



Programa de Desarrollo de
las Ciencias Básicas
Área Biología

Atrapadores de espín en la detección y prevención de daño oxidativo a biomacromoléculas

Dr. Adrián Aicardo

Tesis de Doctorado

Director: Prof. Dr. Rafael Radi
Centro de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina - UDELAR



Comisión de admisión y seguimiento

Dr. Homero Rubbo

Dra. Lucía Piacenza

Dra. Rossana Sapiro

Tribunal de tesis de Doctorado

Dr. Homero Rubbo

Dra. María Laura Chiribao

Dr. Santiago Signorelli

Índice

Resumen.....	3
Introducción.....	6
Especies reactivas del oxígeno.....	7
Síntesis y destinos del óxido nítrico.....	12
Reacciones de peroxinitrito con biomoléculas.....	16
Defensas antioxidantes celulares.....	26
Rol de las especies reactivas en el desarrollo de patología humana.....	28
Endotelio, estrés oxidativo y patología cardiovascular.....	28
Detección y neutralización de radicales proteicos por atrapadores de espín.....	34
Hacinamiento molecular y su posible influencia en la propagación de cadenas de radicales libres.....	40
Objetivos.....	43
Materiales y métodos.....	45
Resultados y discusión.....	57
Capítulo I - Caracterización de fenómenos de propagación radicalar y daño oxidativo proteico en condiciones de hacinamiento molecular.....	58
Capítulo II - Daño oxidativo endotelial y rol protector de agentes atrapadores de espín	
.....	87
Conclusiones.....	108
Publicaciones.....	112
Agradecimientos.....	114
Referencias.....	116

RESUMEN

Los compartimientos celulares son espacios con características fisicoquímicas particulares que distan enormemente de las condiciones utilizadas en estudios bioquímicos habituales. Las biomacromoléculas se presentan a altas concentraciones en el interior celular, configurando un entorno de hacinamiento molecular, producto la exclusión de volumen a este nivel. Entonces, fenómenos no evidentes en condiciones experimentales diluidas, tales como la propagación de reacciones radicalares de oxidación proteica, pueden hacerse relevantes en estos escenarios. Por lo tanto, en esta tesis nos planteamos como hipótesis de trabajo que el hacinamiento molecular de los ambientes celulares podría facilitar la propagación del daño oxidativo proteico. Por otro lado, la capacidad de interrupción de estas cadenas de propagación por parte de agentes atrapadores de espín, compuestos capaces de generar aductos radicalares estables, podría representar un nuevo mecanismo de acción que dé cuenta de los efectos protectores asignados a estas moléculas.

Condiciones de hacinamiento similares a las propuestas para los ambientes celulares fueron recreadas mediante la incubación con altas concentraciones de albúmina sérica bovina como proteína modelo. En este contexto, diferentes fuentes de radicales proteicos fueron utilizadas para iniciar reacciones redox y, a su vez, diferentes técnicas analíticas fueron aplicadas para detectar y caracterizar fenómenos de oxidación en cadena. Como resultado, nuestro diseño experimental nos permitió demostrar que la alta concentración proteica, permite la propagación de radicales proteicos en un proceso dependiente de oxígeno. Además, el estudio la acción de compuestos atrapadores de espín nos permitió apoyar esta hipótesis. Los compuestos estudiados, *tert*-butilfenilnitrona y dimetilpirrolina N-óxido, fueron capaces de interrumpir estas reacciones de oxidación en cadena disminuyendo los fenómenos oxidativos evidenciados. De forma complementaria, mostraron efectos protectores frente a alteraciones del metabolismo energético celular inducidas por flujos de especies reactivas.

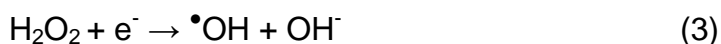
En conjunto, nuestros resultados muestran que la propagación radicalar de reacciones de oxidación, podría estar facilitada en ambientes celulares debido a la elevada concentración de grupos funcionales con actividad redox. Además, moléculas capaces de interferir con este proceso, tales como los atrapadores

de espín, podrían representar estrategias viables para limitar la propagación del daño mediado por especies reactivas radicalares.

INTRODUCCIÓN

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son moléculas derivadas del oxígeno molecular. Estas especies pueden ser formadas mediante reacciones de oxidorreducción (redox) en las que interviene este gas o a través de reacciones químicas que generan productos electrónicamente excitados. En el primer caso, los sucesivos pasos de reducción por un electrón de oxígeno dan origen a diferentes ERO (Reacciones 1-4).



A partir de esta serie de reacciones vemos que pueden formarse tres especies reactivas primarias (*i.e.* superóxido radical anión, $\text{O}_2^{\bullet-}$; peróxido de hidrógeno, H_2O_2 ; radical hidroxilo, $\bullet\text{OH}$), las cuales luego pueden reaccionar con diferentes blancos generando otras ERO. Por ejemplo, la sustracción de un átomo de hidrógeno por parte de $\bullet\text{OH}$ durante su reacción con un enlace C-H lleva a la formación de un radical centrado en carbono. Este último, a su vez puede reaccionar con diferentes blancos, pero en presencia de oxígeno, la reacción con este gas se ve muy favorecida dando lugar a un radical peroxilo (ROO^\bullet) [1], quien a su vez puede recorrer diferentes vías de descomposición dando diferentes productos [2].

Fuentes de ERO

Clásicamente, las ERO fueron descritas como agentes potencialmente deletéreos para las biomoléculas, debido a su capacidad de provocar modificaciones oxidativas sobre estas y favorecer el desarrollo de numerosas patologías. Sin embargo, este tipo de agentes también han demostrado llevar adelante actividades centrales para el mantenimiento de la homeostasis

celular, modulando procesos como: señalización celular, metabolismo energético, regulación del ciclo celular, metilación del ADN, regulación de vías de inflamación, entre otros [3].

En células de mamífero, existen diversas fuentes de producción endógena de ERO. Las principales reacciones de formación de ERO son catalizadas por enzimas reconociéndose actualmente, en humanos, 41 enzimas que catalizan la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 [3]. Las enzimas que contribuyen en mayor proporción a los flujos celulares de $O_2^{\bullet-}$ / H_2O_2 son las NADPH oxidasas (NOXs) y los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. No obstante, enzimas como xantina oxidasa, citocromo p450, lipooxigenasa y ciclooxigenasa también pueden generar aportes relevantes (Figura 1).

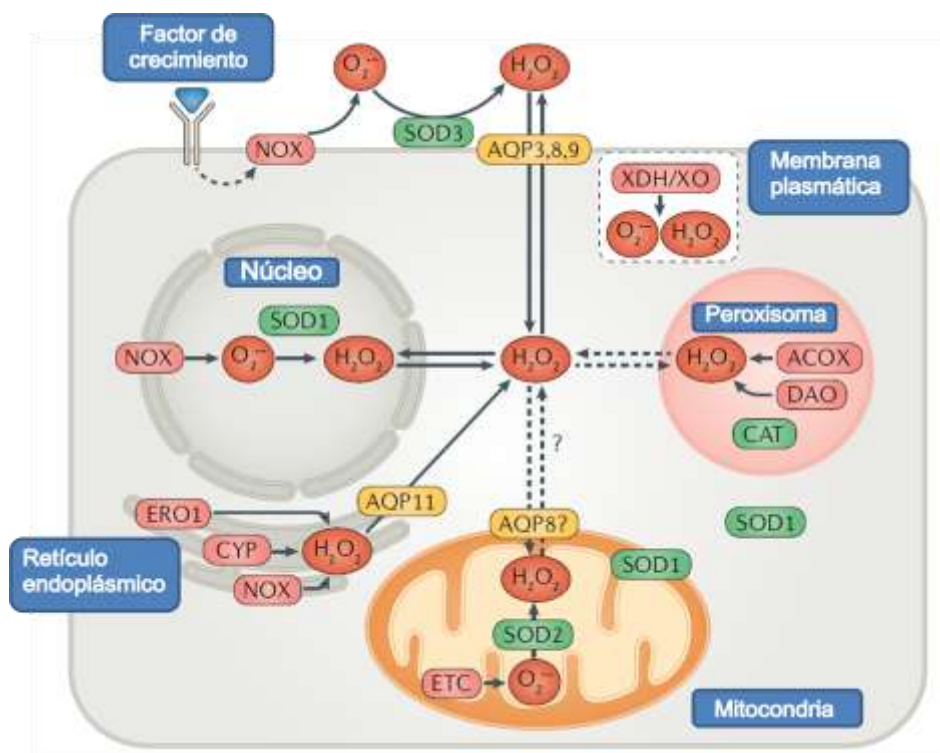


Figura 1. Principales fuentes celulares de especies reactivas del oxígeno.

CYP: citocromo p450; NOX: NADPH oxidasa; XDH/XO: xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa; SOD1-3: superóxido dismutasa 1-3; ETC: cadena de transporte de electrones mitocondrial; CAT: catalasa; ERO1: oxidoreductina endoplásmica 1; ACOX: acil-CoA oxidasa; AQP: acuaporina; DAO: D-aminoácido oxidasa. Adaptado de [3].

Las NOXs son una familia de enzimas que catalizan la reducción monovalente del O_2 para dar $O_2^{\bullet-}$ a expensas de equivalentes de reducción provenientes de NADPH. Las NOXs se ubican en diferentes compartimientos celulares lo que contribuye a una producción local de $O_2^{\bullet-}$. Por ejemplo, es característica la función de la NOX2 quien se encarga de la generación de flujos de $O_2^{\bullet-}$ hacia el interior de los fagosomas en células fagocíticas. Sin embargo, en células no especializadas en la defensa contra patógenos, como es el caso del endotelio vascular que expresa las isoformas 1, 2, 4 y 5, también cumplen un rol importante. Ha sido reportado que la actividad de la NOX4 puede tener tanto efectos beneficiosos como deletéreos para el funcionamiento del endotelio. Por un lado, flujos bajos de $O_2^{\bullet-}$ los cuales pueden ser eficientemente dismutados a H_2O_2 , favorecen mecanismos de vasodilatación y angiogénesis. Por otro lado, niveles suprafisiológicos de actividad de esta enzima se relacionan al desarrollo de disfunción endotelial y un fenotipo proinflamatorio promoviendo el inicio de aterosclerosis [4-5].

Como fue mencionado, la otra fuente mayoritaria de $O_2^{\bullet-}$ a nivel celular es la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC, por su sigla en inglés). A lo largo de la ETC existen varios sectores en donde puede ocurrir la fuga de electrones hacia el O_2 generando $O_2^{\bullet-}$. Se estima que esto ocurre con 1-3% de los electrones transportados, principalmente en los complejos I y III de la ETC [6]. Considerando que el 85% del O_2 corporal es utilizado por este organelo como aceptor final de electrones, la ETC mitocondrial resulta ser la principal fuente de $O_2^{\bullet-}$ de las células no fagocíticas [7].

En otros compartimientos celulares, también podemos encontrar enzimas que actúan como fuentes de $O_2^{\bullet-}$. Por ejemplo la xantina oxidasa, enzima mayoritariamente citosólica que participa del metabolismo de la purinas, cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina con la consiguiente producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 [8]. Adicionalmente, podemos encontrar a las enzimas pertenecientes a la familia citocromo p450, localizadas en el retículo endoplásmico, las cuales se encargan del metabolismo oxidativo de una gran variedad de compuestos lipofílicos endógenos y exógenos. Estas representan una familia de hemoproteínas capaces de generar flujos de $O_2^{\bullet-}$ o H_2O_2 durante su ciclo catalítico [9].

Destinos del radical superóxido

A nivel biológico el $O_2^{\bullet-}$ puede tener diversos destinos como resultado de su reacción con diferentes blancos celulares. El $O_2^{\bullet-}$ presenta un rol ambivalente, ya que dependiendo de la reacción considerada puede participar como agente reductor u oxidante. La reducción por un electrón del O_2 para dar $O_2^{\bullet-}$ presenta un $E^{\circ}_{O_2/O_2^{\bullet-}} = -0,33$ V, por otro lado la reducción, también por un electrón, del $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 presenta un $E^{\circ}_{O_2^{\bullet-}/H_2O_2} = 0,93$ V [10]. A pesar de estos potenciales, el $O_2^{\bullet-}$ presenta bajas constantes de velocidad de reacción con muchos blancos celulares. Sin embargo, es importante destacar algunos blancos característicos de este radical.

Uno de los posibles destinos del $O_2^{\bullet-}$ es la reducción de átomos de hierro libre a través de su reacción con hierro férrico (Fe^{3+}) para dar hierro ferroso (Fe^{2+}). A continuación, los átomos de hierro ferroso generados pueden participar en una reacción de Fenton y catalizar la descomposición de H_2O_2 llevando a la formación de $\bullet OH$, OH^- y Fe^{3+} . A esta serie de reacciones se la conoce en conjunto como reacción de Haber-Weiss [11]. La reducción de átomos de hierro por parte del $O_2^{\bullet-}$ no solamente ocurre con hierro libre. En sistemas biológicos, el $O_2^{\bullet-}$ es capaz de reaccionar con el átomo de hierro coordinado en grupos hemo de hemoproteínas. Por ejemplo, el citocromo *c* es la proteína encargada del transporte de electrones entre el complejo III y IV de la ETC mitocondrial. Su capacidad de transporte de electrones está dada por la presencia de un grupo hemo como grupo prostético que alterna el estado de reducción su átomo de hierro entre Fe^{2+} y Fe^{3+} . De esta manera, el $O_2^{\bullet-}$ es capaz de reaccionar Fe^{3+} -citocromo *c* determinando su reducción a Fe^{2+} -citocromo *c*. Dentro de este mismo organelo, existen enzimas que compiten con el citocromo *c* por el $O_2^{\bullet-}$ generado a nivel de la cadena de transporte de electrones. Un grupo importante de enzimas, catalizan la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , actuando como una primera línea de defensa antioxidante frente al $O_2^{\bullet-}$, las superóxido dismutasas (SOD). La dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$ es un proceso lento ($k < 1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [12], sin embargo, en presencia de SODs la reacción se ve acelerada a velocidades cercanas al límite difusional ($k \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [13]. La alta eficiencia de estas enzimas se explica, en parte, por el gradiente electrostático existente en la superficie de la proteína en torno al

sitio activo. De esta manera, se facilita el acceso del $O_2^{\bullet-}$ al centro metálico y la reacción se ve favorecida desde el punto de vista cinético [14-15]. El aporte de estas cargas a la actividad enzimática de las SODs, queda reflejado en la inhibición de la MnSOD como resultado de la nitración de una tirosina en el canal de acceso del $O_2^{\bullet-}$ [16-17]. Esta familia de enzimas está conformada por tres isoformas: SOD1 o CuZnSOD, SOD2 o MnSOD, SOD3 o SOD extracelular (la cual también presenta cobre y zinc como grupos prostéticos). Como fue mencionado, las SODs conforman un sistema de control para el $O_2^{\bullet-}$ producido como subproducto del metabolismo aeróbico. Por esta razón, se distribuyen en torno a los complejos de la cadena de transporte de electrones, ocupando los diferentes subcompartimientos de este organelo. La SOD1 se localiza a nivel del espacio intermembrana mitocondrial, lugar hacia donde difunde el $O_2^{\bullet-}$ producido por el complejo III de la ETC. Por otro lado, la SOD2 se ubica en la matriz mitocondrial donde recibe flujos de $O_2^{\bullet-}$ originados en los complejos I y II de la ETC [18]. Producto de la importante actividad de estas enzimas, la concentración de estado estacionario de $O_2^{\bullet-}$ a nivel celular es relativamente baja, siendo estimada en $10^{-11}M$ [19]. No obstante, se ha reportado que los flujos de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, y por lo tanto su concentración a nivel celular, aumentan en condiciones patológicas tales como la exposición a niveles elevados de glucosa (hiperglicemia) [20].

Además de las SODs, otra enzima de localización mitocondrial es capaz de reaccionar con $O_2^{\bullet-}$, con potenciales repercusiones funcionales para el metabolismo energético celular. La aconitasa mitocondrial es una enzima que participa del ciclo de Krebs catalizando la isomerización del citrato a isocitrato. En su conformación nativa esta enzima presenta un centro ferrosulfurado $[4Fe-4S]^{2+}$ cuya integridad es central para la catálisis. De los cuatro átomos de hierro, tres de ellos están fuertemente ligados a residuos de cisteína, en cambio el restante está débilmente ligado a azufre inorgánico del centro, pero es quien presenta un sitio de coordinación disponible y participa de la unión del sustrato al sitio activo [21]. El $O_2^{\bullet-}$ reacciona particularmente rápido ($\sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$ [22]) con este grupo prostético y provoca la pérdida del átomo de hierro lábilmemente unido, lo que resulta en un centro $[3Fe-4S]^{1+}$ y la consiguiente

pérdida de actividad enzimática [21]. Por esta razón, la aconitasa, tanto mitocondrial como citosólica, han sido utilizadas como biosensor redox de la producción de $O_2^{\bullet-}$, y su inactivación se ha interpretado como indicador indirecto de la sobreproducción de este radical en diferentes modelos celulares de patologías humanas [20, 22-23].

Además de los blancos mencionados, el $O_2^{\bullet-}$ presenta un blanco adicional de especial relevancia para el desarrollo de esta tesis, el óxido nítrico.

SÍNTESIS Y DESTINOS DEL OXIDO NITRICO

Fuentes de óxido nítrico a nivel biológico

El óxido nítrico ($\bullet NO$) es un radical derivado de nitrógeno que, de forma similar al $O_2^{\bullet-}$, también presenta un rol ambivalente para la bioquímica redox, ya que se le han asignado tanto efectos protectores como deletéreos [24].

El $\bullet NO$ ha sido identificado, hace ya varias décadas, como mediador de diferentes procesos fisiológicos tales como la regulación bioquímica de contracción del músculo liso vascular [25-26]. No obstante, alteraciones en homeostasis del $\bullet NO$ han sido asociadas a disfunción endotelial y daño oxidativo vascular [27]. En sistemas biológicos el $\bullet NO$ es ubicuo y puede producirse desde diferentes fuentes, las cuales pueden ser clasificadas como: dependientes o independientes de óxido nítrico sintasas (NOS).

Las NOS son una familia de hemoproteínas que sintetizan $\bullet NO$ a partir de L-arginina, NADPH y oxígeno como sustratos, y FAD, FMN, tetrahidrobiopterina (BH_4) y calmodulina como cofactores. En su conformación nativa, estas enzimas se disponen como homodímeros con la formación de un centro zinc-tiolato involucrando dos residuos de cisteína de cada monómero [28]. La presencia de este centro es crítica para el correcto plegamiento y actividad de la enzima, debido a que los electrones provistos por el NADPH son transferidos de un monómero a otro durante el ciclo catalítico. En consecuencia, modificaciones estructurales pueden facilitar la fuga de electrones hacia la

reducción del O_2 para producir $O_2^{\bullet-}$, en un proceso denominado desacoplamiento de la NOS [29].

Tres isoformas de la NOS han sido aisladas, clonadas y caracterizadas: nNOS, NOS neuronal; iNOS, NOS inducible; eNOS, NOS endotelial.

Las tres isoformas son expresadas en una gran variedad de tejidos, pero la regulación diferencial de su actividad determina diferencias en la producción de $\bullet NO$ en ciertas condiciones. Por un lado, eNOS y nNOS son expresadas de manera constitutiva y su actividad se ve estimulada frente a incrementos en los niveles intracelulares de calcio. Por otro lado, la iNOS se expresa en respuesta a la acción de citoquinas proinflamatorias (e.g. IL-1, TNF- α , IFN- γ), particularmente en células del sistema inmune. La actividad de iNOS no está regulada por los niveles de calcio por lo que puede generar grandes flujos de $\bullet NO$ en presencia de bajas concentraciones de este metal. A su vez, la actividad de las NOS se ve afectada por: modificaciones postraduccionales (*i.e.* acilación, miristoilación, fosforilación, S-nitrosilación), disponibilidad de sustrato y cofactores, localización subcelular [30].

Existen marcadas diferencias en los flujos de $\bullet NO$ generados por las isoformas, por ejemplo, eNOS y nNOS son capaces de producir bajos flujos de $\bullet NO$ (en el orden nanomolar). En cambio, la iNOS es capaz de producir flujos 100 veces más grandes que las anteriores.

Con respecto a fuentes alternativas de $\bullet NO$, otras reacciones químicas y enzimáticas median la producción de $\bullet NO$ a través de mecanismos independientes de NOS. Uno de los agentes que participa en reacciones de formación de $\bullet NO$ es el nitrito (NO_2^-), tanto el generado a través de la autooxidación del $\bullet NO$ como el proveniente de la dieta (*i.e.* vegetales, principalmente en forma de NO_3^- que es reducido en la cavidad oral a NO_2^-) (Reacciones 5-9). En un ambiente ácido, como puede ser la luz gástrica, el nitrito puede protonarse formando ácido nitroso (HNO_2), el cual puede descomponerse generando $\bullet NO$ y $\bullet NO_2$ [31]. A su vez, dentro del compartimiento intravascular, la desoxihemoglobina ($HbFe^{2+}$) puede reducir al NO_2^- para producir $\bullet NO$ y metahemoglobina ($HbFe^{3+}$), mientras que la oxihemoglobina puede oxidar al NO_2^- para dar NO_3^- . Este mecanismo provee

al organismo de un sistema vasodilatador cuando la concentraciones intravasculares de O_2 son bajas [32]. Además, también se ha reportado la reducción catalítica por un electrón del NO_2^- para formar $\bullet NO$ a través de la acción de la enzima xantina oxidasa [33]. Por último, otras fuentes independientes de NOS involucran diferentes reacciones químicas de importancia farmacológica (*i.e.* agentes dadores de $\bullet NO$, compuestos nitrosados, nitrosotioles, entre otros).



Una vez producido por cualquiera de los sistemas mencionados, el $\bullet NO$ puede tener diferentes destinos dependiendo de su localización y concentración de blancos locales (Figura 2).

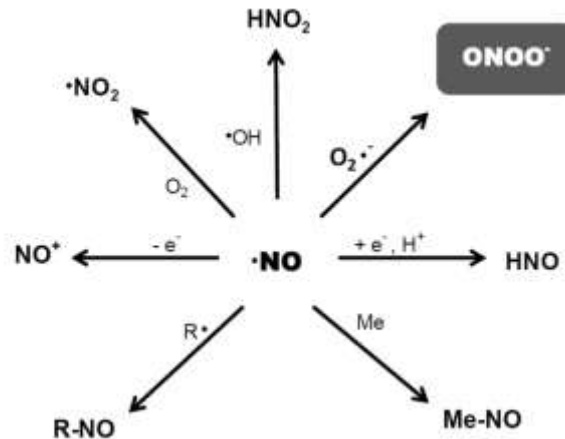


Figura 2. Especies reactivas del nitrógeno derivadas del $\bullet\text{NO}$. Adaptado de [24].

En presencia de oxígeno, el $\bullet\text{NO}$ puede reaccionar con O_2 , generando $\bullet\text{NO}_2$ ($k=2,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [34]). A continuación, el $\bullet\text{NO}_2$ puede reaccionar con una nueva molécula de $\bullet\text{NO}$ produciendo N_2O_3 , un producto inestable que se hidroliza a HNO_2 y NO_2^- . Esto determina que el NO_2^- sea el principal producto de la vía de autooxidación del $\bullet\text{NO}$. Además, el $\bullet\text{NO}$ es capaz de reaccionar con centros metálicos de hemoproteínas, como es el caso de la guanilato ciclasa en el músculo liso vascular. Esta reacción determina la activación de la enzima, el incremento en los niveles de cGMP y la disminución de los niveles intracelulares de calcio llevando a la relajación muscular.

