cellular debris), infiltration of leukocytes (macrophages, T cells, mast cells, others) and a fibrous cap formed by vascular smooth muscle cells (Gistera *et al.*, 2017; Libby *et al.*, 2011). Inflammation is a key event in the pathogenesis of atherosclerosis, an observation originally made more than a hundred years ago by Rudolf Virchow (Mayerl *et al.*, 2006). Inflammation in atherosclerosis involves the formation of modified low-density lipoproteins (LDL), synthesis and modulation of extracellular matrix components, switching of macrophage phenotypes, alterations of immune functions, cell death, generation of cytotoxic components, oxidative stress and induction of pro- and anti-inflammatory molecules (Gistera *et al.*, 2017). Oxidative stress implies the formation of reactive oxygen and nitrogen species that initiate lipid peroxidation chain reactions. These reactive intermediates may be the substrate for lipid nitration, reacting with  $\cdot\text{NO}$  or its derivatives (nitrite, nitrate, peroxynitrite and nitrogen dioxide) (Bonacci *et al.*, 2012; Esterbauer *et al.*, 1992; Heinecke, 1997). Nitrated unsaturated fatty acids are endogenous nitroalkenes that exert potent anti-inflammatory actions by reacting with different target proteins via a Michael addition to influence cell signaling mechanisms (Batthyany *et al.*, 2006; Bonacci *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2006; Vitturi *et al.*, 2015). Among them, activation of PPAR- $\gamma$  (Schopfer *et al.*, 2005), Nrf2-Keap1 (Kansanen *et al.*, 2011; Kansanen *et al.*, 2012), and the Heat Shock Response (Kansanen *et al.*, 2009) together with inhibition of NF- $\kappa$ B (Cui *et al.*, 2006; Villacorta *et al.*, 2013). Due to their potent signaling actions, electrophilic fatty acid nitroalkene derivatives have also been studied in different animal models to characterize their potential use as therapeutic drugs (Cole *et al.*, 2009; Rudolph *et al.*, 2010a; Rudolph *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2010).

At the atherosclerotic lesion site in conduit arteries there is an increased retention of LDL and other lipoproteins particles in the intima layer of the artery wall which is facilitated by alterations induced by the inflammatory response (endothelial dysfunction) and pro-atherogenic modifications of the LDL particle (Skalen *et al.*, 2002). The LDL particle contains several endogenous antioxidants



with  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOH), the most biologically active form of vitamin E, being the most abundant (Esterbauer *et al.*, 1992). Intestinal absorption, traffic through the blood compartment and cellular uptake of  $\alpha$ -TOH mimics the transport of other lipid molecules and is closely related to lipoprotein metabolism (Rigotti, 2007).

Considering the well-recognized pathogenic events in the generation of the atherosclerotic plaque (low grade inflammation coupled to LDL deposition and foam cell formation), we envisioned a novel pharmacologic strategy for the prevention and treatment of atherosclerosis. By adding an electrophilic nitroalkene group to  $\alpha$ -TOH, we developed the hybrid compound 5-nitroethenyl- $\gamma$ -tocopherol (NATOH). The rationale of our idea was that NATOH should be incorporated into lipoproteins during their normal metabolism due to the presence of the tocopherol-structure. Once incorporated, lipoproteins would transport NATOH through the body, including to the atherosclerotic lesions, where it may exert the anti-inflammatory properties of nitroalkenes *in situ*, thus cutting the vicious circle and ameliorating the progression of the disease.

Herein, we describe the synthesis of NATOH, its physicochemical properties and main biological actions both *in vitro* and *in vivo*. We show, for the first time, that NATOH inhibits the pro-inflammatory NF- $\kappa$ B signaling cascade, activates cytoprotective response (Nrf2-Keap1) and inhibits the development of atherosclerosis in Apo E knockout mice.

## Methods

### General procedure for the synthesis of nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue.

All solvents and chemicals were used as purchased without further purification. TLC was carried out on Alugram® Sil G/UV254 on polyester plates using ethyl acetate/n-hexane as solvent system. Spots were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck, 60–230 mesh).  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-400 instrument, with  $\text{CDCl}_3$  as solvent and tetramethylsilane as the internal reference. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) ( $\delta$  relative to residual solvent peak for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ). Electron impact (EI) mass spectra were obtained at 70 eV on a Shimadzu DI-2010. High-resolution mass spectrometry (HRMS) analysis was performed using an Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific). The purity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), in an Agilent 1200 HPLC system with a YMC C-30 column, 5  $\mu\text{m}$  of internal diameter, 250 x 4,6 mm. Purity of all final compounds was 95% or higher.

The tocopherol used along the study was always ( $\pm$ )- $\alpha$ -TOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Compounds **2** (Browne *et al.*, 2013) and **3** (Mazzini *et al.*, 2004) were synthesized according to

literature methods. All other materials were obtained from commercial suppliers and used as received. NATOH for physicochemical characterization and *in vitro* studies was synthesized in our lab. As described immediately below. For *in vivo* studies, NATOH was purchased from Siquimia (<https://www.siquimia.com/>). Quality controls were performed as before and the purity was 95% or higher.

**Synthesis of 5-nitroethenyl- $\gamma$ -tocopherol (4, NATOH).** NATOH was synthesized from aldehyde **3** as described in literature (Batthyány *et al.*, 2015). In brief, to a solution of **3** (0.150 g, 0.3 mmol) in  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  (1.2 mL),  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$  (0.024 g, 0.3 mmol) was added. The mixture was stirred at 100 °C until the reaction was finished (TLC). The solvent is then evaporated under reduce pressure and  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Et}_2\text{O}$  were added. The organic layer was washed twice with  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL), 3 N HCl (25 mL), and saturated aqueous NaCl, dried, and the solvent was evaporated under reduce pressure. The crude residue purified by column chromatography (Hexane: EtOAc 9:1), affording NATOH (0.037 g, 27%) as yellow dense oil.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.85-0.90 (m, 12H), 1.07-1.63 (m, 24H), 1.80-1.92 (m, 2H), 2.21 (s, 6H), 2.88 (t,  $J$  6.8 Hz, 2H), 5.25 (bs, 1H), 8.14(d,  $J$  13.4 Hz, 2H), 8.31(d,  $J$  13.4 Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.5 (2C), 19.2(2C), 20.4, 20.7(2C), 22.3 (2C), 23.8(2C), 28.1, 30.6, 31.7(2C), 36.8(4C), 39.3(2C), 74.9, 112.8, 119.4, 120.6, 131.3, 132.7, 139.8, 146.5, 148.1. MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 487 (M<sup>+</sup>, 1), 441 (53), 357 (55). HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_4$  [M-H]<sup>-</sup> 486.3589, found 486.3587.

#### **Analysis of the electrophilic and antioxidant properties of NATOH**

NATOH (100  $\mu\text{M}$ ) was dissolved in 1% SDS phosphate buffer 20mM, pH 7.4 and incubated with  $\beta$ -mercaptoethanol (BME) 1mM. The reaction was monitored by UV-Vis spectrophotometry through continuous absorbance readings (240-600 nm) every 3 min during the first 15 min of reaction using a Varian Cary 50 bio UV-VIS spectrophotometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA-USA). The reaction between NATOH (10 nmol) or  $\alpha$ -TOH (10 nmol) with BME (375 nmol) was also characterized by RP-HPLC at pH 7.4 or 2.0 using a YMC C30, 5 $\mu\text{M}$ , 250 x 4.6 mm I.D. column, isocratic method (methanol 100%) at 1.5 mL/min with detection at 295 and 350 nm in an Agilent 1200 HPLC.

The antioxidant capacity of NATOH vs.  $\alpha$ -TOH were measured by the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) fluorometric technique using a Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). All the assays were conducted in 10

mM phosphate buffer (pH = 7.4), and the final reaction mixture was 200  $\mu$ L. NATOH or  $\alpha$ -TOH solubilized in liposomes as described below (25  $\mu$ L) and FL (150  $\mu$ L of a 1  $\mu$ M FL solution) were placed in the wells (black 96-well plate). The mixture was preincubated for 30 min at 37 °C within the Varioskan LUX instrument. Then the oxidative reaction was triggered by dispensing 25  $\mu$ L of 50 mg/ml AAPH solution to the wells by an onboard dispenser of the Varioskan LUX. The fluorescence was recorded every 30 s for 90 min with excitation at 485 nm and emission at 518 nm. A blank (liposomes + FL + AAPH) using phosphate buffer instead of antioxidant were carried out in each assay. The samples were measured at different concentration (12.5-100  $\mu$ M). All the reaction mixture was prepared in duplicate, and at least three independent assays were performed for each sample. Antioxidant curves (fluorescence vs. time) were first normalized to the curve of the blank corresponding to the same assay. Signal curves of liposomes,  $\alpha$ -TOH and NATOH were compared (Figure 3).