Por otro lado, debido a su naturaleza radicalar, el $\bullet\text{NO}$ es capaz de reaccionar rápidamente con un amplio espectro de radicales generando diferentes productos. Por ejemplo a nivel de membranas celulares, en donde la concentración de $\bullet\text{NO}$ aumenta con respecto a entornos hidrofílicos, este radical puede reaccionar con radicales peroxilo centrados en fosfolípidos ($\text{LOO}\bullet$) resultando en la nitración de lípidos. Este fenómeno interrumpe cadenas de lipoperoxidación a nivel de membrana y se ha reportado como uno de los mecanismos de las acciones "antioxidantes" del $\bullet\text{NO}$ [35]). A su vez, el $\bullet\text{NO}$ puede reaccionar con especies reactivas del azufre como son los radicales tiilo ($\text{R-S}\bullet$), tanto en moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, como

de alto peso molecular en el caso de proteínas. La rápida reacción entre el $\bullet\text{NO}$ y $\text{R-S}\bullet$ resulta en la formación de un nitrosotiol, reacción que se ve favorecida en sitios de inflamación o compartimientos hidrofóbicos [36]. A su vez, el $\bullet\text{NO}$ también puede reaccionar con otros radicales centrados en aminoácidos, como por ejemplo el radical tirosilo ($k\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) dando como resultado la formación de 3-nitrosotirosina, la cual luego puede ser oxidada a 3-nitrotirosina [37].

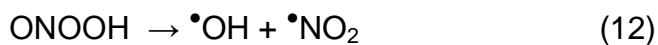
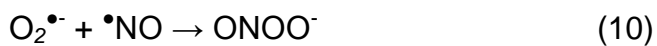
Por último, destacaré uno de los blancos más relevantes del $\bullet\text{NO}$ en sistemas biológicos, el $\text{O}_2\bullet^-$. El peso de la reacción entre estas dos especies reactivas surge de considerar, por un lado, la velocidad a la que esta ocurre (*i.e.* cercana al límite difusional ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [38]), y que su producto también es una especie reactiva de significativo valor para la bioquímica redox, el peroxinitrito (ONOO^-).

REACCIONES DE PEROXINITRITO CON BIOMOLÉCULAS

El peroxinitrito es un compuesto con un rol importante en la homeostasis redox debido a que: 1) es un nucleófilo fuerte; 2) actúa como agente oxidante promoviendo reacciones de oxidación por uno o dos electrones; 3) los radicales precursores pueden surgir desde diferentes fuentes (*e.g.* NOS desacoplada, metabolismo mitocondrial, entre otros); 4) presenta múltiples blancos a nivel celular.

Destinos del peroxinitrito

El peroxinitrito puede actuar como un oxidante por un electrón tanto directamente (*e.g.* oxidación de citocromo c^{2+}) como indirectamente a través de los productos de su homólisis. La protonación de ONOO^- para formar su ácido conjugado (ácido peroxinitroso, ONOOH , $\text{pK}_a=6,8$), debilita el enlace O-O precipitando su homólisis dando lugar a la formación de $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ (Ecuaciones 10-12) [39], dos fuertes especies reactivas que median reacciones de oxidación/hidroxilación y oxidación/nitración, respectivamente.



La homólisis catalizada por protón ocurre con una constante de primer orden de $0,9 \text{ s}^{-1}$ a 37°C [39]. Entonces, la relevancia cuantitativa de la homólisis a nivel celular es limitada, considerando que las constantes de velocidad de reacciones bimoleculares del ONOO^- son mucho mayores. Sin embargo, el pequeño porcentaje de ONOO^- que se descompone mediante homólisis (ca. 30%) produce $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$, ambos oxidantes por un electrón que pueden iniciar reacciones radicalares en cadena amplificando el daño oxidativo. Más aún, la descomposición catalizada por protón de ONOO^- puede volverse más relevante en fases hidrofóbicas (e.g. membranas celulares) actuando como disparador de procesos de peroxidación lipídica.

A pesar de esto, la mayoría del ONOO^- formado (ca. 70%) isomeriza a nitrato y algunas enzimas, como la oxihemoglobina, pueden catalizar esta reacción [40]. Aunque presenta una corta vida media ($\sim 10 \text{ ms}$ a pH fisiológico), el ONOO^- puede difundir a través de membranas celulares y afectar células cercanas en un rango de uno o dos diámetros celulares [41-43].

Muchas biomoléculas pueden ser oxidadas o nitradas por radicales derivados de ONOO^- incluyendo residuos de tirosina, tioles, ADN y ácidos grasos insaturados de membrana [24]. Sin embargo, en sistemas biológicos en donde estos blancos coexisten, la concentración individual así como la constante de velocidad de reacción van a determinar cuáles serán los más afectados. Entonces, en células y tejidos un importante porcentaje del ONOO^- formado va a reaccionar mayoritariamente con dióxido de carbono, algunos tioles, selenoproteínas y algunos centros metálicos.

Dióxido de carbono

A pesar de su relativamente baja constante de velocidad de reacción ($k=5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [44], comparado con otros blancos, la adición nucleofílica del

ONOO⁻ al CO₂ es muy importante en sistemas biológicos debido a la concentración fisiológica de este gas (1-2 mM, en equilibrio con bicarbonato). Como resultado, un intermediario transitorio es formado, nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO₂⁻), el cual rápidamente homoliza a radical carbonato (CO₃^{•-}) y [•]NO₂ con rendimiento cercano al 35% (Ecuaciones 13-14). En consecuencia, la reacción de ONOO⁻ con CO₂ lleva a la formación secundaria de oxidantes por un electrón que puede expandir el daño nitroxidativo [45].



Tioles

El peroxinitrito puede oxidar tioles mediante reacciones de transferencia de uno o dos electrones. El ONOOH reacciona directamente con tiolatos (RS⁻) promoviendo una oxidación por dos electrones obteniéndose un ácido sulfénico (RSOH) y nitrito como productos. A su vez estos tioles oxidados, usualmente derivados de ácido sulfénico de moléculas de bajo peso molecular biológicamente relevantes, son inestables y reaccionan con tioles para formar disulfuros como producto principal. En el caso de ácidos sulfénicos proteicos, pueden reaccionar también con tioles de bajo peso molecular o pertenecientes a otras proteínas para formar enlaces disulfuro. En el primer caso, la formación de este aducto representa la principal ruta de S-glutationilación de proteínas en sistemas biológicas, una modificación postraduccional reversible la cual puede cambiar la función de la proteína o proteger a la cisteína de sobreoxidación a formas oxidadas no reversibles (ácidos sulfínico, SO₂H, y sulfónico, SO₃H). Es importante destacar que la reactividad de peroxinitrito hacia grupos tioles varía ampliamente en términos de constante de velocidad de reacción. Por un lado, el tiol libre de la cisteína 34 de la albúmina sérica bovina tiene una constante de reacción de segundo orden de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pero por otro lado, el tiol peroxidático de las peroxiredoxinas reacciona con una constante de segundo

orden de $\sim 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, permitiendo a estas actuar como primera línea de defensa antioxidante contra peroxinitrito [46].

Además de participar en reacciones de oxidación por dos electrones, como fue mencionado, el ONOO^- puede intervenir en oxidaciones por un electrón con tioles. Los tioles de bajo peso molecular, así como tioles en proteínas, pueden ser oxidados por un electrón llevando a la formación de un radical tiilo (RS^\bullet). Como resultado del decaimiento de peroxinitrito, tanto por homólisis como por su reacción con CO_2 , diferentes oxidantes por un electrón son producidos ($^\bullet\text{OH}$, $^\bullet\text{NO}_2$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$) los cuales son capaces de oxidar grupos tioles a RS^\bullet . Este radical centrado en azufre también es inestable y en presencia de oxígeno, ocurre la formación de radical tioperoxilo (RSOO^\bullet) a través de una reacción reversible controlada por difusión ($\text{RS}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{RSOO}^\bullet$, $k=2,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $\text{RSOO}^\bullet \rightarrow \text{RS}^\bullet + \text{O}_2$, $k=6,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ [47]. A su vez, este radical es capaz de propagar el daño a través de reacciones en cadena radicalares (Figura 3) [46].

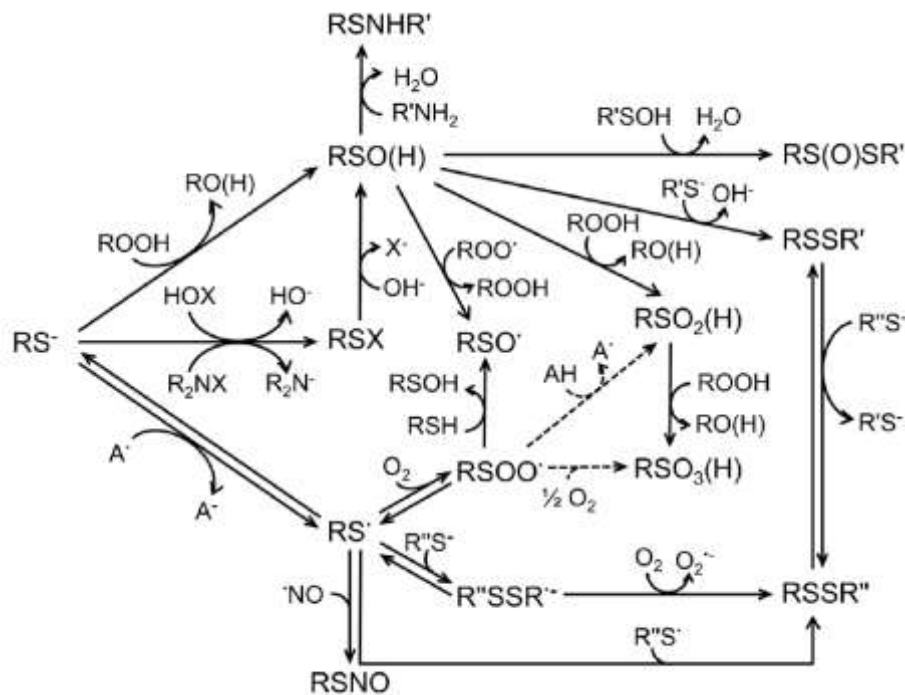


Figura 3. Reacciones redox y destinos de especies reactivas del azufre.
Adaptado de [46].

Centros metálicos

La exposición de centros metálicos proteicos a ONOO^- resulta en reacciones de oxidación directa por un electrón, con la consiguiente formación de $\bullet\text{NO}_2$ y un complejo oxo-metálicos. Ambos productos son capaces de dar lugar a especies radicalares secundarias, un ejemplo es la reacción de ONOO^- con oxihemoglobina. La reacción entre ONOO^- y el átomo de hierro ferroso del grupo hemo principalmente produce metahemoglobina (Fe^{3+} -hemoglobina) y nitrato (90%), sin embargo una fracción minoritaria sufre la oxidación por dos electrones resultando en ferril-hemoglobina ($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{Hb}$) y $\bullet\text{NO}_2$ (10%) [40].

Residuos de tirosina

Entre las múltiples reacciones de oxidación mediadas por ONOO^- en sistemas biológicos, una de las modificaciones más representativas y estudiadas es la nitración de residuos de tirosina a 3-nitrotirosina (NO_2Tir). La nitración de tirosinas proteicas es una modificación oxidativa postraducciona que ocurre *in vivo* y puede afectar tanto la estructura como la función de una proteína. Esta modificación implica la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) en uno de los átomos de carbono en la posición *orto* (con respecto al grupo $-\text{OH}$) del anillo fenólico del residuo de tirosina. De manera importante, el ONOO^- no causa la nitración de tirosinas en una reacción directa bimolecular, sino que la promueve a través de los radicales derivados de su homólisis y otros oxidantes por un electrón. Es de destacar que en condiciones fisiológicas, la nitración de tirosinas ocurre a través de un proceso en dos pasos: 1) el anillo fenólico de la cadena lateral es oxidado por un electrón, llevando a la formación de radical tirosilo (Tir^\bullet); 2) este radical sufre la adición de $\bullet\text{NO}_2$ resultado en el producto no radicalar NO_2Tir (Figura 4) [24].

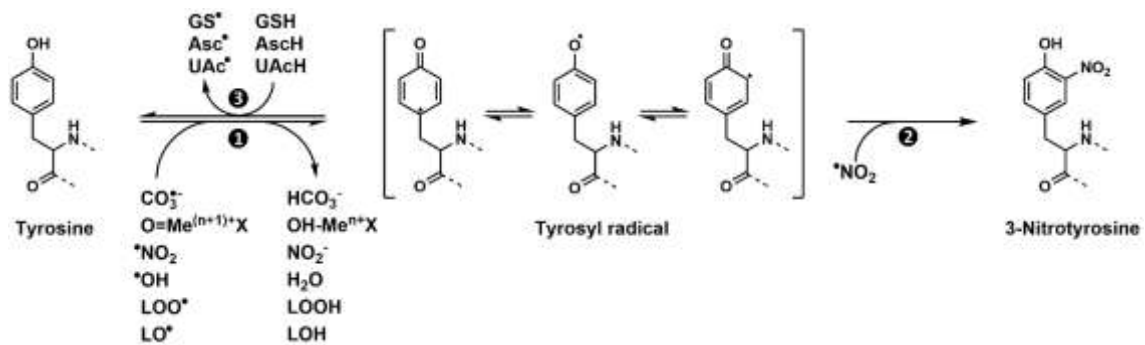


Figura 4. Principales reacciones involucradas en la formación de 3-nitrotirosina. Brevemente, la nitración de tirosinas ocurre a través de dos pasos de reacción que involucran química radicalar. Inicialmente, la tirosina es oxidada por diferentes oxidantes por un electrón (1); luego, el radical tirosilo reacciona con dióxido de nitrógeno, produciendo el producto no radicalar 3-nitrotirosina (2). Adaptado de [24].

Muchos oxidantes por un electrón originados a partir de la descomposición de ONOO⁻ *in vivo* son capaces de oxidar tirosinas a radical tirosilo: CO₃^{•-}, diferentes complejos oxo-metálicos (O=Me⁽ⁿ⁺¹⁾⁺X) producidos por oxidación metales de transición, •NO₂ y •OH producidos durante la homólisis del ácido peroxinitroso [48]. A su vez, en entornos hidrofóbicos como las membranas celulares y lipoproteínas, ciertos intermediarios radicalares de procesos de peroxidación lipídica como radical peroxilo (LOO[•]) y alcoxilo (LO[•]) pueden oxidar residuos de tirosina, y de esta manera, actuar como vínculo entre fenómenos de oxidación lipídica y proteica [49].

Considerando que ONOO⁻, a través de sus diversas rutas de descomposición, produce tanto oxidantes por un electrón capaces de oxidar tirosina a radical tirosilo y, al mismo tiempo produce •NO₂ que puede recombinar con Tir[•], es uno de los agentes más relevantes que llevan a la nitración de tirosinas en proteínas en sistemas biológicos. Sin embargo, *in vivo* la nitración de tirosinas también puede ocurrir a través de reacciones independientes de ONOO⁻. El más relevante de los mecanismos alternativos de nitración es el que depende de la formación de •NO₂ catalizado por hemoperoxidasas a partir de H₂O₂ y

NO_2^- . Algunas hemoperoxidasas, principalmente aquellas liberadas por leucocitos en condiciones inflamatorias tales como mieloperoxidasa (MPO) y peroxidasa eosinofílica (EPO), pueden mediar la nitración activa de proteínas a través de un proceso catalítico que comienza con la oxidación por dos electrones del grupo hemo del sitio activo de la peroxidasa por H_2O_2 . Como resultado de este paso de oxidación, un radical catión oxoferrilporfirina π ($\text{HP}^{\bullet+}$ - $(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$) conocido como compuesto I, es formado. Este intermediario es un fuerte oxidante por uno o dos electrones lo que le permite oxidar tanto Tir a Tir^\bullet , como NO_2^- a $^\bullet\text{NO}_2$. A su vez, cuando el compuesto I oxida Tir o NO_2^- se ve reducido por un electrón generando el intermediario oxo-ferrilo ($\text{HP}-(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$), conocido como compuesto II. Esta especie también es un fuerte oxidante por un electrón capaz producir Tir^\bullet y $^\bullet\text{NO}_2$ llevando a la nitración de tirosinas [50]. Este mecanismo de nitración no está limitado a hemoperoxidasas, también ha sido vinculado a hemina libre y otros complejos metálicos de bajo peso molecular [51]. De forma similar con la nitración de tirosinas dependiente de hemoperoxidasa, un mecanismo independiente de $^\bullet\text{NO}_2$ ha sido demostrado para algunas hemoproteínas. Este mecanismo particular implica la adición de $^\bullet\text{NO}$ a un Tir^\bullet generando 3-nitrosotirosina (NO-Tir). Este intermediario cuando es formado en la proximidad de un grupo hemo, y en presencia de H_2O_2 , puede sufrir dos subsecuentes pasos de oxidación por un electrón, produciendo finalmente 3-nitrotirosina [52]. Este mecanismo puede ser de gran relevancia *in vivo* debido a que requiere $^\bullet\text{NO}$ y no $^\bullet\text{NO}_2$, quien tiene una menor vida media [53].

Debido al hecho de que la nitración de tirosinas es mediada por mecanismos radicalares, diferentes productos secundarios son usualmente formados en conjunto con 3-nitrotirosina. Los dos más importantes y frecuentes son 3,3'-ditirosina (DiTyr), el cual surge de la recombinación de dos Tir^\bullet , y 3-hidroxitirosina (DOPA), producido principalmente a través de la adición de $^\bullet\text{OH}$ a tirosina y la subsecuente pérdida de un electrón en el aducto formado [53].

La nitración de residuos de tirosina tiene diferentes consecuencias biológicas dependiendo de la proteína afectada. Por un lado, como fue mencionado previamente la nitración de tirosina inhibe la actividad dismutasa de la SOD 2 (MnSOD) [17]. Por otro lado, en otras ocasiones esta modificación

postraducciona puede resultar en una ganancia de función mas que en una inactivación, y esa actividad adicional puede ser tanto tóxica como protectora. Un ejemplo de esto es el efecto neurotóxico de la exposición de factor de crecimiento neural (NGF) a ONOO^- , lo que transforma a este factor neurotrófico en una señal proapoptótica neuronal [54]. Sin embargo, la nitración también puede tener efectos protectores como en el caso la nitración intragástrica del pepsinógeno y pepsina dependiente de NO_2^- . Este fenómeno resulta en la prevención del desarrollo de enfermedad ulcerosa péptica [31].

ADN

Los nucleótidos purínicos del ADN pueden ser oxidados o nitrados en presencia de ONOO^- , resultando en 8-oxo y 8-nitroguanina como los dos mayores productos. A su vez, ONOO^- también puede atacar el esqueleto de desoxirribosa causando roturas en la cadena de ADN [24].

Lípidos

Las biomoléculas de membrana como los ácidos grasos insaturados, pueden ser dañados por diferentes especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. De esta manera, la oxidación por un electrón de los ácidos grasos de membrana, mediado por estas especies reactivas, produce radicales alquilo (L^\bullet) muy reactivos los cuales puede sustraer electrones desde otros ácidos grasos iniciando reacciones de oxidación radicalar en cadena. A su vez, en presencia de oxígeno, los radicales alquilo reaccionan rápido con oxígeno produciendo radical peroxilo orgánico (LOO^\bullet), un fuerte agente oxidante, capaz de propagar reacciones de peroxidación lipídica en membranas biológicas. Las reacciones de peroxidación de lípidos resultan en una variedad de productos incluyendo hidroperóxidos lipídicos (e.g. 4-hidroxinonal, 4-oxononal, entre otros), dienos conjugados y malondialdehído. En consecuencia, un incremento en la detección de estos productos, tanto *in vitro* como *in vivo*, es considerado evidencia de daño oxidativo lipídico [7, 55]. Contrariamente a lo que ocurre en la fase de propagación, la reacción de radicales lipídicos con otras especies

radicales resulta en reacciones de terminación interrumpiendo la propagación de la peroxidación lipídica. A su vez, la reacción de radicales lipídicos con especies reactivas del nitrógeno (*i.e.* $\bullet\text{NO}_2$ y $\bullet\text{NO}$) produce lípidos nitrosados y nitrados. Sin embargo, algunas de estas reacciones llevan a intermediarios que pueden dar lugar a especies reactivas. Por ejemplo, la reacción de radicales peroxilo con $\bullet\text{NO}$ produce un peroxinitrito orgánico (ROONO), un derivado lipídico el cual puede rearrreglar en nitrato orgánico (RONO₂) o descomponerse en radical alcoxilo (LO \bullet) y ($\bullet\text{NO}_2$). En el último caso, otra molécula de $\bullet\text{NO}$ es consumido para reducir el radical alcoxilo formado [56].

En general, los ácidos grasos insaturados nitrados representan un clase de derivados lipídicos señalizadores y representan los principales óxidos de nitrógeno bioactivos en la vasculatura [57]. Los ácidos grasos nitrados presentes en plasma y eritrocitos humanos evidencian la capacidad de modular rutas de señalización vinculadas a la inflamación. La búsqueda del rol farmacológico de ácidos grasos nitrados es un área de importante investigación activa. El ácido oleico nitrado, por ejemplo, muestra actividad de señalización celular asociada a respuesta antiinflamatoria [58]. El derivado nitroalqueno obtenido a partir de la nitración de ácido araquidónico tiene actividad antiinflamatoria en macrófagos activados mediante dos mecanismos, inhibe la expresión de iNOS y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias [59]. A su vez, se ha propuesto a este derivado nitrado como un potencial inhibidor de la enzima ciclooxigenasa [60]. Adicionalmente, diferentes lípidos nitrados han sido evaluados como potenciales como moduladores de hipertensión arterial [61]), inflamación vascular [62], modelos de isquemia/reperfusión miocárdica [63] y aterosclerosis [64].

En situaciones de inflamación, como ocurre de manera crónica en la pared vascular de las arterias durante la aterogénesis, la sobreproducción de ONOO⁻ puede determinar modificaciones en los componentes de la matriz extracelular. El perlecan, un proteoglicano presente en la matriz extracelular de diferentes tejidos, incluida la pared arterial, representa un potencial blanco para el ONOO⁻ llevando a modificaciones estructurales y funcionales de esta biomolécula. Ha sido reportado que la incubación de perlecan con ONOO⁻ lleva a la formación de 3-nitrotirosina en la proteína central determinando la alteración de la

capacidad de unión a células endoteliales de las arterias. A su vez, las cadenas de heparán sulfato del perlecan también pueden sufrir modificaciones oxidativas alterando la interacción del perlecan con factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) [65].

Por otro lado, los radicales derivados de la homólisis de ONOO^- también pueden dar lugar a daño oxidativo de los componentes de la matriz extracelular. En este sentido, la depolimerización de glucosaminoglucanos, tales como ácido hialurónico y condroitín sulfato, secundaria a la exposición a $\bullet\text{OH}$ y $\text{CO}_3\bullet^-$ ha sido reportada [66].

En suma, ONOO^- y sus radicales derivados pueden ser responsables de una gran variedad de modificaciones nitrooxidativas en un amplia gama de biomoléculas, reflejando el potencial daño de su sobreproducción en situaciones patológicas.

DEFENSAS ANTIOXIDANTES CELULARES

En la sección anterior fueron expuestos aspectos generales de la química de las principales especies reactivas de relevancia biológica, presentando cómo la producción de éstas está vinculada a diversos procesos biológicos. De esta manera, discutimos cómo la bioquímica redox juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular participando en el metabolismo energético, la defensa contra patógenos, la señalización celular, el plegamiento de proteínas, entre otros, reflejando que la exposición a las mismas es una consecuencia ineludible del mantenimiento de la vida.

Sin embargo, las modificaciones provocadas en biomoléculas como resultado de la interacción con estos agentes, no siempre implican una situación deletérea para la célula. Por ejemplo, en condiciones fisiológicas existen flujos de H_2O_2 que participan en mecanismos de señalización celular encargados de la regulación de fenómenos como proliferación, diferenciación o migración celular, entre otros [3]. El mantenimiento de un estado estacionario fisiológico de estas especies depende del nivel y localización de su producción, así como

de la actividad de los mecanismos endógenos de detoxificación de las mismas. Bajo el término "defensas antioxidantes" se incluye una serie de biomoléculas capaces de actuar como blancos preferenciales para las especies reactivas, previniendo su reacción con biomoléculas esenciales para la célula. De manera general, podemos clasificar a los componentes de las defensas antioxidantes en función de su masa molecular en antioxidantes de bajo y alto peso molecular.

Dentro de las moléculas que actúan como antioxidantes de bajo peso molecular algunas son de origen exógeno (*e.g.* ascorbato, tocoferol) mientras que otras son sintetizadas de forma endógena (*e.g.* glutatión). Con respecto a las primeras, el ascorbato actúa como agente reductor de especies radicalares (*e.g.* $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, $\bullet NO_2$, $CO_3^{\bullet-}$) presentes en fases acuosas como el citosol celular o el plasma sanguíneo [45]. En cambio, el tocoferol se concentra en estructuras lipídicas gracias a su hidrofobicidad, donde actúa interrumpiendo cadenas de propagación de peroxidación lipídica a través de la reducción intermediarios radicalares [67]. La reacción de ambas vitaminas con especies reactivas genera derivados radicalares (*i.e.* radical ascorbilo y tocoferilo), sin embargo son radicales poco reactivos que no intervienen en reacciones de propagación y que pueden ser reducidos por glutatión o NADPH [68]. A su vez, el ascorbato actúa como agente reductor del radical tocoferilo, conformando un sistema que colabora en disminuir el daño oxidativo de las membranas celulares y lipoproteínas plasmáticas [69].

En el caso de los antioxidantes de origen endógeno, el glutatión cumple su rol principalmente a través del aporte de equivalentes de reducción a sistemas enzimáticos de reducción de especies reactivas (*e.g.* glutatión peroxidasa), además de participar de reacciones directas con especies reactivas (*e.g.* $\bullet NO_2$, $k=2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [70] o modificaciones oxidativas proteicas (*i.e.* ácidos sulfénicos derivados de tioles proteicos [46]).

El grupo de los agentes antioxidantes de alto peso molecular básicamente está conformado por enzimas que catalizan la reducción de estas especies con relativa especificidad. Previamente fue mencionado el ejemplo de las SODs como los principales agentes en la detoxificación de $O_2^{\bullet-}$. Sin embargo, ante

situaciones de sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$, la eficiencia de las SODs llevaría a un aumento en la concentración de estado estacionario de H_2O_2 , de no ser por la existencia de sistemas enzimáticos de reducción del mismo. La glutatión peroxidasa, la catalasa y las peroxiredoxinas son enzimas que reaccionan rápidamente con H_2O_2 (constantes de segundo orden entre 10^5 - $10^8 M^{-1}s^{-1}$, [3] por lo que están encargadas de la disposición final de estos oxidantes. Por otro lado, estas enzimas también participan en la reducción de especies reactivas del nitrógeno. Las peroxiredoxinas y glutatión peroxidasa catalizan la reducción por dos electrones de $ONOO^-$ a NO_2^- , con constantes de reacción de segundo orden entre 10^6 - $10^8 M^{-1}s^{-1}$, representando la vía de decaimiento de $ONOO^-$ más relevante en sistemas biológicos [45].

ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS EN EL DESARROLLO DE PATOLOGÍA HUMANA

Las especies reactivas producidas en condiciones fisiológicas cumplen roles importantes para la homeostasis, no obstante, cuando estas son producidas en exceso sus repercusiones pueden ser deletéreas. Dependiendo de su concentración y tiempo de exposición, así como de la capacidad de la célula para tolerar el desafío oxidativo, las especies reactivas pueden transformarse en promotoras del desarrollo y progresión de enfermedades. Por lo tanto, muchas de las patologías humanas más prevalentes han sido vinculadas a un incremento en la producción de especies radicalares y daño oxidativo celular. Así, las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno han sido relacionadas al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, metabólicas, neoplásicas [3, 71] y, particularmente, enfermedades cardiovasculares las cuales abordaremos a continuación.

ENDOTELIO, DISTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

Relevancia del endotelio vascular como modelo de estudio de fenómenos redox

El sistema vascular está compuesto por arterias, venas y capilares, los cuales presentan características anatómicas e histológicas particulares que les permiten cumplir con sus diferentes funciones. Los vasos de mayor calibre están conformados por tres capas o túnicas (desde el exterior hacia la luz): adventicia, media e íntima. La adventicia, está formada por tejido conjuntivo y aporta irrigación sanguínea e inervación a la pared del vaso. La túnica media, está compuesta principalmente por músculo liso y participa en la regulación del calibre vascular. La íntima o endotelio, está formada por una monocapa de células planas altamente especializadas con diversas funciones: regulación del calibre vascular y la presión arterial, adhesión leucocitaria y transporte. Es importante destacar que la función reguladora de tono vascular del endotelio depende de una especie reactiva, el $\bullet\text{NO}$. Como fue mencionado previamente, el $\bullet\text{NO}$ una vez sintetizado a nivel endotelial difunde hasta la túnica media, activa la enzima guanilato ciclasa y promueve la vasorrelajación, entre otros efectos. Por lo tanto, la función del endotelio es crítica para el sistema vascular y su compromiso tiene un rol preponderante durante el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

El endotelio vascular representa un objeto de estudio de relevancia para la bioquímica redox no solo porque es capaz de producir especies reactivas, como $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- , sino porque representa un ejemplo paradigmático del tránsito desde la producción fisiológica de estos agentes a estados de sobreproducción de los mismas, favoreciendo el desarrollo patologías (*i.e.* disfunción endotelial).

Mecanismos y repercusiones de la disfunción endotelial

La relación entre el estrés nitroxidativo y el desarrollo de enfermedad cardiovascular ha sido ampliamente estudiado, llevando a la acumulación de una extensa bibliografía sobre el rol patogénico de las especies reactivas [72-73]. La disfunción endotelial representa una situación en la cual el endotelio se caracteriza por la baja disponibilidad de $\bullet\text{NO}$ y representa una etapa inicial en la patogénesis de la aterosclerosis [27, 74]. El descenso en la disponibilidad de $\bullet\text{NO}$ ocurre como resultado de una serie de cambios funcionales: 1)

disminución en la síntesis de $\bullet\text{NO}$, debido a la presencia de dimetilarginina asimétrica (ADMA) un inhibidor de la eNOS; 2) desacople de la eNOS; 3) desvío del $\bullet\text{NO}$ mediado por $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figura 5). A su vez, como fue mencionado previamente esta última reacción lleva a la formación de ONOO^- , lo que promueve la disfunción endotelial a través de diferentes mecanismos tales como: 1) aumento en la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria; 2) estímulo de proliferación y migración de células musculares lisas; 3) inhibición de canales iónicos; 4) favorecimiento de la agregación plaquetaria; 5) inhibición enzimática de prostaciclina sintasa; 6) oxidación de tetrahydrobiopterina (BH_4) [72].

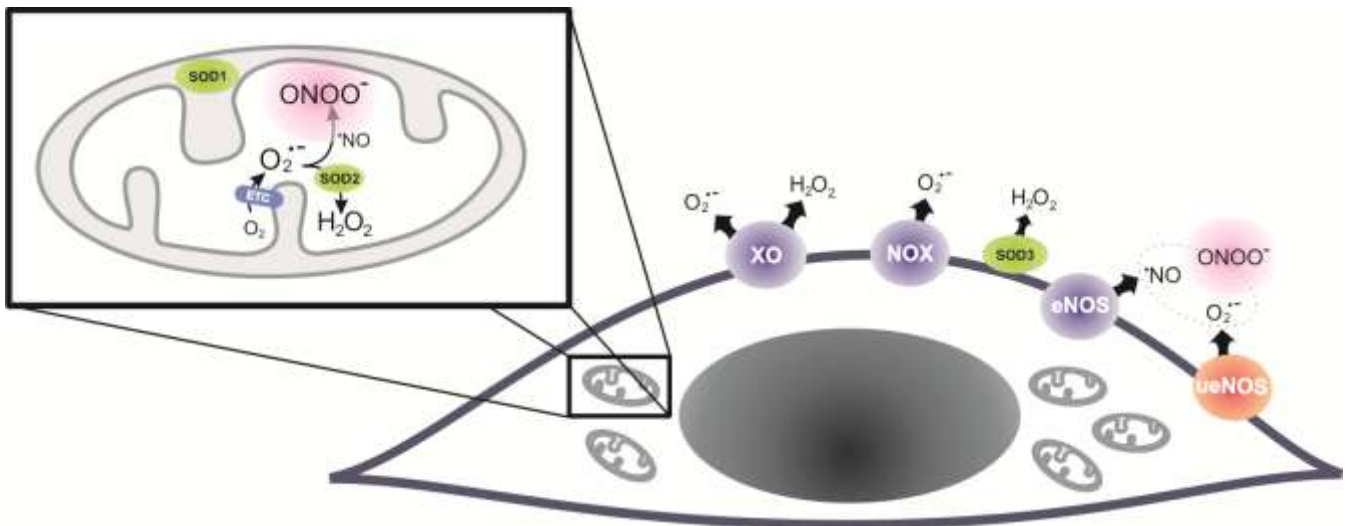


Figura 5. Principales fuentes de especies reactivas en células endoteliales. XO, xantina oxidasa; NOX, NADPH oxidasa; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; ueNOS, eNOS desacoplada; ETC, cadena de transporte de electrones, SOD1-3, superóxido dismutasa 1-3. Adaptado de [72]

Las modificaciones funcionales de las células endoteliales durante la disfunción endotelial, son el punto de partida para la formación de lesiones ateromatosas en la pared vascular. Básicamente, la aterosclerosis implica un proceso inflamatorio crónico, progresivo, de etiología multifactorial que involucra la

acumulación subintimal de partículas de lipoproteína de baja densidad (LDL), su oxidación y nitración, formación de células espumosas, liberación de citoquinas proinflamatorias, proliferación y migración de células musculares lisas de la pared arterial, depósitos de matriz extracelular, adhesión y agregación plaquetaria [72]. A su vez, la participación de ERN en el desarrollo de aterosclerosis ha sido apoyado por la evidencia de niveles elevados de 3-nitrotirosina, expresión de iNOS, LDL oxidada y nitrada en lesiones ateroscleróticas humanas [75-76].

Alteraciones de la función mitocondrial en la disfunción endotelial

La evidencia de biomarcadores de desbalance redox y alteraciones en la función mitocondrial en los tejidos de la pared vascular, son hallazgos tempranos en la historia natural de la aterosclerosis [77-81]. El estrés oxidativo del endotelio vascular tiene como resultado la aparición de: 1) aumento en los flujos de especies reactivas del oxígeno (*i.e.* $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2) [20, 23]; 2) aumento en la formación de $ONOO^-$, producto de la reacción del $^{\bullet}NO$ por el propio $O_2^{\bullet-}$, disminuyendo su biodisponibilidad; 3) inactivación de enzimas de defensa antioxidante (*i.e.* inactivación de MnSOD por nitración de tirosinas [82]; 4) aumento de cadenas de peroxidación lipídica en membranas celulares y partículas de LDL [83]; 5) acumulación de mutaciones en ADN mitocondrial, con disminución de la síntesis de complejos respiratorios y producción de ATP [84]; 6) alteración en mecanismos de dinámica mitocondrial con deficiencia en mitofagia [85]. A su vez, estos factores colaboran con la inducción de fenómenos inflamatorios en la pared arterial, los cuales amplifican el daño y promueven la progresión de las lesiones ateromatosas [78].

Aspectos redox del rol de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en la respuesta a oxidantes

En un contexto de estrés oxidativo, en el que la sobreproducción de especies reactivas desafía en gran medida a las defensas antioxidantes endógenas, es esperable que ocurran modificaciones sobre biomoléculas ajenas a vías

enzimáticas de reducción de oxidantes. Como fue mencionado previamente, la producción de ATP en células endoteliales proviene en su mayor parte de reacciones de fosforilación a nivel de sustrato (*i.e.* glucólisis), a diferencia de otros tejidos en los que la fosforilación oxidativa mitocondrial realiza un aporte crítico para la homeostasis celular [86-87]. En este sentido, resulta de interés estudiar los efectos del desbalance redox sobre una enzima particular del metabolismo energético endotelial, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

La GAPDH es la enzima glucolítica que cataliza la oxidación y fosforilación del D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP) a 1,3-bisfosfoglicerato utilizando al NAD^+ como aceptor de electrones. En su conformación nativa esta enzima se presenta como un tetrámero de subunidades idénticas de 37kDa, con cuatro cisteínas cada una. Una de estas últimas, aquella ubicada en la posición 152 en la GAPDH del humano (aunque esta posición puede variar en función de la especie considerada) [88], presenta algunas particularidades de importancia para la función de la enzima: 1) está situada en el sitio activo e interacciona con el GAP durante la catálisis; 2) por esta razón, es crítica para la actividad y su modificación oxidativa resulta en la inactivación de la enzima [89]; 3) presenta un pK_a menor al de otras cisteínas (*i.e.* $pK_a=5,5$) [90]; 4) es llamativamente reactiva contra peroxinitrito ($k=2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [91]) y H_2O_2 ($k \sim 5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [92]), por el contrario reacciona lentamente con $\bullet\text{NO}$ ($k=11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [91]); 5) la formación del correspondiente S-nitrosotiol favorece la inactivación de la enzima [93].

La oxidación reversible de tioles es un mecanismo habitual de regulación de enzimas redox sensibles [94], tanto en condiciones basales para el mantenimiento de la homeostasis celular, como en condiciones de estrés oxidativo en las que la oxidación mediada por especies reactivas se asocia al inicio de una respuesta adaptativa [95]. La GAPDH representa un ejemplo de este fenómeno. Como fue mencionado previamente, la cisteína del sitio activo presenta constantes de reacción relativamente altas con algunas especies reactivas (*e.g.* H_2O_2) en comparación con otras proteínas redox sensibles. A su vez, esta enzima presenta una concentración citosólica de aproximadamente $240 \mu\text{M}$ [96] (*i.e.* concentración de $\sim 1\text{mM}$ de cisteína del sitio activo),

transformándola en el principal blanco del H₂O₂ luego de las peroxidasas. En diferentes modelos celulares se ha evidenciado que la oxidación de esta cisteína crítica, resulta en la inhibición de la actividad enzimática. En consecuencia, ocurre un bloqueo del flujo de metabolitos a través de la glucólisis con el consiguiente redireccionamiento de los mismos hacia el ciclo de las pentosas fosfato [95]. Una mayor actividad en esta vía, en un ambiente de mayor flujo de oxidantes, tiene como objetivo aumentar la disponibilidad de NADPH quien actúa como fuente de equivalentes de reducción para los principales sistemas enzimáticos de reducción de especies reactivas (e.g. tioredoxina/tiorredoxina reductasa). En conclusión, la actividad de la GAPDH parece ser útil como biomarcador de la sobreproducción de oxidantes en modelos celulares de estrés oxidativo.

Albúmina sérica como biomarcador redox de relevancia biomédica

Además de las huellas moleculares generadas por la sobreproducción de especies reactivas a nivel celular, en el compartimiento intravascular también pueden encontrarse biomarcadores de este fenómeno. El estado de oxidación del grupo de tiol de la cisteína 34 de la albúmina sérica humana (HSA) ha sido propuesto como un reportero de daño oxidativo en diferentes condiciones patológicas [97]. Particularmente, en enfermedades cardiovasculares, se ha encontrado un aumento en la formación de disulfuros mixtos (*i.e.* HSA-Cisteína, HSA-Homocisteína, HSA-Glutatión) en individuos con insuficiencia cardíaca [98] o aterosclerosis [99]. Además, este incremento se ha vinculado al riesgo de mortalidad de causa cardiovascular en individuos en tratamiento sustitutivo con hemodiálisis por enfermedad renal crónica terminal [100].

La albúmina sérica bovina, de 583 aminoácidos con una homología de secuencia de 75,6% con respecto a la HSA (REF majorek 2012). La estructura está compuesta de tres dominios helicoidales que representan el 75% de la secuencia con 17 enlaces disulfuros conservados. Además, presenta un grupo tiol libre, en la cisteína 34, veintiuna tirosinas y tres triptofanos, los cuales van a ser relevantes para esta tesis debido a su potencial participación en reacciones redox. Al igual que la HSA es la principal proteína del plasma (*i.e.*

concentración en plasma de 35-50 g/l o 0,5-0,75 mM) y se encarga del mantenimiento de la presión coloidosmótica así como del transporte de diferentes ligandos: metales como calcio, magnesio, cobre y zinc; ácidos grasos, hormonas y fármacos (REF Belinskaia 2021).

Inducción de disfunción endotelial mediada por extracto de humo de tabaco

El rol del desbalance redox en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, queda evidenciado por su relación con uno de sus principales factores de riesgo, el tabaquismo. Las consecuencias redox provocadas por este hábito lo transforman en uno de los principales factores etiopatogénicos de la enfermedad cardiovascular [101-102].

De acuerdo a sus características fisicoquímicas podemos dividir al humo de la combustión del tabaco en dos fases, una fase gaseosa y otra particulada. La primera, presenta una composición química caracterizada por la presencia de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (*i.e.* $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet NO$, $\bullet NO_2$, $ONOO^-$), así como aldehídos reactivos y quinonas con actividad redox, entre otros [103]. En el caso de la fase particulada, a pesar de ser retenida en su mayor parte por los filtros disponibles en cigarrillos comerciales, compuestos con actividad redox (*e.g.* quinonas, semiquinonas) pueden escapar a esta barrera y alcanzar los tejidos [104].

Aportes de diferentes grupos de investigación, incluido el nuestro, han ayudado a entender el vínculo entre el tabaquismo y el desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis. Por un lado, se ha visto que la exposición de estructuras vasculares a extractos de humo de tabaco, se acompaña de alteraciones en la actividad vasodilatadora del endotelio vascular, en un fenómeno vinculado al aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno [23, 105]. En consecuencia, el aumento en el flujo de especies como $O_2^{\bullet-}$, resulta en una menor disponibilidad de $\bullet NO$ y un aumento en la formación de $ONOO^-$ [23], hechos que favorecen la aparición de un fenotipo disfuncional en el endotelio.

Por otro lado, utilizando técnicas no invasivas se ha podido registrar que individuos fumadores presentan menor vasodilatación arterial en respuesta a isquemia transitoria [23, 106]. A su vez, la suplementación de estos individuos con ascorbato y tocoferol resultó en una recuperación parcial de la función endotelial [23].

Conjuntamente con la alteración en la biodisponibilidad de $\bullet\text{NO}$ la exposición extractos de humo de tabaco (CSE) se ha relacionado con: disfunción mitocondrial [77, 107-108]; activación de vías proinflamatorias [109-110]; aumento de biomarcadores de daño nitroxidativo celular [23, 110], entre otras modificaciones celulares.

DETECCIÓN Y NEUTRALIZACIÓN DE RADICALES PROTEICOS POR ATRAPADORES DE ESPÍN

Numerosas reacciones químicas y enzimáticas son capaces de producir especies radicalares. Clásicamente, la detección e identificación de estos productos fue asistida mediante técnicas espectroscópicas como la espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR). Esta técnica se basa en la capacidad de especies paramagnéticas (*i.e.* moléculas con un electrón desapareado o ciertos estados de reducción de metales de transición) de absorber radiación electromagnética al ser expuestas a un campo magnético. Como resultado del barrido del campo magnético a una determinada frecuencia definida (*i.e.* microondas), se obtienen espectros de absorción característicos que dependen de la naturaleza de la molécula analizada. A su vez, la absorción de energía por parte del electrón desapareado está influenciada por su entorno. Entonces, la presencia de átomos vecinos con núcleos magnéticos (*e.g.* ^1H , ^{14}N , ^{13}C) determina el desdoblamiento de las señales de forma distintiva. Este fenómeno recibe el nombre de acoplamiento hiperfino y se ve condicionado por el espín nuclear del átomo que interviene. Por lo tanto, mediante EPR se pueden obtener patrones de señales que informan acerca de la estructura, conformación, entorno y movilidad de un radical [111].

Debido a la corta vida media de las especies radicalares, así como al límite de sensibilidad de la EPR en el entorno submicromolar (10^{-7} - 10^{-8} M), la capacidad de detección directa de especies radicalares es limitada. Por lo tanto, durante las últimas tres décadas diferentes estrategias dirigidas a aumentar la capacidad de detección de radicales han sido diseñadas, y el "atrapamiento de espín" es un ejemplo de éstas. Esta técnica, se fundamenta en el hecho de que la reacción entre un radical y un particular grupo de compuestos (denominadas agentes atrapadores de espín), conduce a la generación de aductos radicalares de mayor estabilidad que el radical original, permitiendo su detección. A su vez, como fue mencionado previamente el patrón de absorción registrado posibilita, en muchos casos, la identificación del radical generado.

Los agentes atrapadores de espín, como el 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) y N-*tert*-butilfenilnitrona (PBN), han sido ampliamente utilizados como sondas para la detección de especies radicalares en diferentes condiciones experimentales [112-115], con relevantes aportes de nuestro laboratorio en esta área [23, 115-118]. A su vez, esta técnica ha sido utilizada para la detección e identificación de radicales centrados en macromoléculas biológicas producidos durante reacciones radicalares o procesos enzimáticos [119-120].

Química de agentes atrapadores de espín

Los atrapadores de espín pueden clasificarse de acuerdo a sus grupos funcionales y los más habitualmente utilizados son del grupo de las nitronas ($R_1R_2C=NR_3^+O^-$, siendo $R_3 \neq H$). En esta tesis, se utilizaron dos atrapadores del grupo de las nitronas, por lo que a continuación se resumirá evidencia relacionada a los compuestos utilizados.

Como fue mencionado previamente, las nitronas actúan como moléculas capaces de reaccionar con especies radicalares llevando a la formación de un aducto radicalar. En el caso de las nitronas, los integrantes de este grupo presentan la ventaja de ser capaces de atrapar radicales derivados de una gran variedad de átomos (*i.e.* oxígeno, azufre, carbono y nitrógeno). Sin embargo, las constantes de reacción entre las nitronas y los diferentes radicales varían

en forma significativa. Por ejemplo, el DMPO reacciona rápidamente con $\bullet\text{OH}$ ($k=4,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [121]), radical tiilo de cisteína ($k=2,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [122]) y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ($k=2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [123]). Sin embargo, reacciona muy lentamente con $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($k=1,7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [124]), lo que determina que deban utilizarse altas concentraciones del atrapador para poder detectar el producto de esta reacción, el aducto radicalar DMPO-OOH. A su vez, este aducto decae rápidamente ($t_{1/2} \sim 1 \text{ min}$) a DMPO-OH, un aducto con mayor estabilidad ($t_{1/2} \sim 58 \text{ min}$), lo que dificulta aún más la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ [125]. La velocidad de decaimiento de los aductos radicalares depende de las condiciones de reacción así como de factores tales como pH, temperatura y presencia de metales o reductores.

Los aductos nitrona derivados del DMPO, pueden existir en tres formas redox: 1) nitróxido aducto radical, resultado del atrapamiento de un radical ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{NR}_3^{\bullet}\text{O}$); 2) el producto de la reducción univalente del aducto, una hidroxilamina ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{NR}_3\text{OH}$); o 3) el producto de su oxidación univalente, una nitrona ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{NR}_3^+\text{O}^-$) (Figura 6).

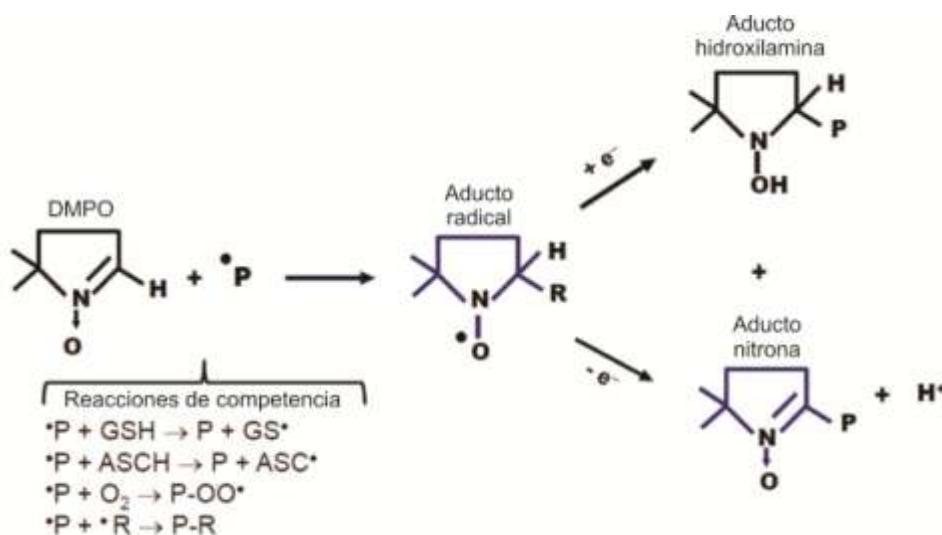


Figura 6. Formación de aductos proteína-DMPO. La formación del aducto nitrona ocurre luego de una primer reacción de atrapamiento del radical proteico por parte del DMPO, llevando a un producto radicalar que puede

seguirse por EPR. A continuación, este aducto es oxidado por un electrón conduciendo a un aducto nitrona, el cual puede ser detectado por immuno-spin trapping o espectrometría de masas. Adaptado de [126].