#### **Analysis of biological properties of NATOH in macrophages**

All cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

For *in vitro* studies NATOH or  $\alpha$ -TOH were prepared in liposomes composed of a 7:3 mixture of POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) and POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine). The final concentration of the liposomes mixture in every *in vitro* experiment was 200  $\mu$ M.

THP-1 cells (ATCC TIB-202) were grown with 10% FBS/RPMI media and differentiated to macrophages with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 200nM for 48h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

Murine RAW264.7 macrophages (ATCC TIB-71) were maintained in complete media (DMEM containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. RAW264.7 cells were seeded the night before each treatment. The next day, solutions in complete media were prepared and treated for the corresponding time points. The control group only had the media replaced at the time of treatment.

For fluorescent microscopy studies, samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilized with PBS-BSA 2% -Triton 0.3% at room temperature for 1h. Labeling was performed overnight at 4° C using rabbit anti P65 antibody. Goat IgG anti rabbit coupled to tetramethylrodamine or Alexa 488 was used as secondary. Nucleus were stained using DAPI. Images were acquired using an Olympus IX81 epifluorescence microscope equipped with an

Orca-Hamamatsu CCD camera, a 60x NA 1.25 oil immersion objective and the following dichroic filters: Excitation 360-370nm/Emission 420-460nm for DAPI; Excitation 530-550nm/Emission 570nm for tetramethylrodamine; Excitation 470-495nm/Emission 510-550nm for Alexa 488. Images were processed using Image J 1.51h (Wayne Rasband, National Institutes of Health USA).

**Effect of NATOH over NF- $\kappa$ B-dependent gene expression and protein secretion.**

The effect of NATOH or  $\alpha$ -TOH over NF- $\kappa$ B-dependent gene expression were studied by qPCR using THP-1 cells. THP-1 cells were differentiated into macrophages and treated with NATOH (25 and 50  $\mu$ M) or  $\alpha$ -TOH (50 $\mu$ M) overnight. After treatment, cells were stimulated with LPS (100ng/mL, 4 h). Then, mRNA was extracted from the cells to quantify IL-6 and MCP-1-fold change gene expression over control ( $\beta$ -actin) by qPCR assay. Purified RNA was transcribed to cDNA using Superscript II Reverse Transcriptase with Oligo (dT). The cDNA for real-time PCR was obtained with a Piko 24 Thermal Cycler (Thermo Scientific). mRNA expression analysis was calculated using the ddCt method with  $\beta$ -Actin as the house keeping gene. SYBR Green was used as DNA binding dye and the QRT-PCR was done in an Eco Illumina thermocycler. Primers sequences for THP-1 cells: A. 5'3': **mActin fw**: CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC; **mActin rv**: CTC CTT AAT GTC ACC CAC GAT. ; **mIL-6 fw**: AGT GAG GAA CAA GCC AGA GC; **mIL-6 rv**: ATT TGT GGT TGG GTC AGG GG; **mMCP-1 fw**: CAT AGC AGC CAC CTT CAT TCC; **mMCP-1 rv**: TCT CCT TGG CCA CAA TGG TC.

The effect of NATOH or  $\alpha$ -TOH over NF- $\kappa$ B-dependent-IL-1 $\beta$  secretion by these cells was studied by ELISA (B&D OptEIA TM, San Diego, CA, USA). Differentiated THP-1 macrophages were pre-treated overnight with NATOH or  $\alpha$ -TOH in liposomes or unloaded-liposomes. Then, cells were stimulated with LPS (100 ng/mL, 3 h) and after with ATP (5 mM, 45 min). IL-1 $\beta$  was then measured by ELISA in the supernatant. Finally, the effect of NATOH or  $\alpha$ -TOH over NF- $\kappa$ B-dependent protein secretion (IL-6 and MCP-1) were studied by ELISA using Raw 264.7 murine macrophages cells. Raw 264.7 cells were treated with NATOH or  $\alpha$ -TOH solubilized in liposomes or with unloaded-liposomes for 8 hours, as before. Media was then removed and cells were stimulated overnight with LPS (50 ng/mL). Cell culture supernatant was collected and the presence of the proteins of interest (IL-6 and MCP-1) were measured by ELISA.

**Effect of NATOH over Nrf2-Keap1 gene expression.**

The effect of NATOH or  $\alpha$ -TOH over Nrf2-Keap1-dependent gene expression were studied by qPCR using THP-1 cells. THP-1 cells were differentiated into macrophages and then treated overnight with

NATOH or  $\alpha$ -TOH in liposomes or unloaded-liposomes. mRNA was extracted and the relative expression of HO-1 and GCLM were measured by qPCR as before. Primers sequences: **mHO-1 fw**: AAG ACT GCG TTC CTG CTC AA; **mHO-1 rv**: GGG GGC AGA ATC TTG CAC TT; **mGCLM fw**: AGA CGG GGA ACC TGC TGA A; **mGCLM rv**: TCA TGA AGC TCC TCG CTG TC.

#### **Incorporation of NATOH into human lipoproteins *ex vivo***

Blood from healthy donors (signed informed consent) was collected after overnight fasting in tubes containing sodium heparin and centrifuged at 2000g for 15 min at 4°C to obtain plasma. Human plasma (1 mL) was then incubated with NATOH 0, 25, 50, or 100  $\mu$ M during 6h at 37°C. Human LDL was isolated from fresh plasma as before by ultracentrifugation through a potassium bromide gradient (0.29 g/mL; 360.000 g for 60 min; Hitachi Sorvall Discovery M120 rotor S100 AT6) (Batthyany *et al.*, 2000). LDL lipoprotein fraction was isolated manually and extracted with methanol (9:1 v/v). The presence of NATOH and endogenous tocopherols in the lipoproteins was analyzed by RP-HPLC (mobile phases: A H<sub>2</sub>O, B Methanol (MeOH); gradient: 92 to 96 % of B in 10 min; column Hypersil Gold C-18, 3 $\mu$ M, 150 mm x 2.1 mm I.D.  $\delta$ -TOH was used as internal standard for quantitative purposes.

#### **Animals and Experimental Design**

All animal handling and procedures were approved by the Animal Care Committee (Protocol Number 014-14) of the Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. Animals were randomly assigned to each group and housed under specific pathogen free conditions. In order to assess the anti-atherogenic properties of NATOH, we used a widely accepted experimental mouse model to study atherosclerosis, the Apo E knockout mice model (Piedrahita *et al.*, 1992; Zadelaar *et al.*, 2007).

**Detection of NATOH and  $\alpha$ -TOH in the plasma and in lipoproteins from mice.** For the detection of NATOH and  $\alpha$ -TOH in the plasma of vehicle-,  $\alpha$ -TOH- or NATOH-treated mice by RP-HPLC, Apo E knockout mice fed with a HFD (42% of calories derived from fat and 0.25% cholesterol) without extra addition of vitamin E (LabDiet®, St. Louis, Missouri, USA), were administered gavage with vehicle (n = 5),  $\alpha$ -TOH (n=5) or NATOH (n = 5) for two weeks (200 mg/kg/day in sunflower oil). Mice were sacrificed, and 100  $\mu$ L of fasted plasma taken 12 hours post-last administration was extracted with methanol as before. The presence of NATOH and endogenous tocopherols were analyzed by RP-HPLC (YMC C30, 5 $\mu$ M, 250 x 4.6 mm I.D. column, isocratic method, 1.5 mL/min MeOH, detection at 295 nm and 350 nm; Agilent 1200 HPLC system) using  $\delta$ -TOH as an Internal Standard as before (Botti *et al.*, 2004; Teissier *et al.*, 1996).

The VLDL/LDL lipoprotein fraction was isolated by floatation from the same plasma (400  $\mu$ L) by adjusting plasma density to 1.06 g/mL with potassium bromide. Plasma was ultracentrifuge at 360.000 g for 4 hours (Hitachi Sorvall Discovery M120 rotor S100 AT6) (Batthyany *et al.*, 2000). The VLDL/LDL lipoprotein fraction was isolated manually from the top of the gradient (floatation band) and extracted with methanol (9:1 v/v). The bottom fraction was also extracted to analyze the presence of NATOH in the albumin/HDL fraction. The presence of NATOH and endogenous tocopherols in both fractions were analyzed by RP-HPLC as before (Botti *et al.*, 2004; Teissier *et al.*, 1996).