En el caso de la vía reductora del aducto nitróxido, reductores como ascorbato, tioles y algunas reductasas pueden facilitar la formación del derivado hidroxilamina. Sin embargo, esta reacción es fácilmente reversible a través de la acción de $O_2^{\bullet-}$, metales y O_2 , retornando el aducto a su forma radicalar original. Por el contrario, la vía oxidativa da lugar a un aducto nitrona termodinámicamente más estable, lo que facilita su detección posterior. Por ejemplo, cuando el aducto nitróxido se forma en hemoproteínas (e.g. hemoglobina) la actividad peroxidasa de la propia proteína cataliza esta reacción de oxidación [127].

Debido a que este producto de decaimiento no es radicalar, y por ende no paramagnético, se han desarrollado técnicas alternativas para su detección, principalmente para los aductos con macromoléculas (*i.e.* proteínas y ADN) [119-120]. La identificación del aducto macromolécula-nitrona provee información acerca del sitio en donde previamente existió un radical. Esta propiedad fue utilizada para desarrollar un anticuerpo específico contra aductos nitrona (“immuno-spin trapping”), permitiendo la detección selectiva de estos productos de oxidación, y el DMPO representa un ejemplo clásico de esta estrategia (Figura 7) [119]. El avance en técnicas inmunológicas para la detección de este biomarcador redox, ha permitido evidenciar sitios de formación de radicales proteicos en modelos animales de enfermedad tanto *ex vivo* [128] como *in vivo* [129].

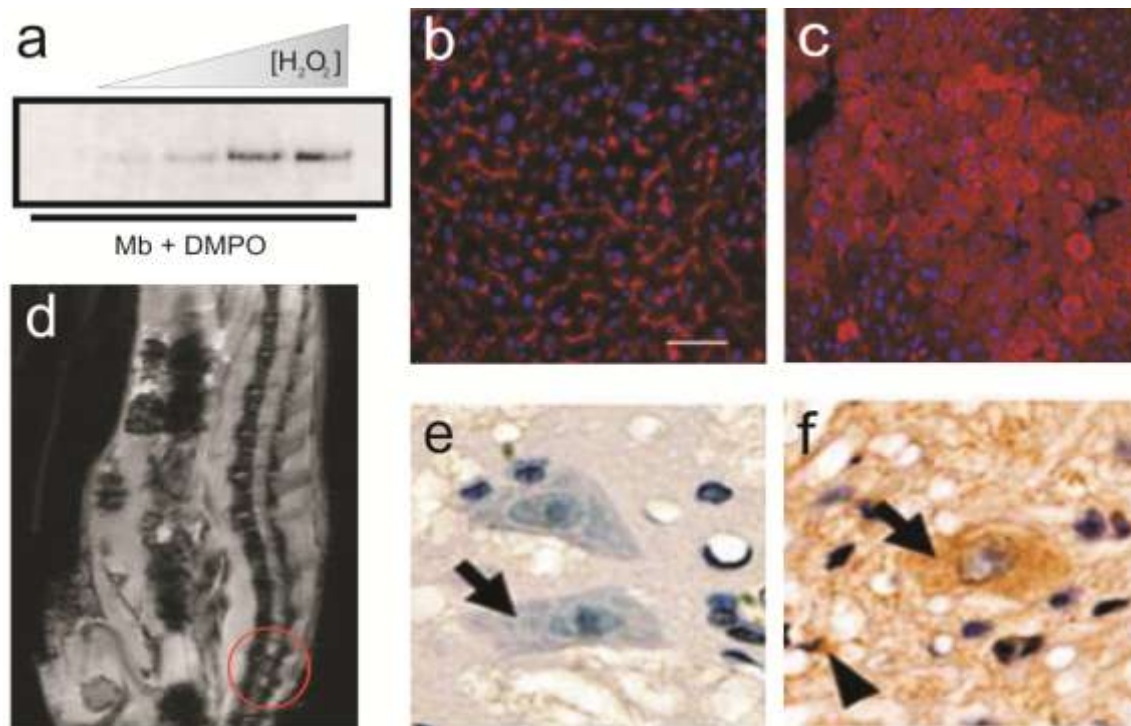


Figura 7. Detección de aductos DMPO-proteína mediante immuno-spin trapping. (a) Western blot de muestras de mioglobina expuesta a H_2O_2 , modificado de [130]; (b y c) Inmunohistoquímica de cortes de hígado en control y modelo animal de diabetes mellitus, respectivamente (aductos DMPO-proteína en rojo), modificado de [131]; (d) RNM de modelo animal de ELA administrado con anticuerpo antiDMPO- Gd^{3+} , (círculo rojo, área de aumento de intensidad en médula espinal), modificado de [129]; (e y f) Inmunohistoquímica de cortes de médula espinal de control y modelo animal de ELA, respectivamente (aductos DMPO-proteína en anaranjado), modificado de [128].

Concomitantemente, la capacidad de las nitronas de reaccionar con especies radicalares, llevó a su uso como compuestos protectores en modelos animales de enfermedades. En aquellos modelos en los cuales el daño oxidativo juega un rol central, diferentes nitronas han demostrado ser capaces de prevenir dicho daño y revertir sus consecuencias patológicas (Tabla 1). Por ejemplo, las nitronas han demostrado efectos protectores en modelos animales de isquemia-reperfusión cardíaca [132], diabetes mellitus inducida por fármacos [133], enfermedades neurodegenerativas [128], entre otros. A su vez, un compuesto de este grupo denominado NXY-059 (2,4-disulfofenil-N-tert-butilnitrona, derivado disulfonilado de PBN [134], llegó a ser testeado en

ensayos clínicos como potencial tratamiento para accidentes cerebrovasculares [135-136].

Tabla 1. Efectos protectores de las nitronas en estudios preclínicos y ensayos clínicos.

Compuesto	Modelo/ población	Situación patológica	Efecto	Referencias
DMPO	Rata	Isquemia-reperfusión en corazón aislado	Prevención de arritmias durante reperfusión y mejora de capacidad funcional residual	[132]
	Rata	Esclerosis lateral amiotrófica	Recuperación de función mitocondrial en médula espinal de animales SOD1 ^{G93A}	[128]
PBN	Ratón	Diabetes mellitus inducida por tóxicos	Prevención del daño pancreático inducido por estreptozotocina	[133]
	Rata	Glioma	Disminución de tamaño tumoral y capacidad de angiogénesis	[137]
NXY-059	Rata	Isquemia-reperfusión cerebral	Reducción en el área de infarto luego de reperfusión sanguínea	[134]
	Rata	Glioma	Reducción de volumen tumoral y modulación de alteraciones metabólicas tumoraes	[138-139]
	Humanos	Accidente cerebrovascular	No mostró beneficios	[136]

El efecto antioxidante de las nitronas, a nivel celular o tisular, inicialmente podría explicarse por la simple detoxificación de especies radicalares sobreproducidas por las células bajo condiciones patológicas. Sin embargo, hay algunas limitaciones desde el punto de vista cinético. Como fue mencionado previamente, el DMPO es capaz de reaccionar con diferentes radicales como $O_2^{\bullet-}$, $CO_3^{\bullet-}$, $\bullet OH$, entre otros. Sin embargo, estos reaccionan también de manera muy rápida con muchos componentes celulares, y por lo tanto para poder ejercer una competencia favorable el DMPO debería alcanzar niveles muy elevados en tejidos (~50-100mM [140-141]).

Tomando como ejemplo la cisteína, el $\text{CO}_3^{\bullet-}$ reacciona con una constante de $k=4,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [142], el $\bullet\text{OH}$ $4,7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [143], y $\text{O}_2^{\bullet-} < 15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [144]. Además, los radicales mencionados también pueden reaccionar con un enorme número de componentes celulares no polipeptídicos tales como ADN y lípidos de membrana. Como resultado de estas reacciones redox, se generan nuevos compuestos radicalares capaces de propagar el proceso a otras biomoléculas [145]. Dado que el DMPO puede formar aductos con radicales cisteinilo y tirosilo, este atrapador de espín puede impedir que éstos radicales proteicos oxiden otros aminoácidos.

Por lo tanto: 1) por las limitaciones cinéticas indicadas; y 2) por la evidencia de la reacción de DMPO con radicales proteicos *in vivo*; hipotetizamos que los efectos antioxidantes protectores de las nitronas no pueden ser explicados solamente a través de un simple atrapamiento de radicales libres, sino que su posible capacidad de cortar cadenas de oxidación proteica cumpliría un rol fundamental en el proceso.

HACINAMIENTO MOLECULAR

Los compartimientos celulares son espacios con particulares características fisicoquímicas, determinadas principalmente por la alta concentración de biomoléculas que poseen. Se estima que la concentración de macromoléculas a nivel de citosol es superior a los 300g/l [146], con aproximadamente 30-40% del volumen celular ocupado por proteínas o ácidos nucleicos (Figura 8) [147]. Este nivel de ocupación por parte de estas biomacromoléculas configura un ambiente caracterizado por el hacimiento y el confinamiento molecular. Ambas situaciones condicionan la presencia del fenómeno denominado efecto de volumen excluido dado por: 1) el desplazamiento del solvente intercurrente entre moléculas vecinas de soluto (hacinamiento); 2) el menor volumen efectivo en comparación al volumen de la solución debido a la alta concentración de especies [148].

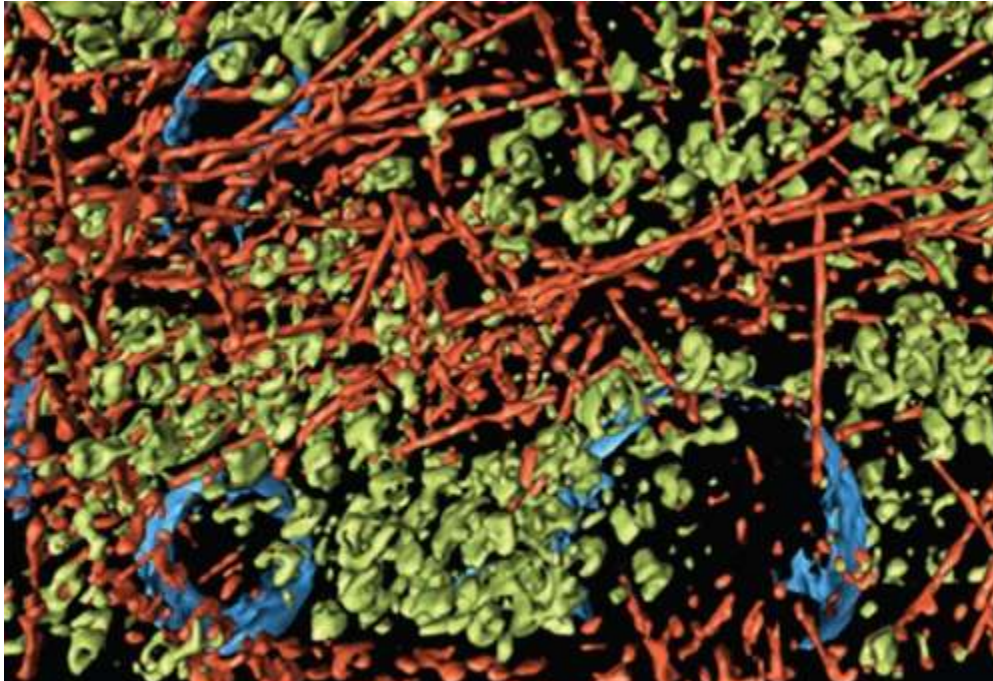


Figura 8. Visualización del hacinamiento molecular del interior celular. Reconstrucción realizada a partir de imágenes obtenidas mediante tomografía electrónica, que muestra la red de filamentos de actina (rojo); complejos macromoleculares, entre ellos ribosomas (verde) y membranas celulares (azul). Modificado de [147].

De esta manera, bajo estas condiciones las interacciones inespecíficas entre proteínas (*e.g.* electrostáticas o hidrofóbicas) ocurren con mayor frecuencia llevando a cambios en parámetros como difusión, estabilidad, conformación, actividad y asociación en comparación con ambientes diluidos [148]. Por esta razón, diferentes compuestos han sido utilizados para intentar reproducir *in vitro* las condiciones de hacinamiento presentes en el interior celular. Entre los compuestos mayormente utilizados podemos encontrar agentes poliméricos no biológicos (polietilenglicol, Ficoll, dextrano) o biológicos (BSA, β -lactoglobulina, lisozima). Como resultado de diferencias en tamaño y forma, así como en la capacidad de formación de interacciones débiles, estos agentes presentan importante variabilidad entre sí en cuanto a sus efectos sobre las macromoléculas hacinadas [148].

Por otro lado, el hacinamiento macromolecular al que están expuestas las proteínas presentes en el interior celular, determina un potencial favorecimiento de reacciones de oxidoreducción entre cadenas polipeptídicas vecinas debido a la elevada concentración "local" de grupos funcionales con actividad redox (e.g. residuos de cisteína, tirosina, entre otros). Sin embargo, las implicancias del hacinamiento molecular en el metabolismo redox no han sido estudiadas con profundidad.

En conclusión, podemos evaluar la posibilidad de que los efectos antioxidantes de los atrapadores de espín se deban a la interrupción de cadenas de oxidación proteica, producto de la consideración en conjunto de los siguientes aspectos:

- 1) El interior celular es un ambiente con una muy alta densidad de macromoléculas (>300 g/L). Este hacinamiento está lejos de parecerse a las condiciones *in vitro* en las cuales se llevan a cabo la inmensa mayoría de los estudios mecanísticos de reacciones redox. A su vez hay autores que proponen, aportando datos empíricos, que bajo estas condiciones las propiedades estructurales y cinéticas de diferentes proteínas pueden variar con respecto a lo demostrado previamente en condiciones no hacinadas [149-150].
- 2) Numerosas publicaciones, demuestran la transferencia electrónica intramolecular entre aminoácidos de una misma cadena peptídica [145, 151-152].

Entonces, teniendo en cuenta el alto nivel de compactación proteica en el interior celular, es posible plantear un mecanismo de oxidación análogo al concepto aplicado para la lipoperoxidación a nivel de membranas. De esta manera, planteamos que un radical centrado en un aminoácido de una proteína, puede abstraer un electrón de un aminoácido en otra cadena polipeptídica cercana, y éste propagar el efecto a otras proteínas, dando inicio a una cadena de oxidación proteica. La formación del aducto nitrona-proteína, podría determinar quizás, una pérdida de función de una proteína en particular, pero impediría la propagación del daño a otras cadenas polipeptídicas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la influencia del hacinamiento molecular como facilitador de la propagación de fenómenos oxidativos celulares, y su vínculo con la actividad antioxidante de los agentes atrapadores de espín

Objetivos específicos

I) Profundizar en la caracterización *in vitro* de los fenómenos de propagación radicalar del daño oxidativo proteico en un modelo de hacinamiento molecular

II) Estudiar en un modelo celular de daño oxidativo la propagación de modificaciones oxidativas y su repercusión funcional: rol antioxidante de agentes atrapadores de espín

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) fue comprado en Enzo life sciences (Farmingdale, EEUU). El peroxinitrito fue sintetizado y cuantificado en nuestro laboratorio [153] y el producto final contiene cantidades <20% de nitrito y 0% peróxido de hidrógeno. Además, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), carbón activado, 2-mercaptoetanol, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, MgCl₂, ionomicina, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), N-etilmaleimida (NEM), nitrito de sodio, cisteína, nitrato de sodio, N-*tert*-butilfenilnitrona (PBN), mioglobina de músculo esquelético de caballo, peróxido de hidrógeno, polietilenglicol 35000, sulfato amónico ferroso, Cu-Zn superóxido dismutasa, catalasa, trolox, 7-hidroxycumarina, dihidrorodamina 123, desferroxiamina, ácido hidroxifenilacético, ácido nitrohidroxifenilacético, azul de tripano, (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóleo bromuro, oligomicina, carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), antimicina A, rotenona, 5,5V,6,6V,-tetracloro-1,1,3,3V-tetraetilbenzimidazolilcarbocianuro ioduro (JC-1), 3-morfolinosisdonimina (SIN-1), ditiotreitól, 2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona (DMNQ), fueron comprados en Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU). El ácido cumarin-7-borónico y la fluoresceína boronato, fueron sintetizadas en nuestro laboratorio por la Dra. Natalia Ríos. El anticuerpo antiDMPO fue cedido por el Dr. Darío Ramírez.

La albúmina sérica bovina (BSA) también fue comprada en Sigma Aldrich (heat shock fraction, ≥98%) y presenta una relación 0,3 tiol/albúmina medida con ensayo de Ellman [154]. La delipidación y reducción de BSA alcanzó una relación tiol/albúmina de 0,8. La delipidación de la BSA fue realizada según protocolo reportado previamente [155]. Para ésto, la BSA fue incubada con carbón activado a pH 3 por una hora a 4°C, seguido de centrifugación y filtración. A su vez, la reducción de tioles fue realizada mediante la incubación de BSA 1mM con 2-mercaptoetanol 10 mM toda la noche a 4°C, a continuación se realizó purificación mediante gel filtración con una columna Sephadex G-25M para remover el exceso de reductor [155].

Todos los experimentos fueron realizados en amortiguador PBS (NaCl 138mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 17mM) con ácido

dietilentriaminopentaacético (DTPA) 0,1mM a 25°C and pH 7,4. Para la alquilación de BSA, BSA 1mM fue incubada con 10mM N-etilmaleimida (NEM) bajo agitación por 30 minutos a 25°C, luego el exceso de NEM fue removido por filtración.

Medidas de consumo de oxígeno

Soluciones de BSA (0,5–4,5 mM) fueron expuestas a 0,3 mM peroxinitrito y el consumo de oxígeno fue registrado en un oxímetro de alta resolución (Oroboros Inc., Austria). Para estudiar los efectos de la adición de nitrito de sodio (NaNO_2), cisteína (Cys), nitrato de sodio (NaNO_3) y PBN sobre el consumo de oxígeno, diferentes concentraciones de los compuestos fueron agregados luego del bolo de peroxinitrito. Para los experimentos en presencia de mioglobina (Mb), soluciones 0,1 mM de esta proteína fueron expuestas a 0,1 mM de peróxido de hidrógeno para producir radicales proteicos en ausencia o presencia de BSA y el consumo de oxígeno fue registrado.

El polietilenglicol 35000 (PEG) fue utilizado para generar efecto de exclusión de volumen en soluciones de BSA. Para prevenir la degradación térmica del PEG, lo que provoca la producción de radicales, todos los experimentos fueron realizados a 25°C [156].

La ocurrencia de reacciones radicalares a diferentes concentraciones de oxígeno en solución fue testada. Mediante el barboteo de argón en la cámara del oxímetro, se alcanzaron variadas concentraciones iniciales de oxígeno ($[\text{O}_2]_i$) bajo las cuales se realizó el agregado de bolos de peroxinitrito y el consumo de oxígeno fue registrado.

Estudios de quimioluminiscencia

Ensayos de emisión y registro de quimioluminiscencia fueron realizados con mioglobina de músculo esquelético de caballo 1mM expuesta a peróxido de hidrógeno 50mM en presencia de BSA (0,5 y 3mM). La señal quimioluminiscente fue registrada con un luminómetro de placas Lumistar

Galaxy por 30 minutos luego de la adición de H₂O₂. En ciertos experimentos, DMPO 20 mM fue agregado para interferir con la emisión de luminiscencia derivada de radicales proteicos.

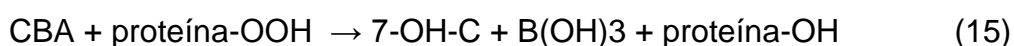
Espectroscopía de fluorescencia

Oxidación de residuos triptofano

Se realizaron registros emisión de fluorescencia para la detección de fenómenos de oxidación de residuos de triptófano ($\lambda_{ex}=295$ nm, $\lambda_{ex}=345$ nm). En estos experimentos fueron utilizadas bajas concentraciones de BSA para detectar cambios significativos en la fluorescencia correspondiente a dicho residuo luego de la exposición a oxidantes. En este caso, se evitaron las altas concentraciones ya que de lo contrario, la señal fluorescente del triptofano resulta atenuada (“quenching”). Por lo tanto, BSA 5 μ M fue incubada con Mb 10 μ M y H₂O₂ 2 mM, a continuación la fluorescencia del triptófano fue registrada. A su vez, la oxidación de triptófanos dependiente de radical hidroxilo fue estudiada a través de la incubación de BSA con flujos de \bullet OH generados mediante reacción de Fenton (sulfato amónico ferroso 300 μ M en presencia de DTPA 300 μ M y H₂O₂ 300 μ M) [123, 157].

Detección de hidroperóxidos proteicos

La sonda ácido cumarin-7-borónico (CBA) puede lenta pero cuantitativamente ser oxidada por hidroperóxidos derivados de aminoácidos y proteínas (7-24 M⁻¹s⁻¹) llevando a la formación de 7-hidroxycumarina (7-OH-C) la cual puede ser detectada por su señal fluorescente [158] (Ecuación 15):



Por lo tanto, BSA 3 mM fue tratada con bolos de peroxinitrito 0,5 mM, y luego de 3 minutos CBA 20 mM fue agregado y la producción de 7-OH-C fue seguida con un fluorímetro de placa Varioskan Thermo ($\lambda_{ex}=332$ nm, $\lambda_{ex}=450$ nm), en el

rango de tiempo lineal de la aparición de 7-OH-C. El retraso en la adición de CBA fue para prevenir la oxidación directa de CBA por peroxinitrito [159]. Se agregó DTPA para minimizar la descomposición de hidroperóxidos catalizada por metales, Cu-Zn superóxido dismutasa y catalasa para evitar la oxidación de la sonda por H₂O₂.

Por otro lado, se realizaron experimentos con el análogo hidrosoluble de la vitamina E, Trolox (9 mM), previo a la adición de CBA con el objetivo de reducir radicales peroxilo y disminuir la formación de hidroperóxidos proteicos.

El efecto de la concentración de oxígeno en la formación de hidroperóxidos proteicos fue evaluada en soluciones equilibradas con aire o barboteadas con argón (*i.e.* 250 y 30 μM oxígeno, respectivamente); CBA fue agregado durante la “fase 2” (ver Resultados) y la producción de 7-OH-C fue medida luego de 5 minutos de incubación. La estimación de los niveles de hidroperóxidos de proteínas fue basada en los cursos temporales de producción de 7-OH-C luego de 5 minutos de incubación. Debido a lo lento de la reacción, solo una fracción de los hidroperóxidos proteicos pueden ser detectados durante el tiempo del ensayo. Entonces, los valores absolutos de hidroperóxidos proteicos pueden ser obtenidos mediante la extrapolación a partir de curvas de formación de 7-OH-C en condiciones de velocidades iniciales, de la siguiente manera:

$$\frac{d[7\text{OH-C}]}{dt} = k [\text{CBA}][\text{proteína - OOH}] \quad (16)$$

Luego,

$$[\text{proteína - OOH}] = \frac{d[7\text{OH-C}]}{dt} \times \frac{1}{k [\text{CBA}]} \quad (17)$$

Esta aproximación fue validada realizando ensayos análogos con H₂O₂ a niveles de oxidación de CBA comparables a los producidos por los hidroperóxidos generados durante la oxidación proteica. Los hidroperóxidos fueron cuantificados usando una curva de calibración con estándar de 7-hidroxicumarina. El consumo de CBA durante los ensayos fue <10%.