**Atherosclerosis *in vivo* Study.** Starting at 8 weeks of age, Apo E knockout mice (Jackson Laboratory) were fed for 14 weeks with a HFD (42% of calories derived from fat and 0.25% cholesterol), without extra addition of vitamin E (LabDiet®, St. Louis, Missouri, USA). Apo E knockout mice were treated with NATOH (n=12) or  $\alpha$ -TOH (n= 11) via gavage (100 mg/kg/day in sunflower oil; equivalent to 111 I.U./kg/day) from Monday to Friday for 14 weeks. Mice were then sacrificed, aorta isolated and dissected. Atherosclerotic lesions of whole aorta were detected by Oil Red O staining and Image J software as before (Escande *et al.*, 2015). Plaque quantization and area of plaque formation were performed double-blinded.

**Detection of NATOH at the aorta of treated animals.** To analyze the incorporation of NATOH into the aortas of treated animals, a different protocol was designed. In this particular set up, Apo E knockout mice (8 weeks old) were fed during 14 weeks with the same HFD as before. At week 12, animals (n = 4 per group) were randomized to receive orally either vehicle (100  $\mu$ L sunflower oil) or NATOH (200 mg/kg/day in sunflower oil). At the end of the experiment, mice were sacrificed and aortic arch or abdominal aortas from both groups were isolated, dissected and homogenized using a mortar. Homogenized tissue was further extracted overnight with chloroform (CHCl<sub>3</sub>). Liquid phase was dried under N<sub>2</sub> airflow and suspended in MeOH and the presence of NATOH was analyzed as previously.

**Analysis of pro-inflammatory cytokines at the aortas.** Apo E knockout mice (8 weeks of age) were treated with NATOH (n=5) or  $\alpha$ -TOH (n=5) via gavage 100mg/kg (in 100  $\mu$ L sunflower oil) from Monday to Friday for 14 weeks. Mice were then sacrificed and the aorta was isolated. RNA was extracted from aortas of Apo E knockout treated mice using TRIzol Reagent. For RNA extraction, the samples were first homogenized using a home-made mortar. Purified RNA was transcribed to cDNA using Superscript II Reverse Transcriptase with Oligo (dT). The cDNA for real-time PCR was

obtained with a Piko 24 Thermal Cycler (Thermo Scientific). mRNA expression analysis was calculated using the ddCt method with GAPDH as housekeeping gene. SYBR Green was used as DNA binding dye and the QRT-PCR was done in an Eco Illumina thermocycler. **Aortas primers sequences: 5'3': mGAPDH fw:** CTA CAG CAA CAG GGT GG; **mGAPDH rv:** TAT GGG GGT CTG GGA TGG; **mICAM-1 fw:** GTG ATG CTC AGG TAT CCA TCC A; **mICAM-1 rv:** CAC AGT TCT CAA AGC ACA GCG; **mVCAM-1 fw:** ATT TTC TGG GGC AGG AAG TT; **mVCAM-1 rv:** ACG TCA GAA CAA CCG AAT CC; **mIL-1 $\beta$  fw:** TGG GCC TCA AAG GAA AGA AT; **mIL-1 $\beta$  rv:** CAG GCT TGT GCT CTG CTT GT; **mMCP-1 fw:** TTA AAA ACC TGG ATC GGA ACC AA; **mMCP-1 rv:** GCA TTA GCT TCA GAT TTA CGG GT; **mTNF- $\alpha$  fw:** TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC; **mTNF- $\alpha$  rv:** CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A

### Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD or SEM. All the samples showed normal distributions as judged by the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test or unpaired Student t test, as appropriate. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All calculations were carried out using GraphPad Prism version 6.0.

### Materials

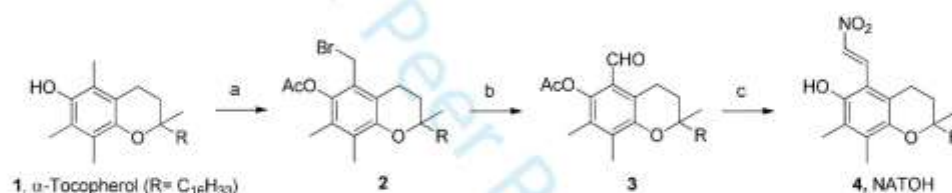
ATP;  $\beta$ -mercaptoethanol, BSA; 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride,  $\alpha$ -tocopherol,  $\delta$ -tocopherol, phorbol 12-myristate 13-acetate, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B purified by gel-filtration chromatography, 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride; potassium bromide, fluorescein and paraformaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); Sodium dodecyl sulfate was purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France); 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine were from Avanti, Polar Lipids (Alabama, USA); Methanol and Chloroform HPLC grade and Triton X-100 were from J.T. Baker (USA); phosphate buffer 20mM pH 7.4 from Merck (Germany); 10% FBS/RPMI media was obtained from Gibco. Goat IgG anti rabbit coupled to tetramethylrodamine, Superscript II Reverse Transcriptase DMEM containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and TRIzol Reagent were from Invitrogen (USA);

Alexa 488 was from Life Technologies (USA); Oligo (dT) from IDT (USA), SYBR Green from Roche (USA).

## Results

### Synthesis of NATOH from $\alpha$ -Tocopherol

NATOH was synthesized as before (Battyányi *et al.*, 2015). Briefly,  $\alpha$ -tocopherol is transformed into the corresponding bromoacetate derivative **2** by treatment with bromine followed by *O*-acetylation (Scheme 1) (Battyányi *et al.*, 2015). Bromoacetate oxidation with *N*-methylmorpholine *N*-oxide (NMMO) yields the corresponding aldehyde **3**. The treatment of this compound with nitromethane in the presence of ammonium acetate gives the product of interest **4** (NATOH), being the overall yield ~ 18%.

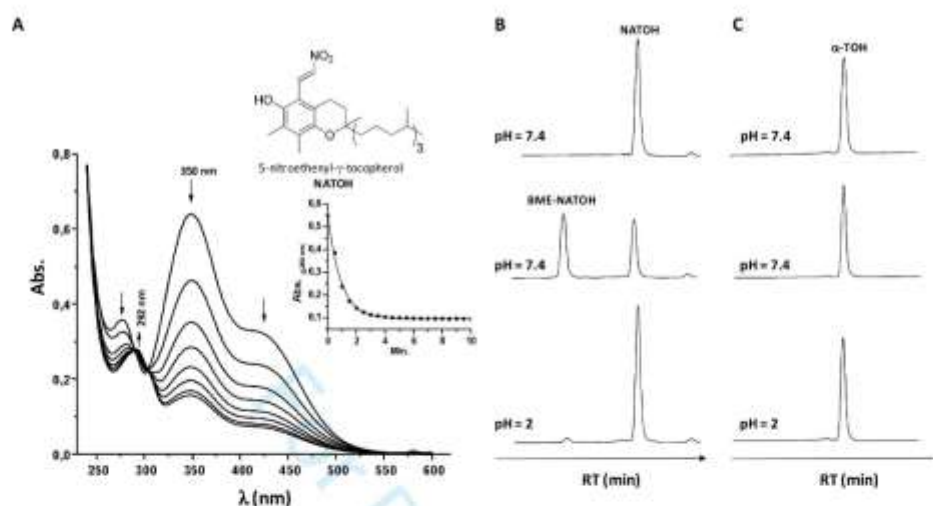


**Scheme 1.** Synthesis of NATOH. Reagents and conditions: (a) (i) Br<sub>2</sub>, hexane anh. rt; (ii) Ac<sub>2</sub>O, AcOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rt, 72%; b) NMMO, CH<sub>3</sub>CN, rt, 93%; c) CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, AcONH<sub>4</sub>, reflux, 27%.

### Electrophilic and antioxidant properties of NATOH

To study the electrophilic properties of NATOH, the reaction between  $\beta$ -mercaptoethanol (BME) and NATOH was first studied spectrophotometrically. NATOH (100  $\mu$ M) was solubilized in 1% SDS, phosphate buffer pH 7.4 and incubated with BME (1mM) (Figure 1). The consumption of NATOH was followed at its maximum (350 nm; Figure 1 and inset). The formed adduct by the reaction between BME and NATOH gave maximal absorbance at 292 nm (Figure 1). The reaction proceeded at pH 7.4 but was inhibited at pH 2.0 as shown by RP-HPLC analysis, as is the case for Michael addition reactions (Figure 1B). Alpha-tocopherol did not react with BME as analyzed by RP-HPLC (Figure 1C).