Estudios con sondas fluorescentes redox sensibles

La dihidrorodamina 123 (DHR) es una sonda fluorescente que puede ser oxidada por reacción directa con diferentes radicales (e.g. $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\cdot\text{HO}$, $\cdot\text{NO}_2$) resultando en un compuesto fluorescente, rodamina [160-162]. En nuestros experimentos, soluciones de BSA 1 mM fueron tratadas con peroxinitrito 0,3 mM y luego de 3 minutos incubación se les adicionó DHR 20 μM . A continuación, la producción de rodamina ($\lambda_{\text{ex}}=485$ nm, $\lambda_{\text{em}}=530$ nm) fue medida con un fluorímetro de placa Varioskan Thermo. El retraso en la adición de DHR es crítico para evitar la oxidación de la sonda mediada por radicales derivados de la descomposición de peroxinitrito [160]. Además, realizamos experimentos en presencia de agentes que aumenten (NaNO_2 , produce $\cdot\text{NO}_2$ a través de su oxidación por ROO^{\cdot}), o disminuyan (desferroxiamina 0,5 mM, la cual consume $\cdot\text{NO}_2$) los niveles de $\cdot\text{NO}_2$ para establecer el rol de este radical en la oxidación de la sonda [163].

Espectroscopía de resonancia paramagnética

Soluciones de BSA 3 mM fueron tratadas con un bolo de peroxinitrito 0,6 mM y luego de 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, el atrapador de espín PBN fue agregado a una concentración final de 50 mM. Luego de la adición del atrapador, la mezcla de reacción fue transferida a una celda plana y el espectro registrado con un espectrómetro Miniscope MS400 (Magnettech, Alemania) operando a temperatura ambiente (25°C). Los parámetros utilizados fueron modulación=0,2 mT, atenuación de MW 10 dB, tiempo de barrido=60 s, rango de barrido=10 mT, $B_0=337$ mT y se acumularon 8 espectros.

Detección de ácido 3-nitro-hidroxifenilacético por LC-MS/MS

Soluciones de BSA 3 mM fueron expuestas a 0,3 mM peroxinitrito (o peroxinitrito previamente sometido a descomposición en amortiguador PBS, “adición reversa”, $\text{ONOO}^-_{\text{RA}}$) y luego de 3 minutos de incubación ácido *p*-hidroxifenilacético (*p*HPA) fue agregado. Luego, la mezcla de reacción se mantuvo a 25°C por 30 minutos. A continuación, las proteínas fueron precipitadas agregando acetonitrilo a una concentración final de 50% v/v y

mantenidas a 4°C por 30 minutos, luego las muestras fueron centrifugadas a 20000g por 30 minutos. El sobrenadante fue separado, concentrado bajo vacío y resuspendido en agua deionizada. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta performance (Infinity 1260, Agilent, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido triple-cuadrupolo trampa lineal (QTRAP4500, ABSciex, EEUU). Soluciones estándar de *p*-HPA y NO₂ *p*-HPA fueron empleadas para desarrollar el método de separación en una columna de fase reversa (Prodigy ODS(2) 5 mm, 150x2,0 mm (Phenomenex, EEUU) y optimizar los parámetros de la espectrometría de masas.

El método optimizado involucra una separación isocrática empleando 25% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico en agua deionizada como fase móvil a 200 mL/min. El voltaje del electrospray y potencial de "declustering" fueron configurados a 4,5 kV y 30 V, respectivamente, y temperatura de la fuente fue de 400°C. Análisis de monitoreo de reacción múltiple (multiple reaction monitoring, MRM) fue aplicado para la detección de pequeñas cantidades de NO₂-*p*HPA, las transiciones usadas fueron 196/122, 196/46 y 196/152 m/z. Para el análisis de patrones de fragmentación el espectrómetro fue configurado en modo de ion producto. El ion precursor fue 196 m/z, la energía de colisión fue de 30 V y el rango de masas entre 40-200 Da a 200 Da/s. Los datos fueron adquiridos usando el software Analyst 1.6.2 (ABSciex) y analizados usando PeakView 2.1 (ABSciex).

Cultivos celulares

Todos los experimentos que implicaron cultivos celulares fueron realizados utilizando cultivos primarios de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) (Genlantis, EEUU). Los cultivos fueron mantenidos siguiendo recomendaciones del proveedor, en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, incubadas a 37°C y 5% de CO₂. La noche previa a los diferentes experimentos los cultivos fueron incubados con medio DMEM suplementado con 0,4% suero bovino fetal [20].

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteínas fue medida a través del método del ácido bicinconínico (BCA). Brevemente, 25 µL de las muestras se mezclaron con 200 µL de solución de BCA y CuSO₄, se incubaron a 37°C por 30 min y se midió la absorbancia a 562 nm.

Preparación de extracto de humo de tabaco

El extracto de humo de tabaco (CSE) fue preparado según protocolo previamente reportado [164]. Para su preparación se utilizó un dispositivo de vacío de tipo Venturi, de forma que el humo generado por la combustión de tres cigarrillos convencionales (Marlboro, Phillips Morris Int) fuera barboteado en 30 mL de DMEM sin rojo fenol ni SFB, bajo agitación continua. Esto permite la solubilización de los compuestos hidrosolubles presentes en el humo de tabaco. El vacío fue regulado de forma tal que la combustión de cada cigarrillo ocurriera durante 5 minutos. Posteriormente la solución obtenida fue esterilizada a través de un filtro de 0,22 µm, alicuotada y congelada a -20° C hasta su utilización.

Ensayo de viabilidad celular

Con el objetivo de estudiar el impacto sobre la viabilidad celular de diferentes tratamientos se utilizaron dos ensayos. Por un lado, se evaluó la viabilidad celular utilizando tinción con Trypan Blue, compuesto para el cual la membrana celular es impermeable por lo tanto la célula viable es capaz de excluir la tinción. Los resultados son expresados relativos a la condición control. El segundo ensayo de viabilidad celular utilizado es un ensayo colorimétrico basado en el clivaje de la sal de tetrazóleo (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóleo bromuro (MTT) catalizado, en células viables, por NADPH oxidorreductasas generando un producto insoluble (*i.e.* formazán) el cual puede cuantificarse por espectrofotometría. Por lo tanto, el nivel detectado de formazán se correlaciona directamente con el número de células viables. Los resultados son expresados como porcentaje de la condición control.

Estudio de metabolismo energético celular

Se estudió el impacto de la exposición a peroxinitrito sobre la actividad glucolítica, de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa mitocondrial. Para ésto se realizaron experimentos con cultivos de BAEC en un analizador Seahorse XF (Seahorse, Agilent, EEUU). En estos ensayos los cultivos son expuestos a diferentes compuestos que modulan la actividad de la cadena de transporte de electrones: oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, complejo V), carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, ionóforo de protones que actúa como agente desacoplante), antimicina A (inhibidor de ubiquinol-citocromo c reductasa, complejo III), rotenona (inhibidor de NADH:ubiquinona oxidorreductasa, complejo I). El efecto de la adición de estos agentes es medido cuantificando el consumo de oxígeno remanente por parte del cultivo luego del agregado de cada uno.

Por otro lado, se cuantifica el pH del medio de manera continua y se calcula, a partir de estos valores, la velocidad de acidificación del medio. Como resultado de la inhibición de la cadena respiratoria producto de la exposición a los inhibidores, el piruvato producido por la glucólisis se deriva a la vía fermentativa y aumenta la producción de lactato. Por esta razón, la acidificación del medio provocada por los inhibidores agregados durante el ensayo, será un indicador indirecto del aumento compensatorio de actividad de la vía glucolítica.

Para el análisis de los datos se consideró al consumo de oxígeno registrado luego de la adición de antimicina A y rotenona como consumo no mitocondrial por lo que fue descontado del resto de los valores. A su vez, los datos crudos fueron normalizados de acuerdo a la concentración de proteína de cada condición cuantificada mediante ensayo de ácido bicinonínico. Para los estudios de función mitocondrial remanente luego de la incubación con CSE, los cultivos fueron tratados durante la noche con medio de cultivo suplementado con CSE 20 o 30%. En cambio, en el modelo de daño inducido por flujos de ONOO^- los cultivos fueron incubados durante 2 horas con SIN1 100 μM , en presencia o ausencia de DMPO 100 μM o PBN 100 μM .

Ensayos de medida de potencial transmembrana con JC-1

El potencial transmembrana mitocondrial fue evaluado mediante la sonda 5,5V,6,6V,-tetracloro-1,1,3,3V-tetraetilbenzimidazolilcarbocianuro ioduro (JC-1), la cual es utilizada como marcador semicuantitativo del potencial transmembrana. Esta es una sonda catiónica, pero con alta lipofilicidad, por lo que fácilmente atraviesa la membrana mitocondrial y se acumula en la matriz en función del potencial existente. A concentraciones bajas, la sonda se mantiene en forma monomérica (λ_{Ex} máximo = 488 nm λ_{Em} máximo = 530 nm), en cambio cuando su concentración aumenta forma dímeros reversibles determinando un corrimiento en su espectro de emisión de fluorescencia (λ_{Ex} máximo = 488 nm λ_{Em} máximo = 590 nm). Por lo tanto, se utiliza la relación entre ambas señales (*i.e.* 590 nm/530 nm) como indicador del estado del potencial electroquímico transmembrana. En nuestros experimentos, cultivos de BAEC fueron incubados a CSE 30% durante 20 horas a 37°C, luego incubadas con JC-1 en DMEM por 20 min a 37°C. A continuación, la fluorescencia fue registrada en un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon).

Registro de desacoplamiento de eNOS

Para evaluar el desacople de eNOS inducido por peroxinitrito, cultivos de BAEC fueron expuestos a SIN1 (100 μ M) e incubados durante la noche a 37°C (14-16hs). En el caso de las condiciones DMPO y PBN, los cultivos fueron pretratados con DMPO (100 μ M) o PBN (100 μ M) previo a la adición de SIN1. Al día siguiente, los cultivos fueron lavados con buffer dPBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,45 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂ 0,5 mM, glucosa 5,5 mM; L-arginina, 1 mM), se precargaron con fluoresceína boronato (50 μ M) por 30 minutos y luego se agregó ionomicina (4 μ M) para estimular la actividad de la eNOS. La oxidación de la sonda fue seguida mediante espectroscopia de fluorescencia (λ_{ex} =492 nm, λ_{em} =515 nm) utilizando un lector de placas (Varioskan, Thermo).

Actividad gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Cultivos de BAEC fueron mantenidos hasta alcanzar confluencia y luego privados de SBF (0,4% SBF en medio de cultivo) la noche previa al ensayo. El día del ensayo las células fueron preincubadas según correspondiera con vehículo (DMSO), PBN o DMPO 100 μ M en buffer dPBS por 30 minutos en condiciones iguales a las de cultivo. Luego, se cambia el amortiguador para retirar el exceso de atrapadores de espín y se agrega SIN1 (100 μ M) y se mantiene bajo las mismas condiciones por 2 horas. A continuación las células fueron levantadas con tripsina-EDTA, centrifugadas en medio de cultivo con SBF 10% para inhibir la actividad proteasa y resuspendidas en buffer de lisis (PBS diluido 10 veces) y sonicadas para maximizar la recuperación de GAPDH. Por último, la fracción citosólica fue obtenida a partir de la centrifugación del lisado a 100000g a 4°C por 30 minutos [165]. La concentración final de proteína fue medida utilizando el ensayo de ácido bicinónico.

La medida de actividad de GAPDH fue realizada siguiendo la reducción de NAD^+ mediante espectrofotometría. El ensayo fue realizado en Tris-HCl 50 mM pH 8,5 incluyendo NAD^+ 0,25 mM, arsenato 10 mM, gliceraldehído-3-fosfato 0,5 mM, en ausencia o presencia de ditioneitol (DTT) 0,1 mM. La reacción fue mantenida a temperatura ambiente y la aparición de NADH fue seguida espectrofotométricamente a 340 nm por 15 minutos [91].

Detección de aductos DMPO-proteína por immuno-spin trapping

Para la detección de aducto DMPO-proteína cultivos de BAEC fueron precargados con DMPO 100 μ M durante 15 minutos. Luego, se realizó un lavado con PBS y se inició la incubación con SIN1 a diferentes concentraciones en dPBS pH 7,4 por 2 horas. A continuación, las células fueron levantadas con tripsina, centrifugadas, resuspendidas en buffer de lisis (PBS + tritón 0,1%) y guardadas a -20 °C para posterior análisis. Para el westernblot se realizó SDS-PAGE de lisados celulares, con posterior transferencia húmeda a membrana de nitrocelulosa. El bloqueo fue realizado con PBS + leche 3%, la incubación del anticuerpo policlonal de gallina antiDMPO-proteína (producido y cedido por el Dr. Darío Ramírez) fue realizada en el mismo medio con la adición de 0,5 % tween durante la noche. Luego, se utilizó una solución 1/15000 de anticuerpo

secundario de cabra antigallina conjugado con fluoróforo infrarrojo ($\lambda_{Em}=680$ nm) (Licor Inc) y se incubó la membrana durante la noche a 4°C. El revelado se realizó utilizando un sistema de adquisición de imágenes Odyssey (Licor). Para la detección de aductos DMPO-proteína en cultivos de BAEC expuestos a DMNQ, las células fueron incubadas durante 24hs con medio de cultivo completo suplementado con DMNQ 5 μ M en ausencia o presencia de DMPO 10 mM. A continuación, se prepararon lisados celulares totales que fueron analizados mediante SDS-PAGE y westernblot.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron representados como media \pm DE y fueron analizados mediante test de Student, ANOVA de una y dos vías seguido de test Bonferroni, utilizando programa GraphPad Prism (GraphPad, EEUU). $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los resultados presentados corresponden a tres experimentos independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN DE FENÓMENOS DE PROPAGACIÓN RADICALAR Y DAÑO OXIDATIVO PROTEICO EN CONDICIONES DE HACINAMIENTO MOLECULAR

Como primer objetivo de esta tesis nos plantemos el estudio de cadenas de propagación de reacciones redox en modelos proteicos *in vitro* de ambientes hacinados.

Iniciación de reacciones radicalares proteicas por radicales derivados de peroxinitrito

Con el objetivo de estudiar la formación de cadenas de propagación radicalar en ambientes hacinados, comenzamos evaluando el efecto de la concentración en soluciones de BSA ante la exposición a bolos de peroxinitrito, una fuente de especies oxidantes por uno o dos electrones.

El peroxinitrito es un compuesto no radicalar que puede participar en reacciones de oxidación por dos electrones pero también, de manera indirecta, en oxidaciones por un electrón debido a la producción de especies radicales como resultado de su homólisis (*i.e.* $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$) [39]. Cuando estas últimas son generadas en presencia de blancos moleculares con alta reactividad, como las cadenas laterales de residuos aminoácidos en una proteína, es muy probable que ambos reaccionen con la consiguiente formación de radicales centrados en aminoácidos [166]. A su vez, en presencia de oxígeno, algunos de estos radicales, pueden reaccionar con este gas dando lugar a la formación de radicales peroxilo proteicos [167]. De esta manera, el registro de consumo de oxígeno en nuestras condiciones experimentales representa una prueba indirecta de reacciones de oxidación de aminoácidos. Por lo tanto, decidimos comenzar el estudio de estos fenómenos de propagación mediante el registro del consumo de oxígeno en nuestra mezcla de reacción.

En estos experimentos encontramos que la exposición de soluciones de BSA a bolos de peroxinitrito inició reacciones de consumo de oxígeno que mostraron un comportamiento bifásico. En etapas iniciales de la reacción, encontramos niveles de consumo de oxígeno alto pero de manera transitoria (<1 minuto). Luego, el nivel de consumo descendió pero se mantuvo estable por mayor tiempo (>10 minutos). Para facilitar el análisis, de aquí en adelante llamaremos fase 1 a la primer etapa y fase 2 a la segunda (Figura 9a).

La fase 1 refleja reacciones de radicales derivados de peroxinitrito con BSA seguido del consumo de oxígeno por parte de los radicales proteicos generados. La alta reactividad de estos grupos, en conjunto con la alta concentración local, determina que las especies radicalares reaccionen entre sí llevando a la formación de productos no radicalares (reacciones de terminación). De esta manera, la reducción en la concentración de especies radicalares explica la caída registrada en el consumo de oxígeno para esta fase 1. En cambio, la fase 2 la cual se vuelve evidente cuando la fase 1 ha finalizado prolonga el consumo de oxígeno a tiempos en los que el peroxinitrito se ha descompuesto totalmente (*i.e.* cerca del 100% luego de 10 segundos a 25°C y pH 7,4 [168], evidenciando una fase de propagación de reacciones radicalares. Probablemente, las principales reacciones responsables de ambas fases son iniciadas simultáneamente pero el alto consumo de oxígeno de la fase 1 enmascara inicialmente los eventos de la fase 2 luego de la adición de peroxinitrito. Este comportamiento recapitula resultados previos de nuestro grupo sobre la reacción de peroxinitrito con tioles y sulfuro de hidrógeno [169-170].

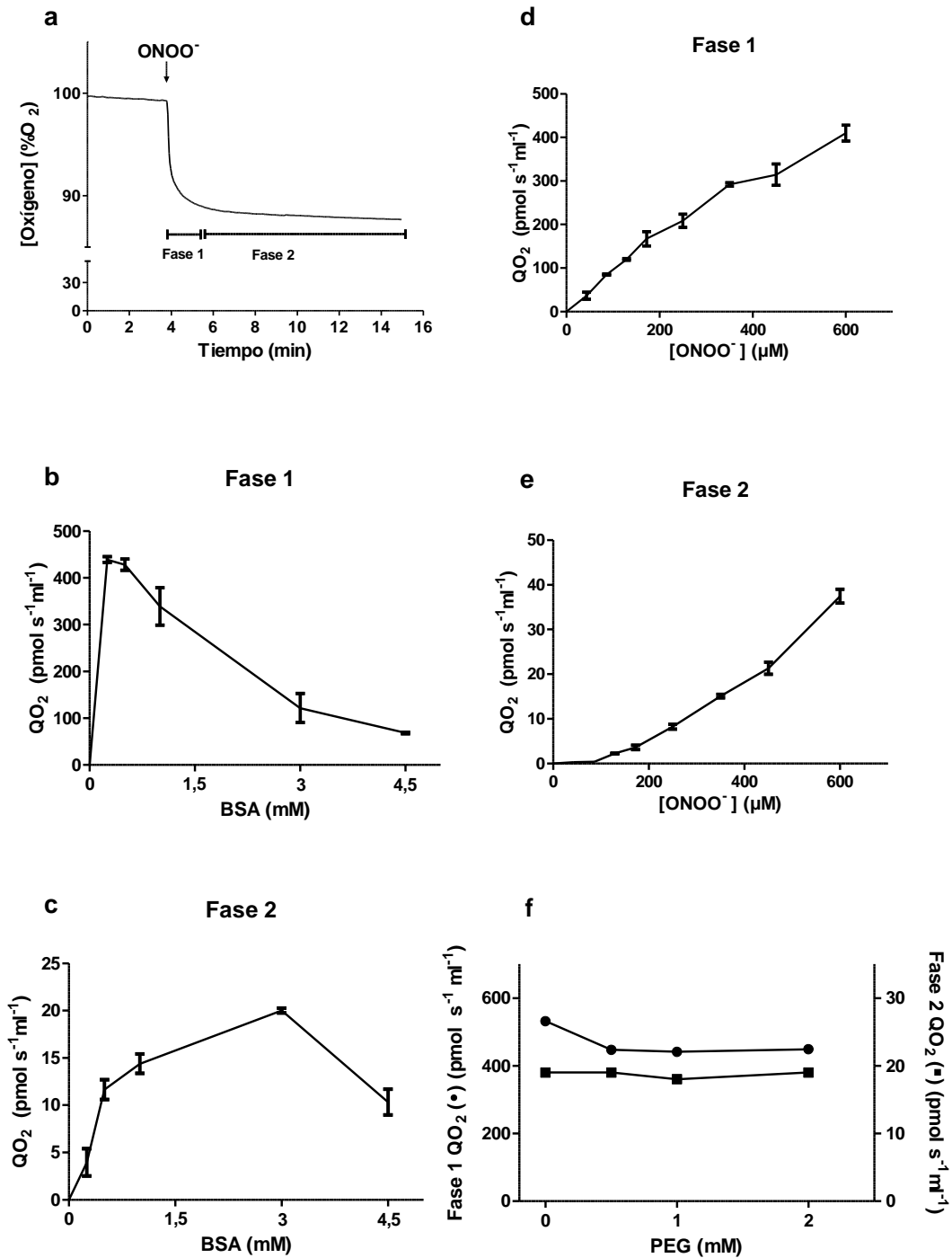


Figura 9. Consumo de oxígeno concentración dependiente inducido por peroxinitrito. En a, registro primario de consumo oxígeno de BSA (3 mM) disparado por la adición de peroxinitrito (0,3 mM) mostrando el comportamiento bifásico mencionado. En b y c, muestran el efecto de la concentración de BSA sobre el consumo de oxígeno (QO₂) luego de la adición de peroxinitrito para las fases 1 y 2, respectivamente. En d y e, muestran el efecto de la concentración

de peroxinitrito sobre QO₂ para fase 1 y 2, respectivamente. En f, efectos de PEG sobre QO₂ para fases 1 (●) y 2 (■) (Media ± DE).

Con respecto al efecto de la concentración de proteína sobre el consumo de oxígeno, encontramos resultados diferentes sobre ambas fases. El consumo de fase 1 disminuyó en función del aumento de concentración de BSA (Figura 9b) mientras que la fase 2 muestra una dependencia tipo campana (Figura 9c). Por el contrario, registramos una relación directa entre el consumo de ambas fases y la concentración inicial de peroxinitrito (Figuras 9d y 9e).

La constante de reacción de BSA con peroxinitrito es de $5020 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [153] mientras que la homólisis de peroxinitrito catalizada por protón es de $0,9 \text{ s}^{-1}$ [168]. En estas condiciones, por ejemplo, 1 mM de BSA sería responsable de >90% de consumo de peroxinitrito, principalmente resultando en productos no radicalares a través de oxidaciones por dos electrones de cisteínas, metioninas y triptofanos [166] resultando que <10% sufra homólisis. Concentraciones crecientes de BSA van a concomitantemente reducir la contribución de la homólisis y, en consecuencia, la iniciación de reacciones en la proteína por parte de radicales libres. Ésta es la principal causa de los resultados de la Figura 9b. Sin embargo, la fase 2 parece depender no solamente de la producción de radicales proteicos sino también de la capacidad de propagación a moléculas vecinas. Entonces, solo a altas concentraciones de BSA (cuando la homólisis se vuelve marginal) la fase 2 es atenuada.

La máxima concentración de BSA (4,5 mM) fue utilizada considerando que la concentración total de macromoléculas en compartimientos celulares fue propuesto que se ubica en torno de 300-400 g/l [171]. Debido a que el ácido peroxinitroso se descompone rápidamente ($t_{1/2} = 0,53 \text{ s}$ a 25°C y pH 7,4 [168], el evidenciar el consumo de oxígeno de minutos de duración documentado durante la fase 2 sugiere la formación continua de radicales peroxilo en ausencia de peroxinitrito o sus radicales derivados. A su vez, el consumo de oxígeno observado también se incrementó con la concentración de peroxinitrito, sugiriendo que la concentración de ambos, peroxinitrito y BSA, juega un rol importante en el fenómeno observado.

En un experimento control, utilizamos un agente de hacinamiento no peptídico como el polietilenglicol (PEG), para estudiar el impacto de agregar a la mezcla de reacción un compuesto menos reactivo que la BSA. Los resultados de este experimento mostraron que el agregado de PEG solo modificó parcialmente la respuesta de BSA a peroxinitrito. Además, la exposición de PEG 1 mM a peroxinitrito, en ausencia de BSA, resultó en un consumo de oxígeno de fase 1 significativo (presumiblemente por oxidación de polietilenglicol dependiente de $\cdot\text{OH}$, [172], pero no en reacciones de fase 2, sugiriendo la falta de reacciones de propagación (Figura 9f).