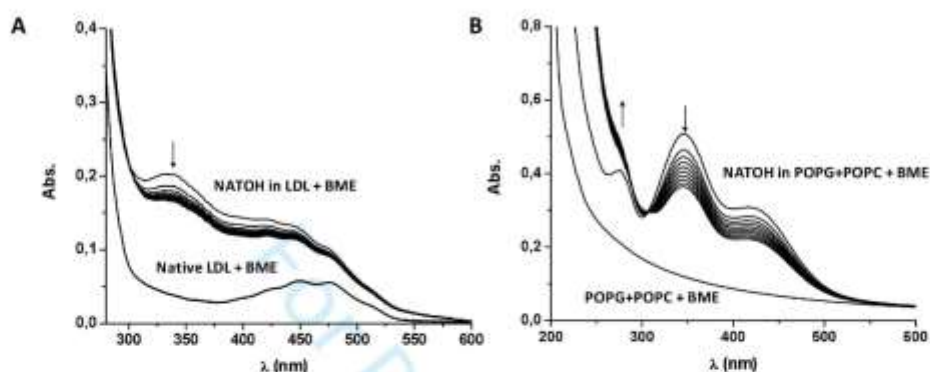




**Figure 1.** Electrophilic properties of NATOH. (A) NATOH (100  $\mu$ M) was dissolved in phosphate buffer (20mM) pH 7.4, 1% SDS and incubated with  $\beta$ -mercaptoethanol (BME, 1mM). Spectra of the reaction were obtained in the 220–660 nm range every 60 s. Scans shown were taken every 3 min. **Inset:** Exponential decay of the reaction followed at 350 nm. (B) RP-HPLC characterization of the reaction between NATOH (10 nmol) and BME (375 nmol) at pH 7.4 or 2.0 ( $\lambda = 295$  nm). (C) RP-HPLC characterization of the reaction between  $\alpha$ -TOH (10 nmol) and BME (375 nmol) at pH 7.4 or 2.0 ( $\lambda = 295$  nm).

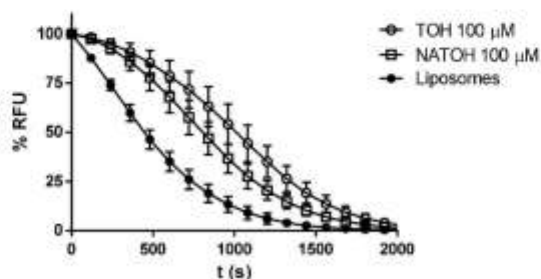
We next tested the capacity of NATOH to react as an electrophile when it is incorporated into human LDL or into liposomes (Figure 2A and Figure 2B). As such, human LDL was charged with NATOH *ex vivo* as described (see Experimental Section). In brief, human plasma was incubated with NATOH (100  $\mu$ M) for 6 h at 37  $^{\circ}$ C. Human LDL was then isolated by ultracentrifugation through a potassium bromide gradient and NATOH-charged human LDL was then incubated with BME and the reaction followed spectrophotometrically (Figure 2A). Native LDL incubated with BME did not demonstrate any alteration in its absorption spectrum (Figure 2A). Conversely, in the presence of BME, NATOH-charged human LDL spectral alterations, were compatible with the reaction of NATOH with BME (Figure 2A). Moreover, when NATOH was incorporated into liposomes, a reaction with BME was

also observed (Figure 2B). Overall, these results are of particular importance because they suggest that the nitroalkenyl group is able to react as an electrophile within the LDL or liposomes.



**Figure 2.** Electrophilic properties of NATOH in human LDL or in liposomes. (A) NATOH (100  $\mu$ M) was incorporated into human LDL (see protocol below) or (B) into POPG:POPC liposomes (200  $\mu$ M) and the reaction with BME was followed by UV-Vis spectrophotometry. Each spectrum was taken every 1 s for 15 min.

Since the antioxidant properties of  $\alpha$ -TOH are important for its reported anti-atherogenic properties (Meir *et al.*, 2004; Pratico *et al.*, 1998), we also assessed the potential for the nitroalkenyl group to affect the antioxidant capacity of NATOH. As shown in Figure 3, the antioxidant capacity of  $\alpha$ -TOH and NATOH was not significantly different.



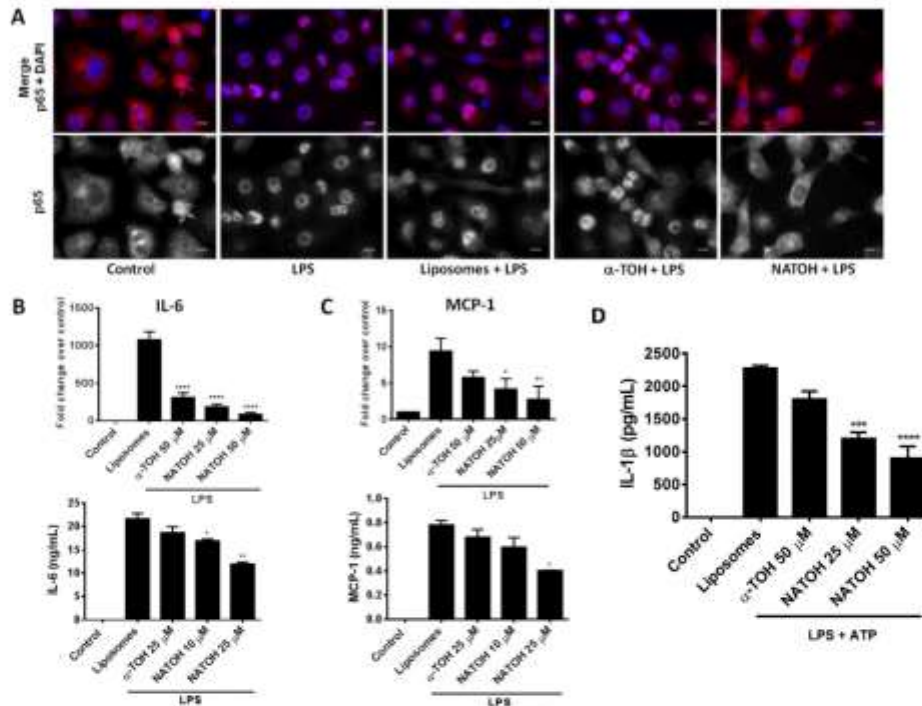
**Figure 3.**  $\alpha$ -TOH and NATOH (50  $\mu$ M) in liposomes (POPG+POPC, 200  $\mu$ M) were incubated with fluorescein (1  $\mu$ M) in phosphate buffer (20mM) pH 7.4, 1% SDS for 30 min at 37°C. Then the

mixture was incubated with the free radical generator, AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, 12 mg/mL) and the antioxidant capacity were measured by the ORAC technique with a fluorometric assay using  $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$  in a Thermo Scientific<sup>TM</sup> Varioskan LUX multimode microplate reader.

Combined, these results demonstrate that the addition of the nitroalkene functional group to the chromanol structure of  $\alpha$ -TOH, transforms the Vitamin E into an electrophilic molecule with full retention of the antioxidant capacity.

#### **NATOH inhibits NF- $\kappa$ B signaling in macrophages**

Macrophages are one of the most important immune cells involved in the pathogenesis of atherosclerosis (Gistera *et al.*, 2017). Therefore, we assessed NATOH for its potential to trigger cell signaling properties similar to those reported for endogenous-nitroalkenes in both human (THP-1) and murine macrophages (Cui *et al.*, 2006). First, the ability of NATOH to inhibit the pro-inflammatory NF- $\kappa$ B signaling cascade, reported to be activated in atherosclerosis, was evaluated (Cui *et al.*, 2006). THP-1 cells differentiated into macrophages were analyzed for LPS-induced translocation of the p65 subunit into the nucleus in the absence or presence of NATOH or  $\alpha$ -TOH (50  $\mu\text{M}$ ), both incorporated into liposomes (POPG + POPC 200  $\mu\text{M}$ ). As shown in Figure 4A, NATOH but not  $\alpha$ -TOH was able to inhibit nuclear translocation of the p65 subunit in response to LPS. Moreover, the expression of two NF- $\kappa$ B reporter genes was analyzed by qPCR and ELISA. As shown in Figure 4B and Figure 4C, NATOH inhibited both the expression and secretion of IL-6 and MCP-1, both in human and murine macrophages. Alpha-TOH and  $\gamma$ -TOH have been shown to exert anti-inflammatory effects, both *in vitro* and *in vivo* (Reiter *et al.*, 2007). In our study,  $\alpha$ -TOH inhibited only the transcription of IL-6 but did not change the protein level and did not affect MCP-1 gene expression (Fig 4C). Interestingly, NATOH also inhibited IL-1 $\beta$  secretion in LPS-stimulated human macrophages (He *et al.*, 2014). THP-1 macrophages treated overnight with NATOH (25 or 50  $\mu\text{M}$ ) or  $\alpha$ -TOH (50  $\mu\text{M}$ ) in liposomes, or empty liposomes, were stimulated with LPS (250 ng/mL) for 3 h and then with ATP (5 mM, 45 min) to study caspase-1 dependent IL-1 $\beta$  production (He *et al.*, 2014). Remarkably, NATOH but not  $\alpha$ -TOH partially inhibited the production of IL-1 $\beta$  in human macrophages in a dose dependent manner (Figure 4D).

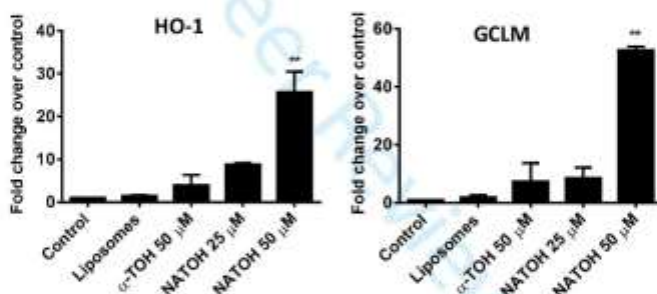


**Figure 4.** (A) Effects of NATOH on the subcellular localization of NF- $\kappa$ B/p65 subunit in THP-1 macrophages analyzed by immunofluorescence microscopy. Cells were treated with/without NATOH/ $\alpha$ -TOH (50  $\mu$ M) in liposomes overnight and then activated with LPS (1  $\mu$ g/mL). In the negative control (Control), cells were not treated with LPS. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B & C, Upper panels) NF- $\kappa$ B-dependent gene expression and protein translation in macrophages. THP-1 macrophages were treated with/without NATOH/ $\alpha$ -TOH in liposomes as before. Cells were then stimulated with LPS (100 ng/mL, 4 h) and IL-6 and MCP-1 were analyzed by qPCR. (B & C, Bottom panels) Raw 264.7 murine macrophages were treated with/without NATOH/ $\alpha$ -TOH in liposomes for 8 hours. Media was then removed and cells were stimulated overnight with LPS (50 ng/mL). Proteins of interest were measured by ELISA in the supernatant. Statistical Analysis: Upper panels: One way ANOVA Bonferroni  $^* = 0.0148$ ;  $^{**} = 0.0017$ ;  $^{****} < 0.0001$  vs. liposomes; bottom panels: One way ANOVA Bonferroni IL-6  $^* = 0.046$ ;  $^{**} = 0.0018$ ; MCP-1  $^* = 0.030$  vs. liposomes. (D) NATOH inhibits LPS-induced IL-1 $\beta$  secretion by THP-1. Differentiated macrophages were pre-

treated overnight with NATOH or  $\alpha$ -TOH as before. Then, cells were stimulated with LPS (100 ng/mL, 3 h) and after with ATP (5 mM, 45 min). IL-1 $\beta$  was then measured by ELISA in the supernatant. The values are showed as mean  $\pm$  S.E.M. [Statistical Analysis: one way ANOVA Bonferroni; \*\*\*\* < 0.0001 \*\*\* = 0.004 vs. liposomes].

#### NATOH induces Nrf2-Keap1 cytoprotective response in human differentiated macrophages.

The Nrf2-Keap1 pathway is a major regulator of cytoprotective responses to endogenous and exogenous stresses caused by reactive oxygen/nitrogen species and electrophiles (Kansanen *et al.*, 2012; Kansanen *et al.*, 2013). Thus, in order to determine if NATOH activates this pathway, THP-1 macrophages were treated overnight with the indicated doses of NATOH or  $\alpha$ -TOH, both incorporated into liposomes. After the treatment, the expression of two of the most important Nrf2 reporters were analyzed by qPCR. As shown in Figure 5, NATOH but not  $\alpha$ -TOH was able to induce HO-1 and GCLM mRNA in a dose dependent manner.

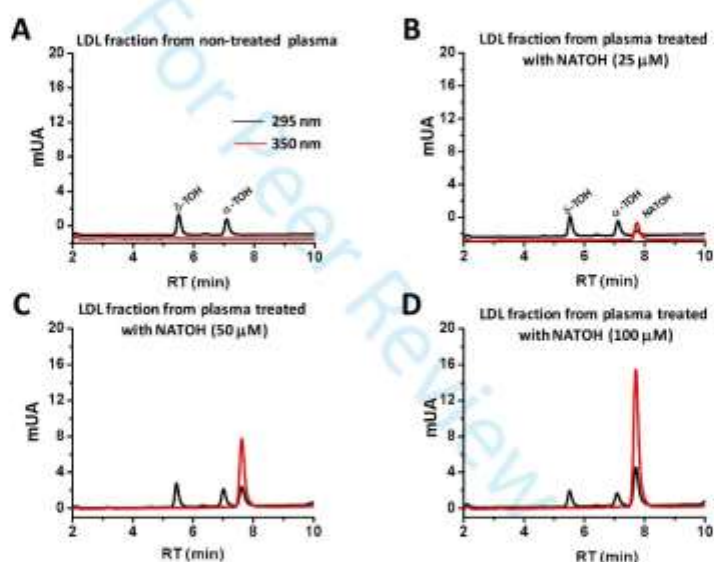


**Figure 5.** NATOH induces Nrf2-Keap1 cytoprotective response in human macrophages. THP-1 cells were differentiated into macrophages and then treated overnight with different doses of NATOH or  $\alpha$ -TOH in liposomes or unloaded-liposomes. mRNA was extracted and the relative expression of HO-1 and GCLM were measured by qPCR. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments. Statistical Analysis: one way ANOVA Bonferroni. HO-1 \*\* = 0.0076; GCLM \*\* = 0.0011 vs control.

#### *Ex vivo* incorporation of NATOH into human LDL

As a first approach to evaluate how the modification of the chromanol structure of NATOH by the addition of the nitroalkenyl group may affect its incorporation into the lipoproteins, we incubated

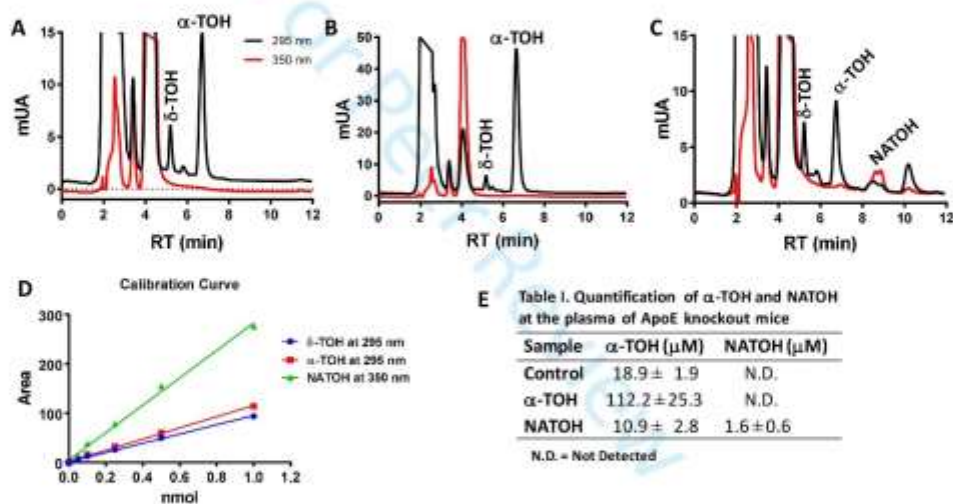
human plasma with different concentrations of NATOH for 6 hours at 37°C, following the protocol used to increase  $\alpha$ -TOH content of human LDL *ex vivo* (Teissier *et al.*, 1996). The LDL fraction was then purified by ultracentrifugation in KBr gradient (Batthyany *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 1986). Purified LDL was extracted with methanol and the presence of NATOH and endogenous  $\alpha$ -TOH were examined by RP-HPLC analysis as before (Figure 6) (Botti *et al.*, 2004; Teissier *et al.*, 1996). As shown in Figure 6 (A-D), NATOH was incorporated in a dose-dependent manner. When human plasma was incubated with 50  $\mu$ M of NATOH, LDL particles showed the same amount of NATOH as  $\alpha$ -TOH. At 100  $\mu$ M NATOH, the nitroalkene tocopherol analog content duplicated the amount of endogenous LDL- $\alpha$ -tocopherol (Figure 6, absorbance at 295 nm).



**Figure 6.** Incorporation of NATOH into human lipoproteins. Human plasma was treated with NATOH (25, 50, or 100  $\mu$ M; B-D) for 6h at 37°C and LDL lipoprotein fraction isolated and extracted with methanol (9:1, v:v). Control was performed with non-treated plasma (A). Samples were analyzed by RP-HPLC using  $\delta$ -TOH as internal standard. In all panels the black line indicates absorbance at 295 nm and red line absorbance at 350 nm.