Por lo tanto, concentraciones crecientes de polietilenglicol no aumentaron el oxígeno consumido en las reacciones iniciadas por peroxinitrito en presencia de BSA (Figura 9f), sugiriendo que el efecto de exclusión de volumen no es suficiente *per se* para promover la propagación en cadena de reacciones radicalares. El oxígeno consumido durante la fase 2, en los experimentos con BSA, se debe a la reacción del oxígeno molecular con radicales proteicos con la formación de radicales peroxilo. Entonces, en ambientes hacinados como los compartimientos celulares, la reacción de radicales peroxilo derivados de aminoácidos con aminoácidos vecinos debería estar favorecida, resultando en la propagación de reacciones de oxidación, algunas de las cuales pueden ser intramoleculares y otras intermoleculares.

Propagación intermolecular de radicales centrados en proteínas

El estudio de la propagación intermolecular de radicales proteicos entre cadenas polipeptídicas fue profundizado utilizando un protocolo experimental diferente. En lugar de utilizar peroxinitrito como fuente de especies radicalares, generamos radicales proteicos mediante la reacción entre metamioglobina y H_2O_2 . Cuando la metahemoglobina (metMb) es expuesta a H_2O_2 , cataliza la reducción de este último resultando en la oxidación del átomo de hierro a un complejo oxo-ferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) y de cadenas laterales de ciertos aminoácidos a su radical correspondiente [173]. Para la mioglobina, ha sido reportada la

formación de radicales tirosilo y triptofanilo, los cuales son capaces de reaccionar con oxígeno para formar radicales peroxilo [174-175]. La formación de un radical peroxilo en residuos de triptofano, puede resultar en el clivaje oxidativo del grupo indol con la consiguiente emisión de quimioluminiscencia [176-177]. Por lo tanto, estos fenómenos fueron utilizados para generar y detectar la formación de radicales proteicos.

En nuestros experimentos, hicimos reaccionar metMb con H_2O_2 en presencia de diferentes concentraciones de BSA, con el objetivo de estudiar la capacidad de este sistema de propagar especies radicalares entre diferentes cadenas polipeptídicas. Por lo tanto, metMb y H_2O_2 fueron agregados a soluciones de diferente concentración de BSA y se registraron diferentes parámetros con el objetivo de registrar indirectamente la formación de radicales peroxilo y la ruptura oxidativa de la cadena lateral de residuos de triptofano: a) emisión de quimioluminiscencia; b) emisión de fluorescencia y c) consumo de oxígeno.

Con respecto al registro de quimioluminiscencia, la reacción entre metMb con H_2O_2 lleva a la emisión de una señal de bajo nivel. Sin embargo, observamos que la presencia de BSA resultó en un incremento en la luminiscencia registrada (Figura 10a). Este hallazgo sugiere que la presencia de cadenas polipeptídicas vecinas facilita la formación de nuevos radicales en estas cadenas, a través de la sustracción de electrones de residuos aminoácidos. Además, encontramos que este fenómeno se incrementó en función de la concentración de BSA utilizada, sugiriendo que a mayor concentración de esta, ocurre una mayor oxidación de residuos aminoácidos (*i.e.* triptofano) y por lo tanto una mayor propagación de reacciones radicalares en cadena.

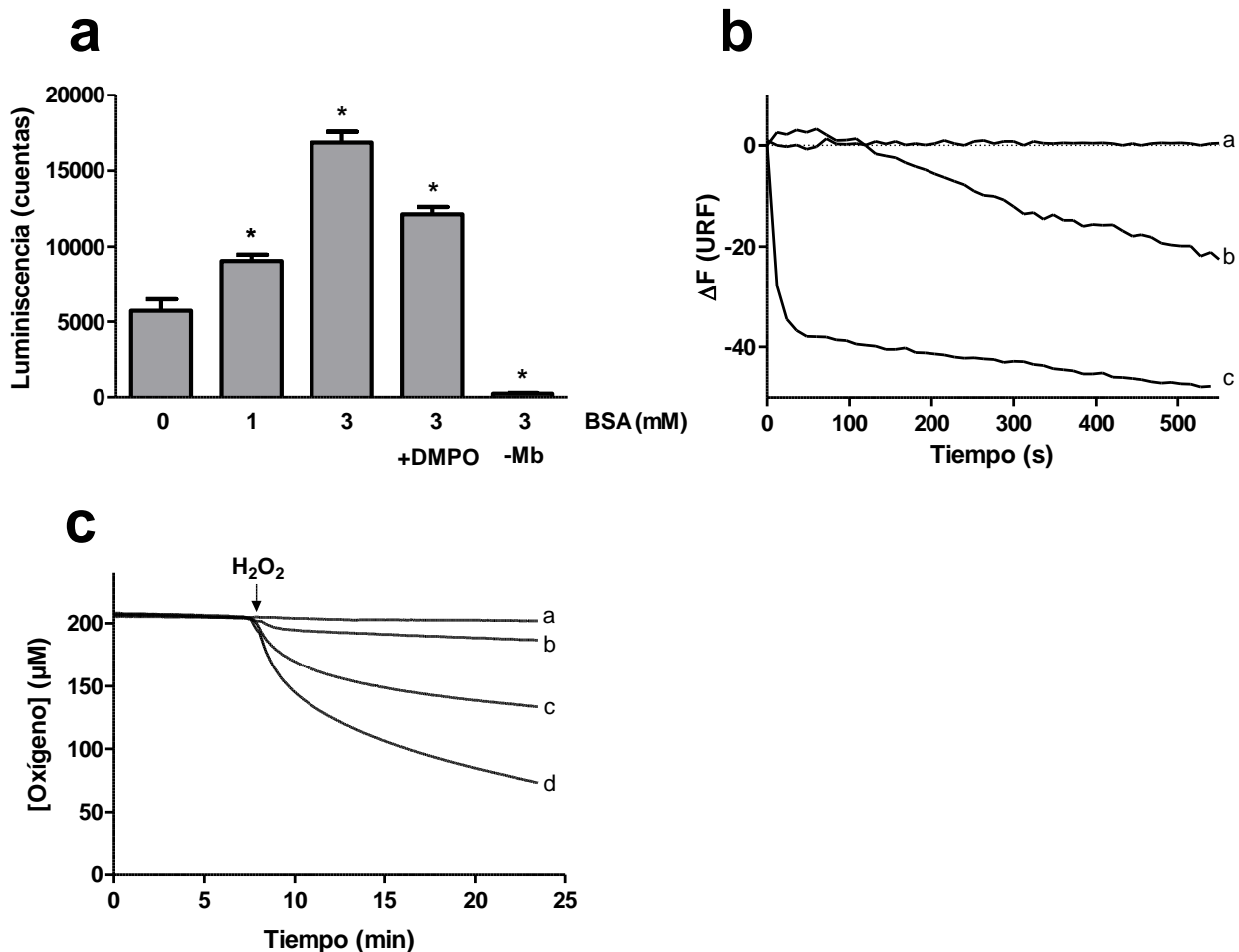


Figura 10. Propagación intermolecular de radicales centrados en proteína.

En a, registro de quimioluminiscencia de Mb 1mM expuesta a H_2O_2 50 mM en ausencia o presencia de BSA, en presencia de DMPO 20mM (+DMPO); en ausencia de Mb (-Mb), (Media \pm DE, * $p < 0,05$). En b, se registra la intensidad de fluorescencia $\lambda_{EX}=295nm$ $\lambda_{EX}=345nm$ de a) BSA 5mM; b) BSA 5mM + Mb 100mM + H_2O_2 2mM; c) BSA 5mM expuesta a $Fe^{2+}/DTPA$ 300 μM + H_2O_2 300 μM . En c, consumo de oxígeno luego de la adición de H_2O_2 0,1 mM a soluciones de a) BSA 0,5mM, b) Mb 0,1mM, c) Mb 0,1mM + BSA 0,1mM, d) Mb 0,1mM + BSA 0,5mM.

Por otro lado, repetimos los experimentos con el agregado de DMPO a la mezcla de reacción determinando una disminución en la quimioluminiscencia registrada (Figura 10a). Como fue mencionado previamente, el DMPO es capaz de reaccionar con diferentes radicales formando aductos estables que decaen a productos no radicalares. Por lo tanto, el DMPO podría actuar frenando la transferencia electrónica entre residuos lo que, en última instancia, reduciría la oxidación de residuos de triptofano y la emisión de quimioluminiscencia. Entonces, el efecto negativo del DMPO sobre la señal de quimioluminiscencia apoya la naturaleza radicalar del fenómeno. Consistentemente, cuando se repitieron los experimentos iniciales pero obviando la adición de metMb a la mezcla de reacción, no se registró señal alguna, reflejando que el H_2O_2 no es capaz de iniciar este tipo de reacciones en ausencia del centro metálico del grupo hemo (Figura 10a).

Con el objetivo de complementar los datos obtenidos mediante registro de quimioluminiscencia, estudiamos la oxidación de residuos triptofano durante la propagación de reacciones radicalares, a través del seguimiento de la fluorescencia intrínseca de este aminoácido. De esta manera, si la incubación de BSA con metMb y H_2O_2 resulta en la oxidación de residuos de triptofano, es esperable un descenso en la señal fluorescente correspondiente a su anillo indol. Consistentemente con los ensayos de quimioluminiscencia, nuestros registros de fluorescencia muestran que bajo las condiciones experimentales mencionadas ocurre una pérdida de señal de triptofano sugiriendo la ruptura del anillo indol (Figura 10b). A su vez, en la Figura 10b se puede observar el resultado de exponer BSA a una fuente de radical $\bullet OH$ (generado mediante reacción de Fenton), condición utilizada como control positivo de oxidación de triptofano [157].

Por último, evaluamos el consumo de oxígeno como medida indirecta de la formación de radicales peroxilo proteicos. Nuestros resultados muestran que la adición de H_2O_2 a soluciones de BSA no inició el consumo del oxígeno, sin embargo sí lo hizo en soluciones de metMb, resultado similar a los reportados previamente [178]. A su vez, observamos que la coincubación de BSA y metMb resultó en un incremento de concentración dependiente del consumo de oxígeno iniciado por H_2O_2 (Figura 10c).

Estos resultados apoyan los presentados previamente y en conjunto muestran que: 1) los radicales aminoacídicos generados producto de la actividad peroxidasa de la metMb inician cadenas de propagación radicalar; 2) la presencia de cadenas polipeptídicas vecinas en altas concentraciones resulta en un aumento del fenómeno de propagación.

Detección de hidroperóxidos proteicos mediante sondas fluorescentes

Los radicales peroxilo son especies reactivas que pueden participar en diversas reacciones llevando a la formación de diferentes productos. Sin embargo, en sistemas biológicos en donde existe una alta concentración de enlaces C-H y S-H, o moléculas con grupos funcionales ricos en electrones, la reducción y protonación de estos radicales para formar hidroperóxidos es el destino más probable [167].

Las sondas derivadas del ácido borónico, como el CBA son útiles para la detección de hidroperóxidos derivados de aminoácidos y proteínas [158]. En consecuencia, el CBA fue utilizado para detectar la aparición de este tipo de modificación oxidativa en soluciones de BSA expuesta a peroxinitrito. Para esto, soluciones de BSA fueron tratadas con bolos de peroxinitrito y a continuación (*i.e.* tres minutos después del bolo), el CBA fue agregado a la mezcla de reacción y la oxidación de la sonda fue evaluada mediante espectroscopía de fluorescencia. Entonces, si la incubación de BSA con peroxinitrito resulta en la formación de hidroperóxidos proteicos es esperable la

acumulación del producto oxidado (7-hidroxycumarina) y, en consecuencia, un incremento de su señal fluorescente.

La adición de CBA a nuestro modelo experimental llevó a un aumento en el tiempo de la concentración de 7-OH cumarina, lo que evidenció la formación de oxidantes por dos electrones en ausencia de peroxinitrito o sus radicales derivados (Figura 11).

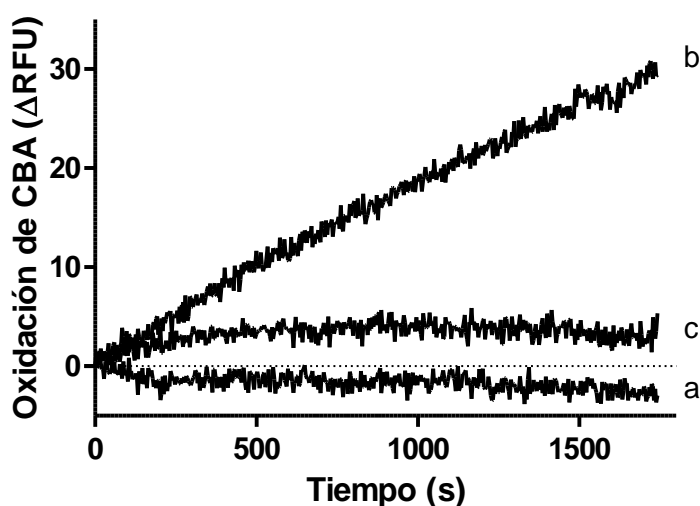


Figura 11. Detección de hidroperóxidos proteicos con CBA. Oxidación de CBA por BSA en ausencia (a) o presencia de peroxinitrito (b). En (c) Trolox (9 mM) fue agregado previo a la adición de CBA.

Este resultado refleja la generación continua de hidroperóxidos proteicos debido a la propagación del daño oxidativo radicalar proteico. Con el objetivo de apoyar este planteo, agregamos una condición en la cual las muestras fueron tratadas con Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E. Este compuesto es capaz de reducir radicales centrados en residuos aminoacídicos (e.g. triptofanilo, tirosilo [179-180] y radicales peroxilo [181], por lo tanto fue agregado a la mezcla de reacción previo a la adición de la sonda con el objetivo de disminuir la concentración de hidroperóxidos al momento de agregar CBA. Como resultado, el trolox disminuyó la presencia de hidroperóxidos proteicos en la muestra y en consecuencia también lo hizo con la producción de 7-OH cumarina (Figura 11).

Los radicales centrados en carbono reaccionan con oxígeno con constantes de velocidad cercanas al límite difusional [167]. En cambio, el radical fenoxilo de la tirosina reacciona relativamente lento ($k < 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [182]. Por otro lado, ha sido reportado que el Trolox reacciona con radicales tirosilo y triptofanilo con una constante de reacción de segundo orden de entre 10^7 - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [179]. De esta manera, considerando la concentración de Trolox utilizada ($[\text{Trolox}] = 9 \text{ mM}$) es esperable una eficiente competencia con el oxígeno ($[\text{O}_2] \sim 0,25 \text{ mM}$) por los radicales proteicos, previniendo la propagación de radicales aminoacídicos, y por lo tanto, la formación de hidroperóxidos proteicos.

Debido a que modificaciones oxidativas de BSA pueden ser una fuente de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , estos experimentos fueron realizados en presencia de CuZn-superóxido dismutasa y catalasa para excluir la potencial oxidación de la sonda por H_2O_2 .

Estudio de mecanismos de propagación de reacciones oxidativas en cadena

Luego de evidenciar la formación de cadenas de propagación radicalar entre moléculas vecinas, decidimos enfocarnos en disecar los mecanismos que favorecen estas reacciones. Con esto en mente, identificamos tres fenómenos de relevancia en los que fue necesario profundizar nuestro conocimiento: el rol de especies reactivas del nitrógeno, el efecto del grupo tiol libre de la BSA y la relación del fenómeno de propagación con la concentración de oxígeno en solución.

Propagación intermolecular de radicales proteicos mediada por dióxido de nitrógeno

En primer lugar, nos interesó estudiar el rol de las especies reactivas del nitrógeno por las siguientes razones:

- 1) La reacción directa de peroxinitrito con el tiol libre de la BSA resulta en la formación de NO_2^- en una reacción de oxidación por dos electrones [169].
- 2) La síntesis de peroxinitrito a partir de NaNO_2 tiene como resultado que una fracción del NO_2^- inicial persista como contaminante en sus soluciones [153].
- 3) El NO_2^- es un anión estable, sin embargo, puede ser blanco de oxidación por un electrón por diferentes agentes oxidantes dando lugar a la formación de $^{\bullet}\text{NO}_2$ [24].

Producto de lo mencionado, hipotetizamos que una especie reactiva de nitrógeno, el $^{\bullet}\text{NO}_2$, puede estar jugando un rol en el mecanismo de propagación radicalar. Esta hipótesis se fundamenta en que: 1) como muestran los resultados expuestos en la sección anterior, es esperable que soluciones de BSA expuestas a peroxinitrito conduzcan a la formación de radicales peroxilo proteicos; 2) estos radicales representan uno de los agentes oxidantes reportados capaces de reaccionar con NO_2^- para formar $^{\bullet}\text{NO}_2$ [163]; 3) el $^{\bullet}\text{NO}_2$ puede participar de reacciones redox con diferentes residuos aminoacídicos, como tirosina y triptofano, para dar radical tirosilo y triptofanilo, respectivamente [183].

Con el objetivo de probar nuestra hipótesis, realizamos experimentos en los que registramos el consumo de oxígeno iniciado a partir de la exposición de BSA a peroxinitrito en amortiguador PBS adicionado con NaNO_2 . Soluciones de BSA (2mM) y NaNO_2 (0-4 mM) fueron expuestas a peroxinitrito en bolo (0,2 mM) y el consumo de oxígeno de fase 1 y 2 fue registrado. En la Figura 12 se muestran graficados los niveles de consumo de oxígeno en función de la concentración de NaNO_2 adicionado. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de NaNO_2 no modificó el consumo de oxígeno de fase 1 (Figura 12a), en cambio encontramos una relación directa entre el consumo de fase 2 y la concentración de NaNO_2 (Figura 12b).

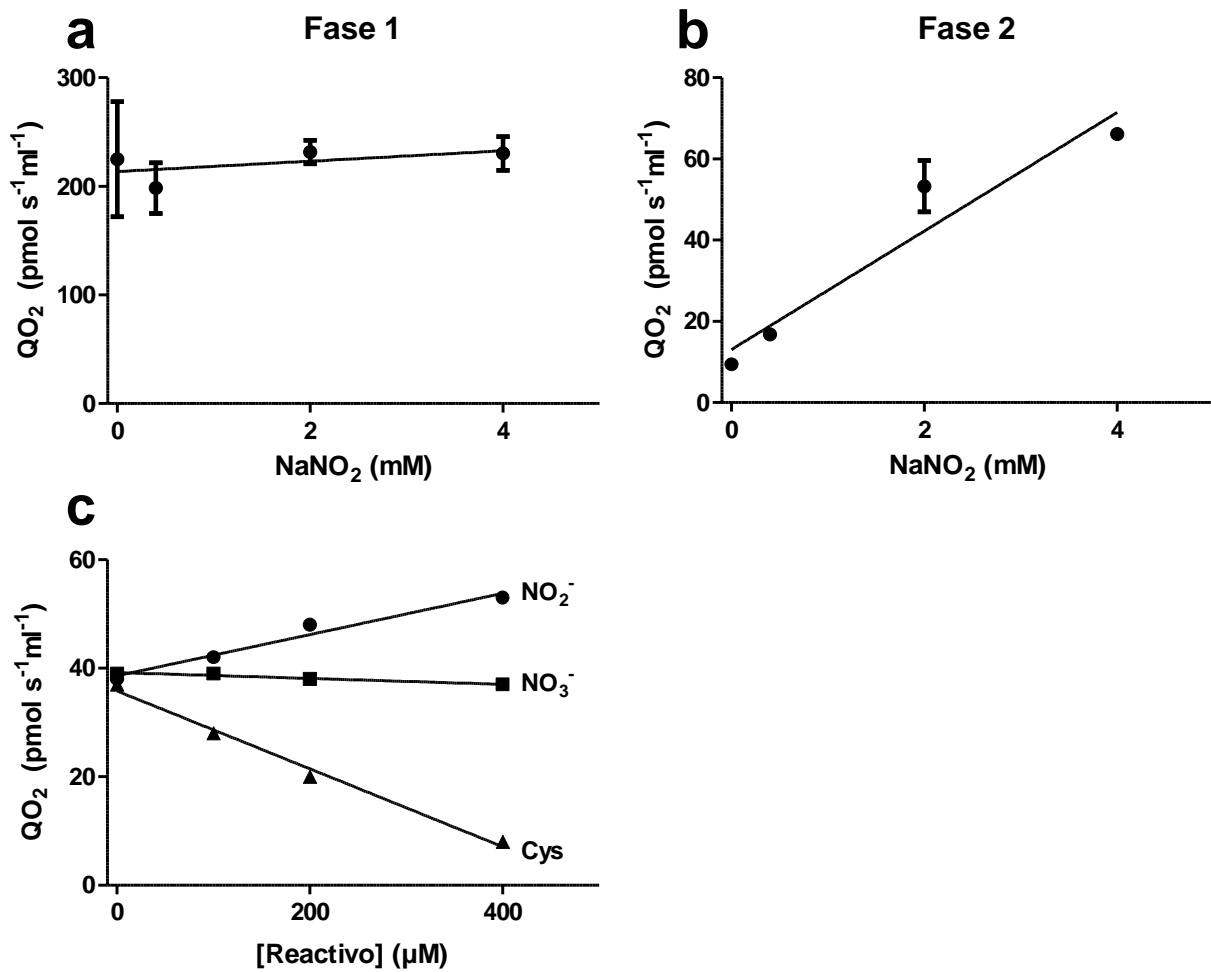


Figura 12. El nitrito potencia la propagación del radicales centrados en proteínas. El efecto del nitrito sobre QO₂ de fase 1 (a) y 2 (b) de BSA expuesta a peroxinitrito. En (c) el efecto de la adición de nitrito (●), nitrato (■) y cisteína (▲) sobre durante QO₂ durante la fase 2. (Media ± DE)

Previamente, discutimos que las reacciones que subyacen al consumo de oxígeno de fase 1 representan las reacciones directas de los radicales generados a partir de la homólisis de peroxinitrito con la BSA.

La ausencia de efecto del NaNO_2 sobre el consumo de fase 1 se explica de la siguiente manera: a) a las concentraciones utilizadas, el NaNO_2 no afecta la homólisis de peroxinitrito por lo que no se modifica la producción de radicales derivados; b) el NO_2^- adicionado puede reaccionar con los radicales derivados de la homólisis, sin embargo los productos generados son compuestos radicalares capaces de reaccionar con BSA para formar radicales proteicos (e.g. la reacción de NO_2^- con $\cdot\text{OH}$ o $\text{CO}_3^{\cdot-}$ da como producto $\cdot\text{NO}_2$).

En el caso del consumo de fase 2, sí registramos cambios en el nivel de consumo de oxígeno ante el agregado de NaNO_2 . La figura 12b muestra una relación directa entre el consumo de oxígeno registrado y la concentración de NO_2^- . Este comportamiento, diferente al registrado para la fase 1, refleja mecanismos disímiles entre los fenómenos observados. En primer lugar, la fase 2 tiene una duración mucho mayor a la fase 1, lo que sugiere que debe existir una formación constante de especies radicalares luego de descompuesto totalmente el peroxinitrito. En segundo lugar, el NO_2^- es capaz de reaccionar con radicales peroxilo con la consiguiente oxidación por un electrón del NO_2^- dando lugar a $\cdot\text{NO}_2$ ($E^{\circ}_{(\text{LOO}\cdot/\text{LOOH})} = 1,02\text{V}$ [49]; $E^{\circ}_{(\text{NO}_2^-/\cdot\text{NO}_2)} = -0,99\text{V}$ [50]). En consecuencia, en presencia de oxígeno esta reacción conduciría a un ciclo redox, ya que el $\cdot\text{NO}_2$ formado podría oxidar residuos de la BSA y luego éstos, podrían reaccionar con oxígeno para generar un nuevo radical peroxilo.

En busca de más evidencia que apoye nuestra hipótesis, diseñamos experimentos dirigidos a confirmar la formación de $\cdot\text{NO}_2$ durante la fase 2, luego de que el remanente de la homólisis del peroxinitrito hubiera decaído completamente. Para esto, nos planteamos tres series de experimentos: 1) reproducir los registros de consumo de oxígeno en presencia de agentes "atrapadores" de $\cdot\text{NO}_2$; 2) estudiar la producción de oxidantes mediante una sonda redox fluorescente; y 3) evaluar la nitración del ácido *p*-hidroxifenilacético en nuestras condiciones experimentales.