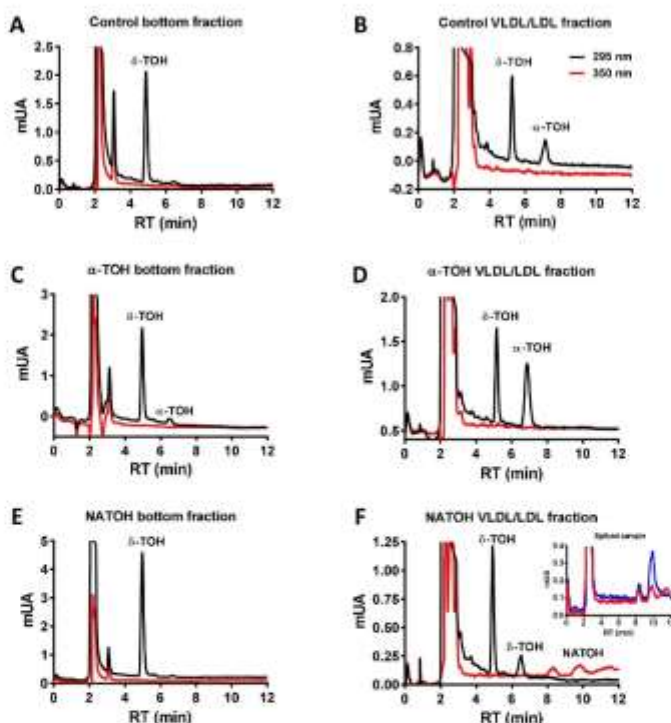
#### Detection of NATOH at the VLDL/LDL lipoprotein fraction and at the plasma of Apo E knockout mice

Assessment of the capacity of NATOH to be absorbed and transported by the VLDL/LDL lipoproteins of Apo E knockout mice is crucial as these mice demonstrate an increase in the VLDL lipoprotein fraction *versus* LDL due to the absence of Apo E. Thus, it is critical for our hypothesis to show that NATOH is present in the plasma of these mice, mainly or exclusively associated with these lipoproteins. Therefore, high-fat diet (without extra addition of Vitamin E; see experimental section) fed mice were gavaged with vehicle (100  $\mu$ L of sunflower oil) or NATOH (200 mg/kg for 14 days). As shown in Figure 7, NATOH was detected at the plasma of NATOH-treated mice at a concentration of  $\sim 1.7 \mu$ M. Alpha-tocopherol was detected at a concentration of  $\sim 20 \mu$ M in the control mice and its concentration augmented 5 times in tocopherol-treated mice (Figure 7, A, B and E).



**Figure 7.** Detection of NATOH in plasma of Apo E knockout mice. (A-C) Mice fed with a HFD without extra addition of Vitamin E were gavaged daily with vehicle (A),  $\alpha$ -TOH (B) or NATOH (C), 200mg/kg/day for 14 days. Mice were sacrificed and plasmas taken 12 hours post-last administration were extracted with methanol and analyzed by RP-HPLC (A-C; red line Abs. at 350 nm; black line Abs. at 295 nm). (D) A calibration curve of each of the analytes was generated to quantify the concentration of  $\alpha$ -TOH and NATOH in the plasma of mice. (E) Table showing the measured concentration of  $\alpha$ -TOH and NATOH in both control and treated mice.

To determine if NATOH in the plasma is being transported by lipoproteins (VLDL/LDL) or by proteins (albumin), the VLDL/LDL lipoprotein and the HDL/albumin fractions from the same animal plasma were purified by ultracentrifugation (see Methods).



**Figure 8.** Detection of NATOH in albumin/HDL (A, C, E) or in VLDL/LDL lipoprotein fractions (B, D, F) of Apo E knockout mice. The Albumin/HDL fraction (bottom fraction) and VLDL/LDL lipoprotein fractions were isolated by ultracentrifugation (as described in the methods) and the presence of NATOH or  $\alpha$ -TOH were analyzed as before. F Inset: shows the same sample that was spiked with 0.05 nmol of NATOH (blue line).

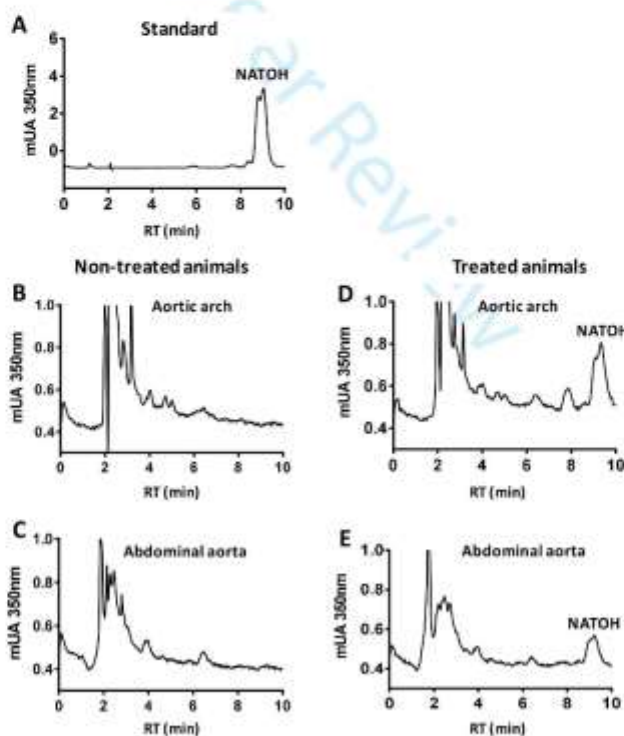
As shown in Figure 8, endogenous or supplemented  $\alpha$ -TOH were detected mainly on the VLDL/LDL lipoproteins of control or treated mice (Figure 8 A-D), as expected. Moreover, NATOH was exclusively detected within these lipoproteins, indicating that NATOH is transported in the plasma by the VLDL/LDL. To validate that the peak labeled as NATOH in Figure 8F is NATOH,



samples were spiked with a NATOH standard (0.05 nmol) (Figure 8, panel F inset, blue line). The increase in the peak, confirmed authentic NATOH.

#### NATOH is detected at the atherosclerotic aortas from high-fat diet fed Apo E Knockout mice

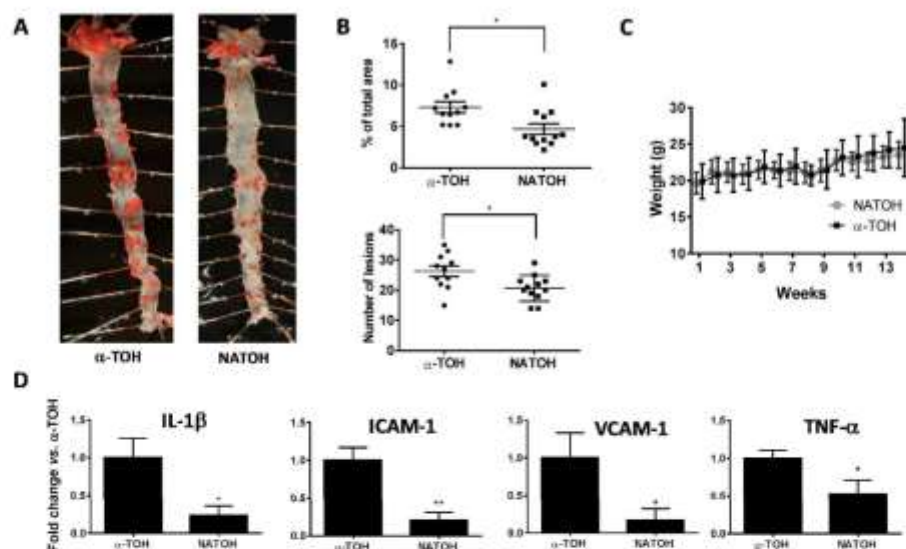
One of the most relevant novelties of our pharmacologic strategy is to target the atherosclerotic lesions with a non-conventional anti-inflammatory compound. Therefore, we fed Apo E Knockout mice with high-fat diet (HFD) for 14 weeks. During week 13 and 14, we treated the mice with NATOH (200 mg/kg/day, gavage) or vehicle (100  $\mu$ L of sunflower oil), and analyzed the presence of NATOH at the atheroma plaques. Aortic arches (high content of plaques) or abdominal aortas (low content) from control or NATOH-treated animals were homogenized, extracted with  $\text{CHCl}_3$  and analyzed by RP-HPLC to depict the presence of NATOH. The hybrid compound was present in the atherosclerotic lesions in the aortic arch as well as at the abdominal aorta of NATOH treated animals (Figure 9). As expected, NATOH was absent in aortas from control-treated animals (Figure 9).