En primer lugar, realizamos experimentos de competencia utilizando compuestos capaces de reaccionar eficientemente con $\cdot\text{NO}_2$. En este tipo de ensayos se agrega a la mezcla de reacción un reactivo (cuyos parámetros cinéticos sean conocidos) que sea capaz de reaccionar con alguno de los reactivos del sistema original. De esta manera, al disminuir la disponibilidad de $\cdot\text{NO}_2$ la reacción de éste con BSA se vería disminuida y el fenómeno observado limitado. Entonces, para el caso de los experimentos de oximetría sería esperable registrar un descenso en el consumo de oxígeno ante el agregado de estos compuestos. Como resultado, vimos que la adición de cisteína, quien reacciona rápidamente con $\cdot\text{NO}_2$ ($k \sim 10^7\text{-}10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [70, 184], determinó una disminución en el consumo de oxígeno registrado (Figura 12c).

En el caso de cisteína, la reacción con $\cdot\text{NO}_2$ ocurre a nivel del grupo tiol y lleva a la formación de radical tiilo y NO_2^- . Este radical puede tener diferentes destinos [46], incluyendo derivados radicalares, sin embargo no promovió la propagación. Esto se debió a que es probable que rápidamente haya reaccionado con un grupo tiol ($8,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [185] dando como producto un disulfuro anión radical (RSSR^\cdot), o con otro radical tiilo formando un enlace disulfuro (RSSR). En el caso del primero, podría dar lugar a la formación de radical anión superóxido a través de su reacción con oxígeno, sin embargo esto no parece haber sido relevante para facilitar la propagación de reacciones radicalares. En el caso del segundo, no es capaz de participar en reacciones de propagación, por lo que también puede haber colaborado en la disminución del consumo de oxígeno.

Por el contrario, la incubación con NaNO_3 no modificó los niveles de consumo de oxígeno (Figura 12c). La diferencia en el comportamiento con respecto al NaNO_2 se explica de la siguiente manera: 1) para formar $\cdot\text{NO}_2$ el NO_2^- debe oxidarse por un electrón y los radicales peroxilo proteicos formados en las reacciones de propagación son capaces de llevar adelante esta reacción; 2) en cambio, el NO_3^- debería ser reducido por un electrón para generar $\cdot\text{NO}_2$ por lo que, bajo nuestras condiciones experimentales, esta reacción no es posible. Entonces, es esperable que la adición de NaNO_3 no provoque cambios en el

consumo de oxígeno registrado y por eso fue utilizado como una condición control.

A continuación, la formación de $\cdot\text{NO}_2$ en soluciones de BSA tratadas con peroxinitrito fue estudiada utilizando una sonda fluorescente denominada dihidrorodamina 123 (DHR) [162]. Utilizando el mismo modelo experimental (*i.e.* BSA expuesta a bolo de peroxinitrito), agregamos DHR al sistema durante la fase 2 (tres minutos después del bolo) y registramos la oxidación de la sonda mediante espectroscopía de fluorescencia. Encontramos que durante esta fase ocurrió un aumento en la señal fluorescente correspondiente al producto de oxidación de la sonda, rodamina, sugiriendo la formación de agentes oxidantes capaces de oxidar a DHR. Dado que diferentes radicales podrían ser responsables de oxidar DHR [162], decidimos repetir los experimentos en presencia de NaNO_2 , para potenciar la formación de $\cdot\text{NO}_2$, o desferrioxamina (atrapador de $\cdot\text{NO}_2$ [163]).

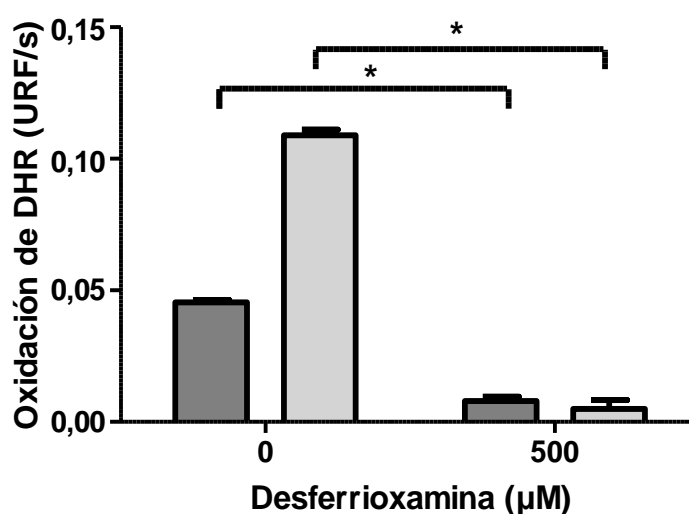


Figura 13. Desferrioxamina previene la oxidación de DHR mediada por $\cdot\text{NO}_2$. En el gráfico se resume efecto de NaNO_2 (ausencia, gris oscuro, o presencia, gris claro; y desferrioxamina 0 y 500 mM, sobre la formación de rodamina en soluciones de BSA pretratadas con peroxinitrito. Media \pm DE, * $p < 0,05$

En la figura 13 se puede ver que la adición de NaNO_2 resultó en un aumento de la oxidación de la sonda y que, contrariamente, la adición de desferroxiamina determinó una disminución en el nivel de rodamina. En conjunto, estos resultados apuntan a que el $\cdot\text{NO}_2$ fuera el responsable de la oxidación de la sonda, sin embargo estos datos no son suficientes para descartar la participación de otros radicales.

Por último, realizamos experimentos adicionales que permitieran disminuir la interferencia de otros radicales en la detección de $\cdot\text{NO}_2$. Como fue mencionado en la introducción, muchas especies reactivas tienen la capacidad de sustraer electrones de las moléculas con las cuales reaccionan. No obstante, algunas intervienen en reacciones de adición, en la cual el producto de la reacción evidencia la unión de la especie reactiva involucrada a la molécula con la cual reacciona: reacciones de hidroxilación (R-OH) para $\cdot\text{OH}$ y de nitración (R-NO_2) para $\cdot\text{NO}_2$. Haciendo uso de esta característica del $\cdot\text{NO}_2$, nos propusimos estudiar la formación de este radical durante la fase 2 utilizando como sonda para su detección al ácido *p*-hidroxifenilacético (*p*-HPA). A través de un mecanismo similar al reportado para la tirosina, este compuesto puede sufrir la adición de un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) a su anillo fenólico en presencia de agentes nitrantes [184, 186].

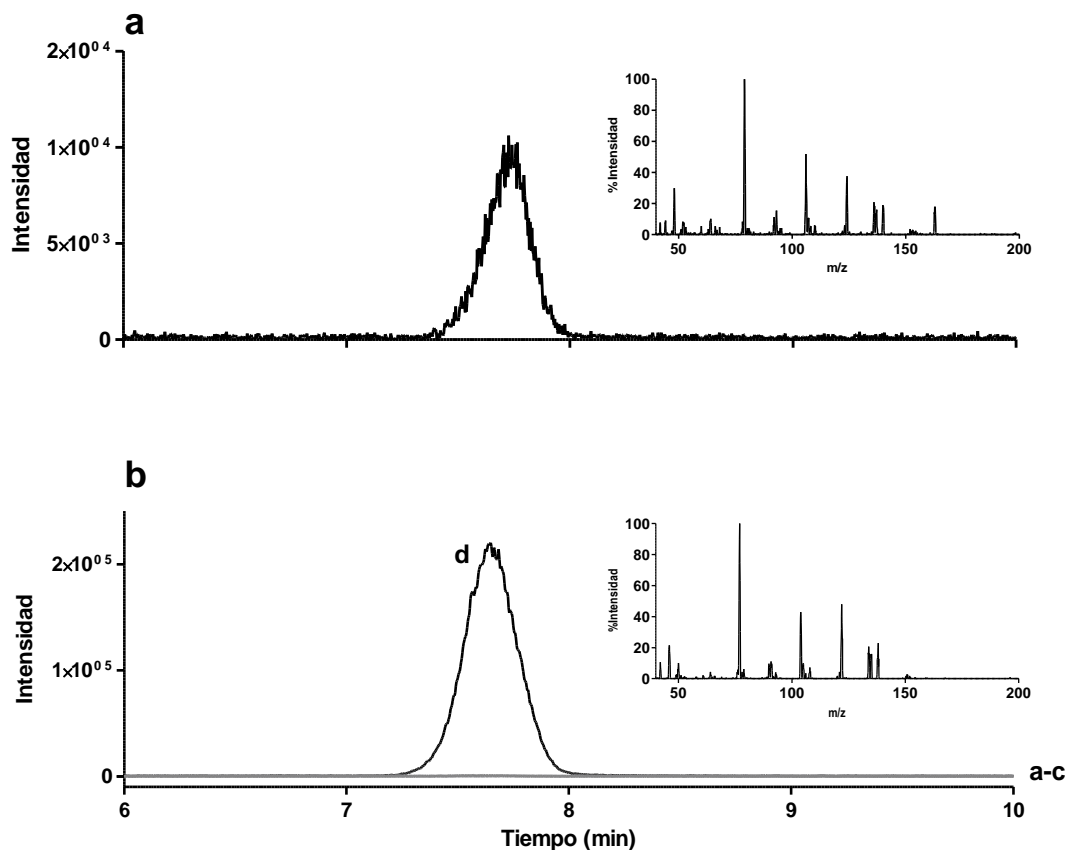


Figura 14. Atrapamiento de $\cdot\text{NO}_2$ durante propagación de cadenas de oxidación proteica. En a) espectro LC-MS/MS del estándar de NO_2 -*p*HPA; y en b) los espectros obtenidos a partir de: a) BSA + *p*HPA, b) BSA + ONOO-RA + *p*HPA, c) BSA + ONOO $^-$, d) BSA + ONOO $^-$ + *p*HPA. Inserto: patrón de fragmentación de estándar en (A), y en (B) del pico observado en muestra d).

Por lo tanto, hipotetizamos que si el mantenimiento de las reacciones de propagación depende de la reacción de $\cdot\text{NO}_2$ con residuos aminoacídicos, la existencia de reacciones de competencia debería disminuir este fenómeno. La incubación con *p*-HPA redireccionaría parte del $\cdot\text{NO}_2$ generado, llevando a la formación de ácido 3-nitro-*p*-hidroxifenilacético (NO_2 -*p*HPA), evitando su reacción con cadenas polipeptídicas.

En este sentido, expusimos soluciones de BSA a peroxinitrito y el *p*-HPA fue agregado durante la fase de propagación. Luego de un tiempo de incubación, los productos fueron extraídos y analizados mediante LC-MS/MS para intentar

detectar NO_2 -*p*HPA como una medida indirecta de la formación de $\cdot\text{NO}_2$. En la figura 14 se muestra el análisis de monitoreo de múltiples reacciones (MRM) de la transición 196/122 m/z (correspondiente a la masa del ion padre NO_2 -*p*HPA y uno de sus productos). Los resultados presentados muestran que fuimos capaces de detectar NO_2 -*p*HPA en nuestras condiciones experimentales a tiempos en los que los radicales derivados de la homólisis de peroxinitrito ya han decaído. Es importante destacar que el producto nitrado no fue observado en muestras incubadas con *p*-HPA en ausencia de peroxinitrito o luego de la adición reversa de éste (peroxinitrito previamente descompuesto).

La importancia de estos controles radica en que la formación de ácido nitroso (HNO_2 , $pK_a=3,15$), resultado de la protonación de NO_2^- podría resultar en la formación secundaria de especies reactivas del nitrógeno, tales como el $\cdot\text{NO}_2$, implicando que nuestros resultados podrían ser producto de un artefacto. Sin embargo, la probabilidad de que este fenómeno sea significativo en nuestras condiciones experimentales es muy baja por lo siguiente: a) el pH utilizado en nuestros experimentos fue 7,4 lo que determina que la fracción de ácido conjugado en la muestra sea marginal ($pK_{a\text{HNO}_2}=3,15$; b) las muestras tratadas con adición reversa de peroxinitrito, en las que puede haber NO_2^- contaminante, no redundaron en la detección de NO_2 -*p*HPA.

Rol del tiol de BSA en reacciones de propagación de radicales proteicos

Luego de la demostración de que el $\cdot\text{NO}_2$ participa en el mecanismo de propagación de reacciones radicalares en cadena, dirigimos nuestra atención a otro de los potenciales involucrados en este tipo de reacciones, los grupos tioles. Nuestra proteína modelo, BSA, contiene 35 cisteínas en su secuencia aminoacídica, sin embargo, solo una de ellas aporta un grupo tiol en su conformación nativa (*i.e.* cisteína 34). En cambio, las restantes forman enlaces disulfuro con función estructural. El interés por el tiol de la BSA surge de trabajos previos de nuestro grupo que demostraron que la reacción de tioles con peroxinitrito puede dar inicio a reacciones oxidativas en cadena [169]. Por

lo tanto, se evaluó la participación del tiol libre de la cisteína 34 de la BSA en la propagación de los fenómenos redox observados.

Con este objetivo utilizamos dos estrategias experimentales: 1) alquilación del grupo tiol; 2) atrapamiento del radical tiolo mediante "spin trapping"

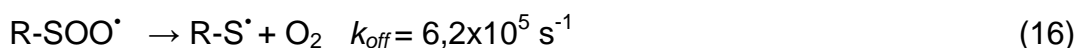
Uno de los agentes alquilantes de tioles más ampliamente utilizados es N-etilmaleimida (NEM), por lo tanto, soluciones de BSA fueron tratadas con NEM para alquilar la cadena lateral de la cisteína 34. Esta modificación impide al átomo de azufre del tiol intervenir en reacciones redox, en consecuencia, si este grupo está involucrado en el mecanismo de propagación deberíamos evidenciar una disminución de este fenómeno. Para evaluar el efecto de la alquilación del tiol de la BSA, registramos el consumo de oxígeno iniciado por peroxinitrito en soluciones de BSA pretratadas con NEM. Así, elaboramos la tabla 2 que resume los registros de consumo de oxígeno para ambas fases en muestras de BSA con y sin pretratamiento con NEM. Del análisis de estos datos, se concluye en primer lugar que la ausencia del tiol libre llevó a un descenso parcial en el consumo de oxígeno de fase 1. Sin embargo, es importante destacar que alquilar el tiol libre llevó, en el caso de la fase 2, a la total inhibición del consumo de oxígeno.

Tabla 2. Tioles propagan reacciones radicalares de oxidación proteica.

	QO ₂ Fase 1 (pmol.s ⁻¹ .ml ⁻¹)	QO ₂ Fase 2 (pmol.s ⁻¹ .ml ⁻¹)
BSA	429,4 ± 14,3	11,8 ± 1,3
BSA-NEM	147,1 ± 7,8	0,67 ± 0,03

Efecto de la alquilación del tiol de la Cis³⁴ sobre QO₂ de BSA tratada con peroxinitrito (media ± DE).

El descenso en el consumo de oxígeno registrado debido a la alquilación del tiol de la albúmina sugiere que este grupo participa en reacciones en las que interviene este gas. El tiol podría estar implicado de diferentes maneras, por un lado, podría colaborar en la transferencia intramolecular de electrones determinando la formación de radicales en aminoácidos vecinos los cuales podrían reaccionar con oxígeno. Sin embargo, ya sea por reacciones bimoleculares con radicales libres derivados del peroxinitrito o por reacciones de transferencia intra o intermolecular de electrones, la oxidación por un electrón el tiol lleva a la formación de un radical tiilo (R-S[•]), el cual es capaz de reaccionar rápidamente con oxígeno para formar un radical tioperoxilo (R-SOO[•]) [46]. La reacción de adición de oxígeno por parte del radical tiilo es reversible, sin embargo existe una gran diferencia en las constantes de velocidad de ambos procesos [47]:



Por lo tanto, ante estas consideraciones cinéticas y la abundancia de potenciales blancos para el radical tioperoxilo en nuestras condiciones experimentales, es esperable que la participación de la vía reversa sea marginal.

En el caso de la fase 1 vimos que el pretratamiento con NEM disminuyó el consumo de oxígeno aproximadamente en un 66%, en cambio, para la fase 2 el efecto fue cercano al 94%. La diferencia en el consumo de oxígeno remanente, evidencia una participación diferencial por parte de los residuos aminoacídicos en ambas fases. En el caso de la fase 1, la gran producción de radicales mediada por la homólisis del peroxinitrito iniciador, probablemente resulte en el ataque a una gran variedad de blancos moleculares llevando a diferentes fuentes de consumo de oxígeno. Por consiguiente, aunque los tioles no estén disponibles, pueden formarse otros radicales proteicos capaces de reaccionar con oxígeno y de esta manera mantener un nivel significativo de consumo en nuestros experimentos. Por el contrario, el efecto sobre la fase 2

fue más intenso, de hecho llevó casi a la abolición del consumo de oxígeno. Entonces, planteamos que los tioles son críticos para mantener el consumo de oxígenos a largo plazo y que su rol no puede ser sustituido por otros aminoácidos.

A la luz de los resultados obtenidos mediante la alquilación del tiol de la BSA, que sugieren la participación del tiol de la cisteína 34 en reacciones radicalares, decidimos intentar registrar la formación del radical tiilo en nuestro diseño experimental. La alta reactividad general de las especies radicalares hace que su vida media, sobre todo en sistemas biológicos, sea muy corta. Por esta razón, la detección directa de estas moléculas es dificultosa. Una técnica clásicamente utilizada para su detección e identificación es el "EPR-spin trapping" o espectroscopía de resonancia paramagnética con atrapamiento de espín. Esta técnica hace uso de la alta reactividad de los radicales buscando su reacción con un grupo de compuestos denominados atrapadores. Los productos de reacción entre ambos son moléculas radicalares pero que poseen una mayor vida media lo que favorece su detección.

Entonces, diseñamos experimentos con soluciones de BSA tratadas con peroxinitrito en presencia del atrapador de espín PBN. La elección de este atrapador se fundamenta en que ha sido previamente reportado que el PBN es capaz de atrapar el radical tiilo, generado a partir de la exposición de BSA a peroxinitrito [187]. Como resultado, se obtiene el aducto $\cdot\text{PBN-S-BSA}$ (Figura 15), que puede ser detectado por EPR a temperatura ambiente. En este caso, utilizamos el mismo diseño experimental que para los estudios de oximetría, pero en lugar de agregar los compuestos mencionados, agregamos PBN durante la fase 2. De acuerdo a la hipótesis planteada, las reacciones de propagación durante esta fase llevarían a la formación de un radical tiilo en la BSA por lo que seríamos capaces de detectar su aducto con PBN. En efecto, en la figura 15 se muestran los registros de EPR obtenidos en estos experimentos. Por un lado, como control positivo, comenzamos repitiendo las condiciones experimentales utilizadas en el reporte antes mencionado [187], y de esta manera, obtuvimos un patrón con el cual comparar la señal registrada con nuestro protocolo (Figura 15c). Luego, realizamos nuestros experimentos y

obtuvimos un señal similar, de menor intensidad pero de iguales características demostrando la formación del aducto $\cdot\text{PBN-S-BSA}$ durante la fase 2. A su vez, repetimos los experimentos con muestras de BSA pretratadas con NEM para alquilar al tiol de la cisteína 34 y registramos un marcado descenso en la intensidad de señal reflejando una menor formación de aducto (Figura 15e).

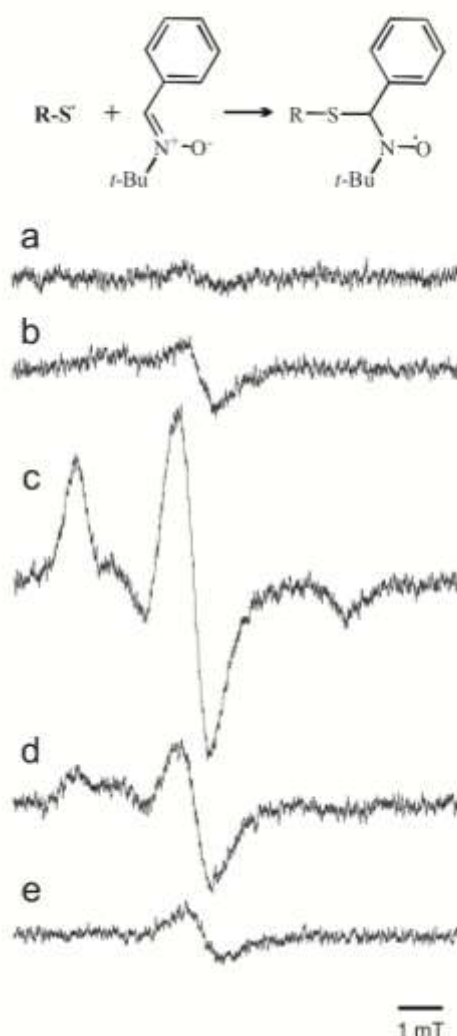


Figura 15. Atrapamiento de radical tiilo durante reacciones en cadena de oxidación proteica. En la figura se muestran espectros de EPR de: a) BSA 3 mM; b) BSA 3 mM + ONOO^- (sin PBN); c) BSA 3 mM + PBN + ONOO^- ; d) BSA 3 mM + ONOO^- + PBN (agregado luego de ONOO^-); e) BSA-NEM 3 mM + peroxinitrito + PBN (agregado luego de ONOO^-).

A continuación, planteamos que si PBN fue capaz de atrapar radical tiilo y, por lo tanto, de interrumpir cadenas de propagación radicalar, deberíamos encontrar un descenso en el consumo de oxígeno iniciado por peroxinitrito. Por lo tanto, repetimos el protocolo experimental pero realizando estudios de oximetría en lugar de EPR. En la figura 16 se muestra que la adición de PBN durante la fase 2 resultó en un descenso en el consumo de oxígeno registrado, apoyando el efecto inhibitor de la propagación de reacciones en cadena por parte de esta nitrona. En nuestro diseño experimental utilizamos dos concentraciones diferentes de BSA, 3 y 0,5 mM, encontrando un efecto inhibitorio de PBN proporcionalmente mayor a concentraciones altas que bajas (25% vs 20%, respectivamente).

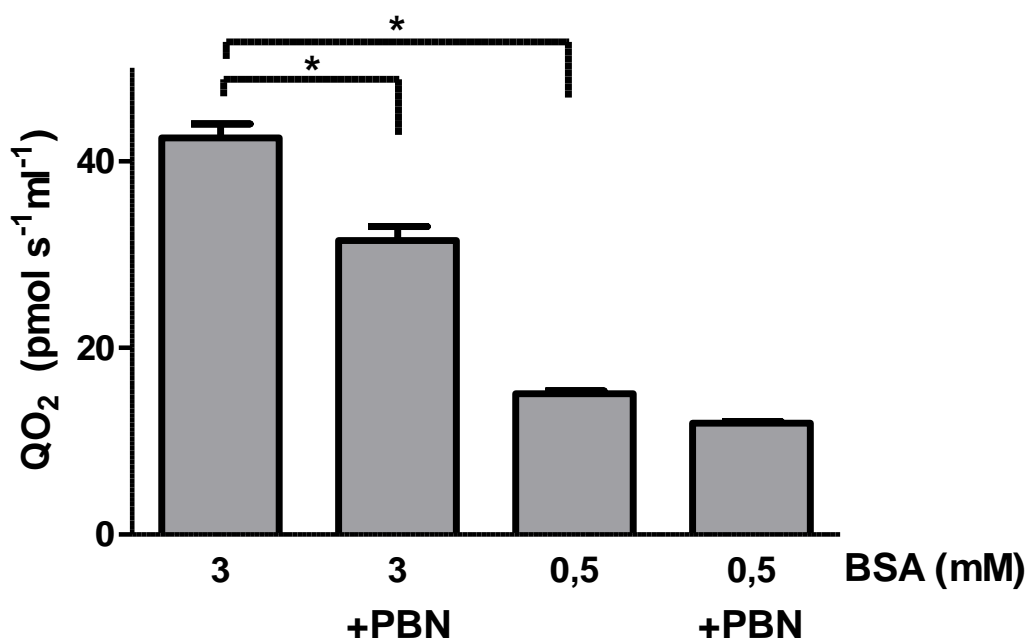


Figura 16. Interrupción de reacciones en cadena de oxidación proteica mediada por PBN. Los datos muestran QO₂ remanente luego de la adición de PBN (+PBN) a soluciones de BSA pretratadas con peroxinitrito (media ± DE, *p<0,05).