**Figure 9.** Detection of NATOH by RP-HPLC in aortas from high-fat diet fed Apo E knockout mice. (A) Standard elution profile of NATOH by RP-HPLC detected at 350 nm. (B) Elution profile of the aortic arch of vehicle-treated mice (100  $\mu$ L sunflower oil). (C) Elution profile of the aortic arch of NATOH-treated mice (200 mg/kg/day in vehicle). (D) Elution profile of the abdominal aorta of vehicle-treated mice. (E) Elution profile of the abdominal aorta of NATOH-treated mice.

**NATOH reduces the expression of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecule as well as plaque formation in Apo E Knockout mice**

Previous reports demonstrate  $\alpha$ -TOH-dependent diminution of atherosclerosis in Apo E knockout mice (Pratico *et al.*, 1998). To determine if NATOH augments the anti-atherogenic properties of  $\alpha$ -TOH, oral administration of NATOH vs.  $\alpha$ -TOH was assessed. Mice were subjected to a HFD (14 weeks) and at the same time were dosed orally with NATOH (100mg/kg) or  $\alpha$ -TOH (100 mg/kg, equivalent to 111 I.U./kg/day). At the end of week 14, mice were sacrificed and atherosclerotic plaque development was analyzed (Figure 9A, see experimental section). NATOH-treated animals demonstrated diminished total lesion area compared with  $\alpha$ -TOH-treated mice (oil red-O-positive plaque area per total aorta area; Figure 10A and Figure 10B;  $p = 0.011$ ), as a consequence of having a reduced number of lesions (Figure 10B, bottom panel), and without affecting the weight gain over time (Figure 10C). These results demonstrate that incorporation of the nitroalkenyl moiety to the chromanol structure of  $\alpha$ -TOH, significantly improves the anti-atherogenic properties  $\alpha$ -TOH alone. Furthermore, and in agreement with the *in vitro* results, NATOH decreased the expression of NF- $\kappa$ B-dependent Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Protein 1 (VCAM-1), TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the aorta of the high-fat diet fed Apo E knockout to a greater degree than  $\alpha$ -TOH (Figure 10D).



**Figure 10.** NATOH reduces atherosclerosis in HFD treated Apo E knockout mice without affecting weight gain. (A) Apo E knockout mice were treated with NATOH or  $\alpha$ -TOH via gavage (100mg/kg in 100  $\mu$ L sunflower oil) from Monday to Friday for 14 weeks. Mice were sacrificed, aorta dissected and atherosclerotic plaque formation was manually measured using the oil red O staining and Image J software. (B) Atherosclerotic plaque area, number and lesion size. Plaque area was determined as a percentage of total aortic area, p = 0.011 (t test), Nr of lesions p = 0.015. (C) Weight gain versus time. (D) IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 and TNF- $\alpha$  mRNA were down-regulated by NATOH *in vivo*. The aorta of Apo E knockout mice treated as described in (A) was extracted and the RNA was isolated using TRIzol. Levels of IL-1 $\beta$ , VCAM-1, ICAM-1 and TNF- $\alpha$  were measured by RT-qPCR using GAPDH as housekeeping gene. One tailed t test: IL-1 $\beta$  = 0.020; ICAM-1 = 0.004; VCAM-1 = 0.033; TNF- $\alpha$  = 0.035.

#### Discussion and conclusions.

Atherosclerosis is a major health issue (30-50% of deaths worldwide) (WHO, 2017). Although the pathogenesis of the disease is complex and remains incompletely understood, in the last decade low grade, chronic and sterile inflammation has appeared to be an important player (Hansson

*et al.*, 2011; Mayerl *et al.*, 2006). Plaque-infiltrating macrophages release cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$ , among others) that play critical roles, including the over-expression of adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1 under control of the pro-inflammatory NF- $\kappa$ B transcriptional factor (Gistera *et al.*, 2017; Hansson *et al.*, 2011). Also, recruited leukocytes propagate the formation of inflammatory stimuli that, in turn, instigate a cascade of reactions that are ultimately responsible for the development of atherosclerotic plaques (Gistera *et al.*, 2017).

Oxidative and other modifications confer properties to LDL thought to be relevant to atherogenesis, leading to the "oxidative-modification hypothesis" of atherosclerosis (Diaz *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1989). As a consequence, antioxidants should reduce atherosclerosis (Diaz *et al.*, 1997). Indeed, vitamin E has been shown to slow atherosclerosis in animal models (Esterbauer *et al.*, 1992; Peluzio *et al.*, 2001; Pratico *et al.*, 1998). Our results demonstrate that adding a non-conventional anti-inflammatory functional group to the chromanol structure of  $\alpha$ -TOH, greatly improves the anti-atherogenic properties of Vitamin E. This is interesting, since in humans the effectiveness of using of Vitamin E or other antioxidant drugs in clinical trials has been, at best, contradictory (GISSI, 1999; Heart Outcomes Prevention Evaluation Study *et al.*, 2000; Stephens *et al.*, 1996). Importantly, in our experiments the animals were treated via gavage and at a dose that is similar to that used for patients enrolled in various clinical trials with Vitamin E (e.g.  $\sim$  800 I.U./day) (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study *et al.*, 2000).

It is well established that between all the isomers included under the generic name of Vitamin E,  $\gamma$ -TOH is the most abundant in the diet, but  $\alpha$ -TOH is the most abundant in the body (Brigelius-Flohe *et al.*, 1999). Yoshida *et al.* isolated and characterized a tocopherol-binding protein from the cytosol of rat liver cells (Yoshida *et al.*, 1992). This protein incorporates preferentially  $\alpha$ -TOH into very-low-density lipoprotein (VLDL) particles (Brigelius-Flohe *et al.*, 1999; Rigotti, 2007; Yoshida *et al.*, 1992). The other forms of vitamin E are similarly absorbed and reach the liver in chylomicron remnants, but they are mostly excreted into the bile with the excess of  $\alpha$ -TOH (Kayden *et al.*, 1993; Mardones *et al.*, 2004; Rigotti, 2007).

Thus, it was very important for our study, to demonstrate that the modification that we introduced into the chromanol structure of the tocopherol molecule would not inhibit its intestinal absorption and plasma distribution along the body, including its transport associated to lipoproteins. We showed that NATOH was incorporated into human LDL *ex vivo* using the same protocol that was developed to increase  $\alpha$ -TOH content of LDL (Teissier *et al.*, 1996). Most importantly, NATOH was

present in the VLDL/LDL mice lipoprotein fractions, plasma and in the plaques of gavage-treated animals. Particular to our experiments, we tested for NATOH in the VLDL/LDL lipoprotein fraction because Apo E knockout mice demonstrate a different lipoprotein profile than humans, with more VLDL than LDL (Bovenschen *et al.*, 2005; Garber *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2012).

Electrophilic, nitrated unsaturated fatty acids are endogenous nitroalkenes that adduct susceptible protein cysteine and histidine residues via Michael addition reaction, inducing alterations in protein structure, function and subcellular distribution (Batthyany *et al.*, 2006). They exert anti-inflammatory pleiotropic effects over an array of key signaling pathways that facilitate resolution of inflammation processes *in vivo* (Khoo *et al.*, 2010). Recently, aiming to better define structure-function relationships in nitrated unsaturated fatty acids, a large series of new chemicals containing an electrophilic nitroalkenyl group with variable acyl chain lengths were screened for both Nrf2- and NF- $\kappa$ B activities (Khoo *et al.*, 2018). In this *in vitro* study, Nrf2 showed maximum activity in the presence of  $\omega$ -12 nitroalkene fatty acids while NF- $\kappa$ B-inhibition was maximal for  $\omega$ -5 nitroalkenes (Khoo *et al.*, 2018). Herein, we changed not only the acyl chain of the nitroalkene, but instead we designed and developed a 5-nitroethenyl- $\gamma$ -tocopherol candidate where the nitroalkenyl group is conjugated to a chromanol ring. Our data demonstrate for the first time, that NATOH, a tocopherol analog, inhibits both the translocation of p65 to the nucleus and the expression of IL-6 and MCP-1 *in vitro*, while *in vivo* it significantly decreases the atherosclerotic plaque formation and the expression of ICAM-1, VCAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . We also show that NATOH is an efficient activator of the Nrf2-Keap1 pathway which is a major regulator of cytoprotective responses to endogenous and exogenous stress mediated by reactive oxygen/nitrogen species and electrophiles, and plays important role in protection against atherosclerosis as well as other cardiovascular diseases (Kansanen *et al.*, 2011; Kansanen *et al.*, 2009; Kansanen *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 2009).

From a clinical perspective, considerable focus is centered on the inhibition of the IL-1 $\beta$  pathway for treating Coronary Artery Disease (CAD) and Cardiovascular Diseases (CVD) (Couzin-Frankel, 2012; Hansson, 2017; Ridker *et al.*, 2014). Indeed, Ridker *et al.* have recently shown that the inhibition of IL-1 $\beta$  with Canakinumab, a fully human monoclonal antibody that targets IL-1 $\beta$ , led to a significantly lower rate of recurrent CV events than placebo (Ridker *et al.*, 2017; Ridker *et al.*, 2011). As a undesired consequence, Canakinumab was associated with a higher incidence of fatal infection (Ridker *et al.*, 2017), suggesting that a full inhibition of IL-1 $\beta$ -signalling pathway may not be desirable. Interestingly, our novel nitroalkene-tocopherol analog NATOH, acted as a non-

conventional anti-inflammatory drug decreasing the secretion and expression of pro-inflammatory cytokines (including IL-1 $\beta$  and adhesion molecules), involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

In summary, we transformed  $\alpha$ -tocopherol into an unconventional anti-inflammatory compound with anti-inflammatory and anti-atherogenic properties that is targeted to atherosclerotic plaques. These novel results will incentivize further study to develop durable approaches for rapid translation to clinical application.

For Peer Review

#### **AUTHOR INFORMATION**

##### **Corresponding Author**

\* E-mail: [batthyany@pasteur.edu.uy](mailto:batthyany@pasteur.edu.uy) Phone: +59825220910 ext. 196

##### **Author Contributions**

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

##### **Fundings Sources**

CABBIO, CSIC, FOCEM, ANII, PEDECIBA, PROINBIO, Institut Pasteur de Montevideo.

The author would like to thank Dr. E.E. Kelley for constructive criticism and writing assistance of the manuscript.

##### **DISCLOSURES**

CB, CE, GVL acknowledge financial interest in EOLO Pharma S.A.

## REFERENCES

Batthyány C, López GV (2015). Nitroalkene tocopherols and analogs thereof for use in the treatment and prevention of inflammation related conditions WO2015/073527 A1.

Batthyany C, Santos CX, Botti H, Cervenansky C, Radi R, Augusto O, *et al.* (2000). Direct evidence for apo B-100-mediated copper reduction: studies with purified apo B-100 and detection of tryptophanyl radicals. *Arch Biochem Biophys* **384**(2): 335-340.

Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PR, Duran R, Baker LM, Huang Y, *et al.* (2006). Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* **281**(29): 20450-20463.

Bonacci G, Baker PR, Salvatore SR, Shores D, Khoo NK, Koenitzer JR, *et al.* (2012). Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J Biol Chem* **287**(53): 44071-44082.

Botti H, Batthyany C, Trostchansky A, Radi R, Freeman BA, Rubbo H (2004). Peroxynitrite-mediated alpha-tocopherol oxidation in low-density lipoprotein: a mechanistic approach. *Free radical biology & medicine* **36**(2): 152-162.

Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ (2005). LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood* **106**(3): 906-912.

Brigelius-Flohe R, Traber MG (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**(10): 1145-1155.

Browne EC, Langford SJ, Abbott BM (2013). Synthesis and effects of conjugated tocopherol analogues on peptide nucleic acid hybridisation. *Organic & biomolecular chemistry* **11**(39): 6744-6750.

Cole MP, Rudolph TK, Khoo NK, Motanya UN, Golin-Bisello F, Wertz JW, *et al.* (2009). Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ Res* **105**(10): 965-972.

Couzin-Frankel J (2012). Cardiovascular disease. Massive trials to test inflammation hypothesis. *Science* **337**(6099): 1158.

Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PR, *et al.* (2006). Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem* **281**(47): 35686-35698.

Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, *et al.* (1986). Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol* **128**: 181-209.



Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keane JF, Jr. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**(6): 408-416.

Escande C, Nin V, Pirtskhalava T, Chini CC, Tchkonina T, Kirkland JL, et al. (2015). Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes* **64**(1): 12-22.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free radical biology & medicine* **13**(4): 341-390.

Garber DW, Kulkarni KR, Anantharamaiah GM (2000). A sensitive and convenient method for lipoprotein profile analysis of individual mouse plasma samples. *J Lipid Res* **41**(6): 1020-1026.

GISSI (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* **354**(9177): 447-455.

Gistera A, Hansson GK (2017). The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* **13**(6): 368-380.

Hansson GK (2017). Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy. *Circulation* **136**(20): 1875-1877.

Hansson GK, Hermansson A (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology* **12**(3): 204-212.

He Y, Varadarajan S, Munoz-Planillo R, Burberry A, Nakamura Y, Nunez G (2014). 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem* **289**(2): 1142-1150.

Heart Outcomes Prevention Evaluation Study I, Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P (2000). Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* **342**(3): 154-160.

Heinecke JW (1997). Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **8**(5): 268-274.

Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, et al. (2011). Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* **286**(16): 14019-14027.

Kansanen E, Jyrkkanen HK, Levonen AL (2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free radical biology & medicine* **52**(6): 973-982.

Kansanen E, Jyrkkanen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivela AM, Hakkinen SK, et al. (2009). Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem* **284**(48): 33233-33241.

Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology* **1**: 45-49.

Kayden HJ, Traber MG (1993). Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* **34**(3): 343-358.

Khoo NK, Freeman BA (2010). Electrophilic nitro-fatty acids: anti-inflammatory mediators in the vascular compartment. *Current opinion in pharmacology* **10**(2): 179-184.

Khoo NK, Li L, Salvatore SR, Schopfer FJ, Freeman BA (2018). Electrophilic fatty acid nitroalkenes regulate Nrf2 and NF-kappaB signaling: A medicinal chemistry investigation of structure-function relationships. *Scientific reports* **8**(1): 2295.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**(7347): 317-325.

Mann GE, Bonacasa B, Ishii T, Siow RC (2009). Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones. *Current opinion in pharmacology* **9**(2): 139-145.

Mardones P, Rigotti A (2004). Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *The Journal of nutritional biochemistry* **15**(5): 252-260.

Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G (2006). Atherosclerosis research from past to present—on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **449**(1): 96-103.

Mazzini F, Mandoli A, Salvadori P, Netscher T, Rosenau T (2004). Approaches to the Preparation of 4-Benzyloxy-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -D3)methylphenol, a Building Block for Labeled  $\delta$ -Tocopherol, and a New Synthesis of R,R,R-5-D3- $\alpha$ -Tocopherol. *European Journal of Organic Chemistry* **23**: 4864 – 4869.

Meir KS, Leitersdorf E (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(6): 1006-1014.

Peluzio MC, Homem AP, Cesar GC, Azevedo GS, Amorim R, Cara DC, *et al.* (2001). Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **34**(12): 1539-1545.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4471-4475.

Pratico D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA (1998). Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nature medicine* **4**(10): 1189-1192.

Reiter E, Jiang Q, Christen S (2007). Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol. *Mol Aspects Med* **28**(5-6): 668-691.

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, *et al.* (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* **377**(12): 1119-1131.

Ridker PM, Luscher TF (2014). Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J* **35**(27): 1782-1791.

Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, Libby P (2011). Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *American heart journal* **162**(4): 597-605.

Rigotti A (2007). Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol Aspects Med* **28**(5-6): 423-436.

Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, *et al.* (2010a). Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(5): 938-945.

Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, Bonacci G, Woodcock SR, Cole MP, *et al.* (2010b). Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **85**(1): 155-166.

Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, *et al.* (2005). Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(7): 2340-2345.

Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, *et al.* (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* **417**(6890): 750-754.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320**(14): 915-924.

Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* **347**(9004): 781-786.

Teissier E, Walters-Laporte E, Duhem C, Luc G, Fruchart JC, Duriez P (1996). Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high- density lipoproteins. *Clin Chem* **42**(3): 430-435.

Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, Ichikawa T, Zhang J, Petrovic-Djergovic D, *et al.* (2013). Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc Res* **98**(1): 116-124.

Vitturi DA, Minarrieta L, Salvatore SR, Postlethwait EM, Fazzari M, Ferrer-Sueta G, *et al.* (2015). Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride. *Nat Chem Biol* **11**(7): 504-510.

Weber C, Noels H (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* **17**(11): 1410-1422.

WHO (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). *WHO Fact sheet Updated May 2017*.

Yin W, Carballo-Jane E, McLaren DG, Mendoza VH, Gagen K, Geoghagen NS, *et al.* (2012). Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *J Lipid Res* **53**(1): 51-65.

Yoshida H, Yusin M, Ren I, Kuhlenkamp J, Hirano T, Stolz A, *et al.* (1992). Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol. *J Lipid Res* **33**(3): 343-350.

Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, *et al.* (2007). Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(8): 1706-1721.

Zhang J, Villacorta L, Chang L, Fan Z, Hamblin M, Zhu T, *et al.* (2010). Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* **107**(4): 540-548.

### Graphical Abstract