La evidencia de un mayor efecto de PBN a concentraciones altas de BSA, sugiere la interrupción de un mayor número de cadenas de propagación, reflejando de manera indirecta que bajo estas condiciones la propagación de reacciones de oxidación por un electrón se ve favorecida.

En conjunto estos resultados demuestran la formación de un radical tiilo durante la fase de propagación, así como el rol crítico de éste en el mantenimiento de estas cadenas. A diferencia de los datos reportados previamente [187], en los que la exposición a peroxinitrito se hizo en presencia de PBN, en nuestros experimentos éste último fue agregado tres minutos después. Esta diferencia en el momento de adición del atrapador es importante para la descripción del mecanismo de reacción. En el caso de la adición simultánea, los radicales responsables de generar el radical tiilo que reacciona con el PBN, surgen de la homólisis del peroxinitrito agregado. Por lo tanto lo que se registra, indirectamente, es la reacción directa entre estos. Sin embargo, el retraso en la adición de PBN determina que los radicales derivados de la homólisis no estén presentes al momento del atrapamiento del radical tiilo, reflejando la formación continua de este radical de forma independiente del bolo inicial de oxidantes.

Propagación oxígeno dependiente del daño oxidativo proteico

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la exposición de BSA a peroxinitrito genera radicales proteicos, que reaccionan con oxígeno y propagan reacciones de naturaleza radicalar. Entonces, planteamos que los radicales peroxilo proteico formados podrían actuar como intermediarios críticos para la propagación. En efecto, nos propusimos estudiar el impacto de la disponibilidad de oxígeno en la propagación de reacciones radicalares iniciadas por peroxinitrito.

Con el objetivo de demostrar que la concentración de oxígeno cumple un rol central en el fenómeno observado, repetimos nuestros experimentos pero a diferentes concentraciones de oxígeno. En la figura 17 mostramos que la concentración inicial de oxígeno no modificó de manera significativa el

consumo de oxígeno registrado durante la fase 1 (Figura 17a). Por el contrario, los niveles de consumo de oxígeno de la fase 2 fueron altamente dependientes de la concentración inicial de oxígeno, apoyando el rol de este gas en el mecanismo de propagación de cadenas radicalares de oxidación proteica (Figura 17b).

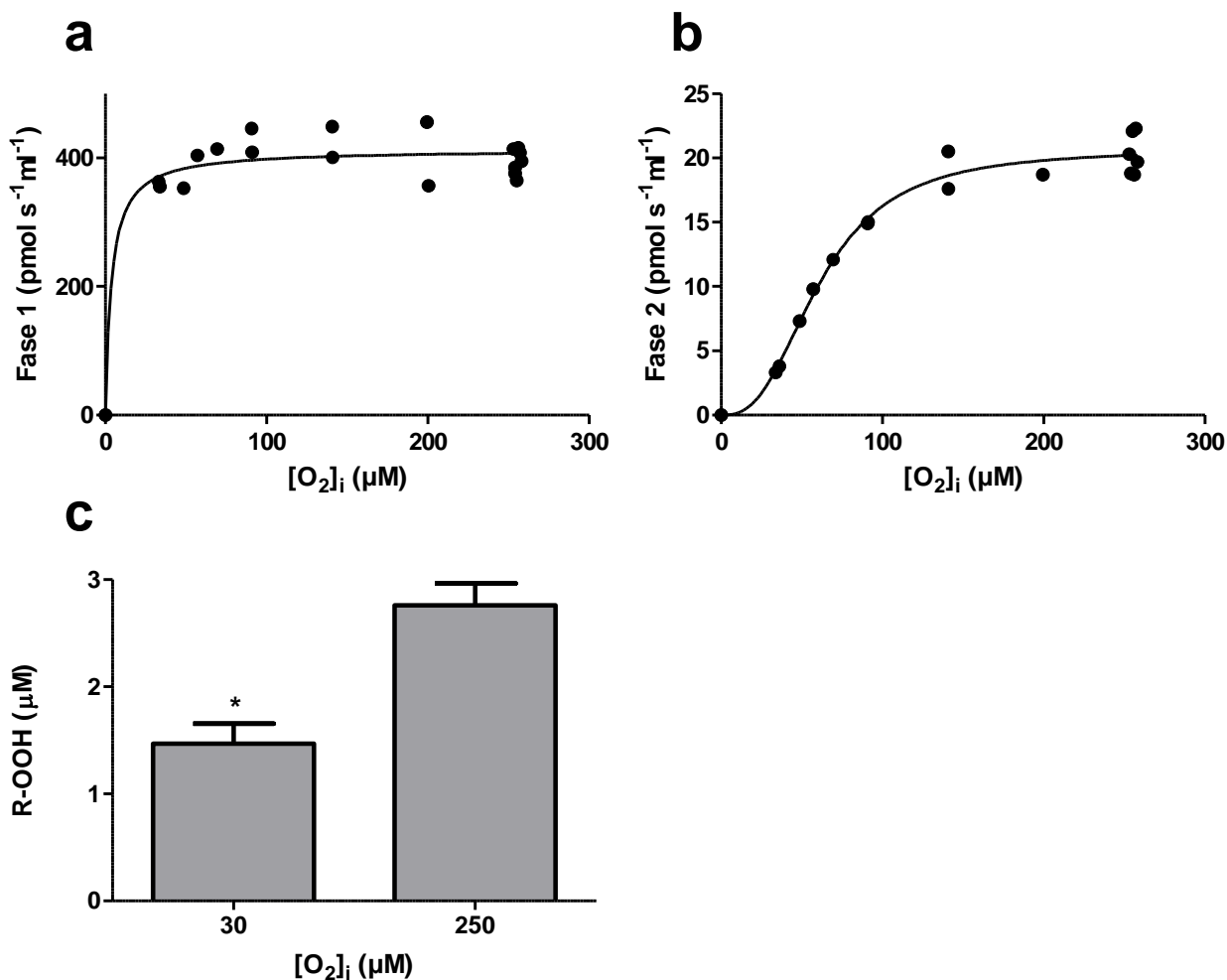


Figura 17. Propagación oxígeno dependiente de cadenas de oxidación proteica. En la figura se muestran los QO₂ de fase 1 (a) y 2 (b) a diferentes concentraciones iniciales de oxígeno. En la figura c, se incluye la cuantificación de hidropéroxidos proteicos a 30 y 250 μM de concentración inicial de oxígeno (media ± DE, *p<0,05).

De forma complementaria, cuantificamos la producción de hidroperóxidos en estas mismas condiciones experimentales, considerando que su formación debería acompañar los cambios registrados en el consumo de oxígeno. Entonces, utilizamos CBA para detectar y cuantificar hidroperóxidos proteicos a diferentes concentraciones iniciales de oxígeno. En la figura 17c se muestra un descenso en la oxidación de CBA durante la fase 2 a 30 μM oxígeno comparado con 250 μM , evidenciando una disminución en la formación de hidroperóxidos e, indirectamente, de la propagación de cadenas de oxidación radicalar. En nuestras condiciones experimentales, los hidroperóxidos detectados corresponden aproximadamente a un 5% del oxígeno consumido luego de la adición de peroxinitrito. Sin embargo, diversas vías de descomposición de radicales peroxilo proteicos, la inestabilidad propia de algunos hidroperóxidos, diferentes constantes de reacción entre CBA e hidroperóxidos de distintos aminoácidos, así como la formación de hidroperóxidos no accesibles para el CBA pueden afectar la cuantificación realizada. Entonces, la cantidad de hidroperóxidos reportada aquí debe ser considerada únicamente a efectos de la prueba de concepto de la dependencia de oxígeno. El valor cuantitativo de este dato es limitado ya que solamente representa una fracción menor de los hidroperóxidos realmente generados [158, 167].

La dependencia del oxígeno registrada apoya la hipótesis de que la formación de radicales peroxilo es fundamental para la propagación. Por lo tanto, diseñamos experimentos con el objetivo de registrar la formación de estas especies reactivas del oxígeno. Como fue mencionado previamente, el trolox es un compuesto capaz de reducir estos radicales generando su radical derivado. Afortunadamente, las características químicas del radical del trolox determinan una mayor estabilidad en comparación con otros radicales, permitiendo su detección mediante EPR. En este sentido, tratamos soluciones de BSA con peroxinitrito en bolo y, luego de tres minutos, agregamos trolox a la mezcla de reacción y registramos la aparición del radical de trolox mediante EPR (Figura 18).

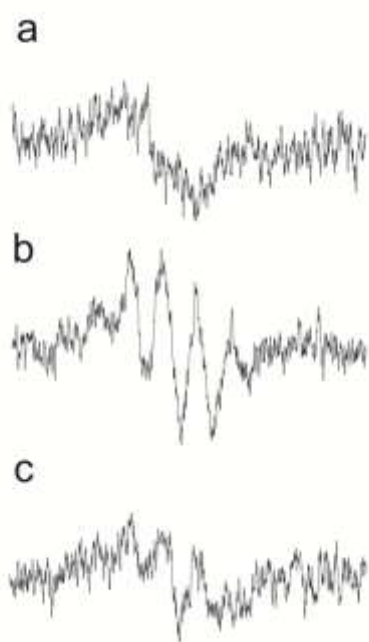


Figura 18. Detección de radicales peroxilo proteicos por oxidación de trolox. La imagen muestra los espectros obtenidos a partir de la incubación de BSA 3 mM preexpuesta a ONOO^- 0,3 mM en ausencia y presencia de Trolox. En a) BSA + ONOO^- ; b) BSA + ONOO^- + Trolox 9 mM; c) BSA + Trolox.

Es de destacar que estos experimentos fueron realizados en presencia de Cu-Zn superóxido dismutasa y catalasa con el objetivo de evitar la oxidación del trolox por parte de radical anión superóxido, reacción que también resulta en la formación del radical del trolox sugiriendo la formación de radicales peroxilo durante la fase de propagación, sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela. Anteriormente, demostramos que durante la fase de propagación ocurre la oxidación de NO_2^- a $\bullet\text{NO}_2$, quien también es capaz de oxidar trolox a su derivado radicalar. En conclusión, estos datos apoyan la naturaleza radicalar de las reacciones de propagación, aunque no permiten discriminar entre las posibles especies reactivas que promueven este fenómeno.

En síntesis, podemos decir que los datos acumulados en esta sección permiten realizar las siguientes afirmaciones: 1) las reacciones entre proteínas y oxidantes por un electrón llevan a la formación de radicales aminoacídicos los cuales, en condiciones de hacinamiento molecular, inician reacciones en cadena de oxidación proteica; 2) el mantenimiento y propagación de las

cadena de oxidación depende de la disponibilidad de determinados residuos aminoacídicos, así como de la formación de radicales peroxilo proteicos a partir de la reacción con oxígeno; 3) compuestos de bajo peso molecular con el NO_2^- , pueden actuar como transportadores de electrones facilitando la formación de ciclos redox que perpetúan estos fenómenos (figura 19); 4) agentes capaces de reducir o atrapar radicales proteicos, como es el caso de las nitronas, serían capaces de interrumpir estas cadenas de oxidación limitando la extensión del daño.

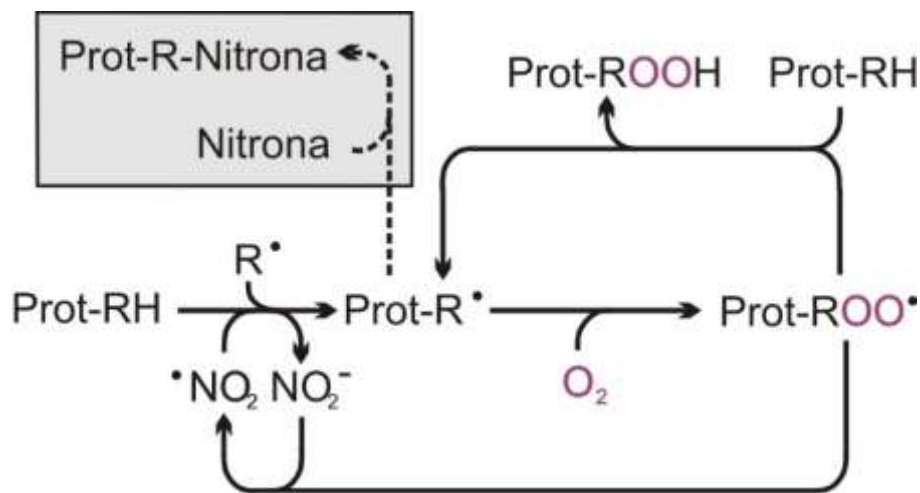


Figura 19. Mecanismo de propagación intermolecular de reacciones de radicales proteicos. La figura muestra el mecanismo propuesto para la propagación intermolecular oxígeno dependiente de reacciones en cadena de radicales proteicos. Cuando un radical proteico es formado en presencia de oxígeno, la reacción entre ambos lleva a la formación de radicales peroxilo proteico. Luego, estos productos pueden oxidar directamente residuos aminoacídicos de la misma u otra cadena polipeptídica, u oxidar NO_2^- a $\bullet\text{NO}_2$, el cual puede promover la oxidación por un electrón de otros residuos cerrando un ciclo redox de daño oxidativo.

CAPÍTULO II

DAÑO OXIDATIVO ENDOTELIAL Y ROL PROTECTOR DE AGENTES ATRAPADORES DE ESPÍN

El trabajo experimental desarrollado en este capítulo estuvo dirigido a evaluar, en células endoteliales, el rol de los atrapadores de espín en la prevención del daño inducido por oxidantes. Para intentar cumplir con este objetivo nos planteamos el uso de dos modelos de daño oxidativo celular: 1) exposición a extracto de humo de tabaco; 2) exposición a flujos de peroxinitrito.

Daño oxidativo celular mediado por extracto de humo de tabaco

Modelo de daño celular mediado por extracto de humo de tabaco

La puesta a punto del modelo de daño celular inducido por extracto de humo de tabaco, comenzó por estudiar la viabilidad celular de cultivos de BAEC expuestas a diferentes concentraciones de CSE. Con este objetivo, evaluamos la viabilidad celular mediante dos técnicas: trypan blue y MTT.

En nuestro diseño experimental cultivos de BAEC fueron expuestos a medio de cultivo suplementado con CSE (0-30% v/v) durante la noche y luego la viabilidad celular fue evaluada. El estudio de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, mostró que la incubación con CSE no provocó diferencias significativas en la producción de formazán con respecto a la condición control (Figura 20a), sugiriendo que la incubación con CSE no afectó la viabilidad celular de los cultivos. De forma similar, tampoco encontramos diferencias significativas en la viabilidad celular mediante la tinción con trypan blue bajo las mismas condiciones experimentales.

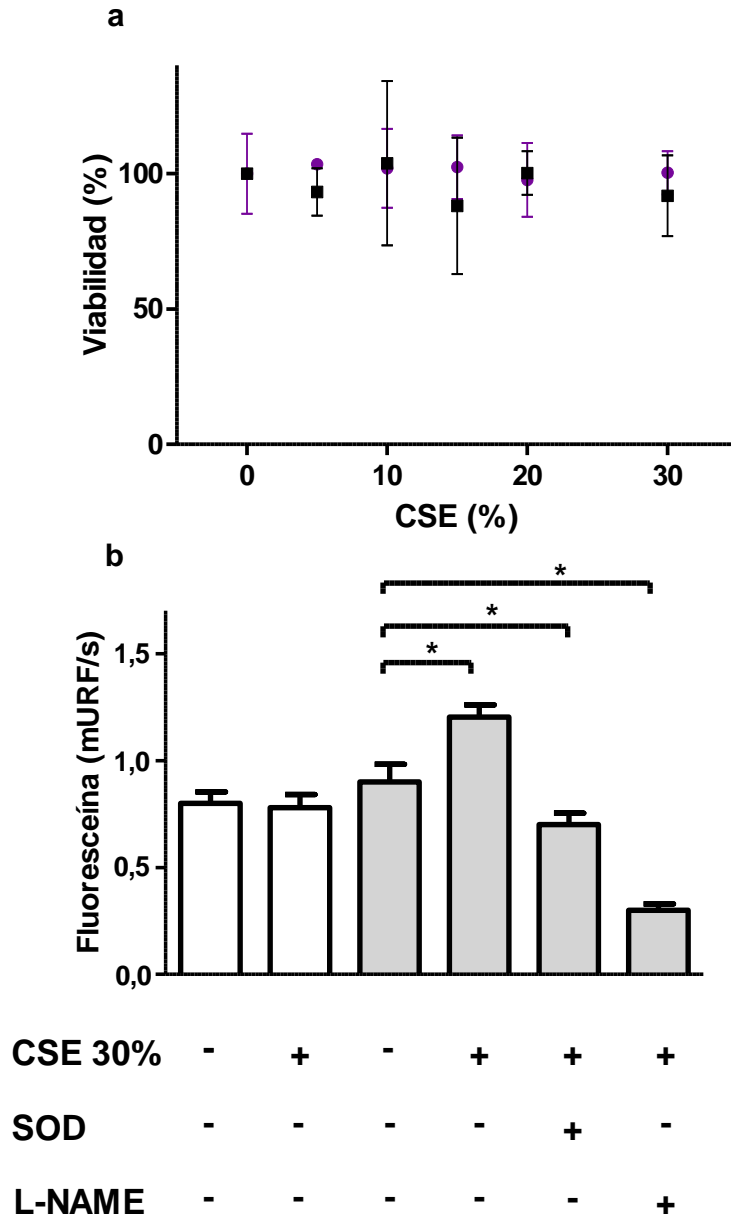


Figura 20. Exposición a CSE por parte de cultivos de BAEC. En la figura a) se muestra el porcentaje de células viables con respecto al control (CSE 0%), luego de la incubación durante la noche con medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de CSE. Los (●) representan los resultados con Trypan blue y los (■) los correspondientes al ensayo de MTT. En b) se grafica la oxidación de fluoresceína boronato en cultivos de BAEC no expuestos y expuestos a CSE 30%. Además, se representan las medidas en ausencia de estímulo con ionomicina (blanco), las estimuladas con este ionóforo (gris) y se destaca las medidas realizadas en presencia de SOD (+SOD) y L-NAME (+L-NAME) (media ± DE, *p<0,05).

Entonces, la ausencia de cambios relevantes en la proporción de células viables producto de la exposición a CSE nos permitió diseñar experimentos con una amplia ventana de trabajo, sin afectar el número de células en los cultivos. En principio, esto parecía ser de utilidad para intentar detectar modificaciones sutiles que la exposición a CSE pudiera inducir en los cultivos de BAEC. En trabajos previos de nuestro grupo se encontró que con concentraciones superiores a 20% CSE la viabilidad celular comienza a deteriorarse [23]. Sin embargo, en nuestro caso no pudimos reproducir esos resultados, lo que probablemente se deba a diferencias en la composición del extracto [188]. En efecto, existen reportes de exposición a CSE para otros modelos celulares (*i.e.* células epiteliales alveolares) en los que la toxicidad del extracto (generado utilizando protocolos similares al nuestro) ocurre a concentraciones por encima del 40% v/v [108]. No obstante, para validar nuestro extracto replicamos experimentos previos de nuestro grupo, en los que la incubación de cultivos de BAEC con CSE resultó en un aumento de la producción de especies reactivas, entre ellas peroxinitrito [23]. De acuerdo al trabajo mencionado, el tratamiento con CSE lleva a un incremento en la oxidación de la sonda DHR en comparación con la condición no tratada. El análisis conjunto de los resultados del estudio, permitió a los autores proponer que este fenómeno ocurrió como resultado del aumento de la producción de peroxinitrito. En nuestro caso, la generación de esta ERN se evaluó a través de la oxidación de Flb obteniendo resultados similares (Figura 20b). La incubación de cultivos de BAEC con CSE 30% llevó a un aumento significativo de la producción de fluoresceína en comparación con la condición control. A su vez, la presencia de SOD (quien compite con el $\bullet\text{NO}$ por el $\text{O}_2\bullet^-$) o L-NAME (inhibidor de la eNOS) conduce a un descenso en la señal registrada, apoyando la identidad del peroxinitrito como molécula responsable de la oxidación de Flb.

Estudio del metabolismo energético de cultivos de BAEC expuestas a CSE

La combustión del tabaco volatiliza diferentes compuestos con actividad redox. El humo del tabaco puede dividirse en una fase gaseosa y otra particulada. Ambas contienen oxidantes y radicales libres (e.g. O_2^{\bullet} , H_2O_2 , $\bullet NO$, $\bullet NO_2$, $ONOO^-$), así como aldehídos reactivos y quinonas redox activas [103]. Es importante destacar este último grupo ya que puede favorecer la generación de ciclos redox resultando en la formación de especies reactivas [32, 189]. La mitocondria es el organelo mayormente implicado en la formación de estos ciclos, entonces, decidimos estudiar si la incubación con CSE podría provocar modificaciones funcionales en este organelo.

Para estudiar los efectos del CSE sobre el metabolismo energético celular, expusimos BAEC a diferentes concentraciones de CSE durante 20 horas y posteriormente llevamos a cabo medidas de función mitocondrial y de actividad glucolítica utilizando un analizador de flujo metabólico. Esta estrategia se basa en la cuantificación del consumo de oxígeno junto con la velocidad de acidificación del medio, por parte de cultivos de células expuestas a agentes moduladores de la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. De esta manera, se registra de forma indirecta el flujo de electrones a través de la cadena y de metabolitos a través de la glucólisis.

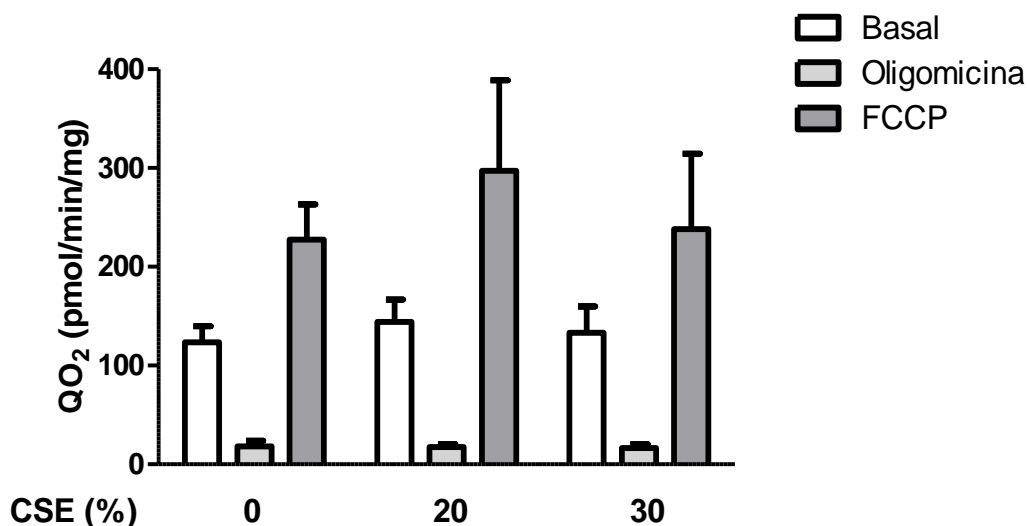


Figura 21. Función mitocondrial de BAEC expuestas a CSE. En el gráfico se muestran el consumo de oxígeno de cultivos de BAEC no expuestas o expuestas a CSE 20% y 30%. Se registraron los consumos basales (blanco), luego de la adición de oligomicina (consumo regulado por ATP sintasa, gris claro), y máximo, frente a la adición de FCCP (desacoplante mitocondrial, gris oscuro). Media \pm DE.

El protocolo utilizado para los ensayos de oximetría, nos permitió evaluar diferentes parámetros de la función mitocondrial. La adición secuencial de inhibidores de los complejos permite evaluar el consumo de oxígeno en condiciones: 1) basal (sin inhibidores); 2) relacionado a actividad de la ATP sintasa; 3) inducido por la pérdida del potencial transmembrana y 4) no vinculado a la cadena de transporte de electrones.

En la figura 21 se muestran los resultado obtenidos luego de la incubación de cultivos de BAEC a CSE 20 y 30% durante la noche. En nuestras condiciones experimentales no pudimos encontrar diferencias significativas entre los cultivos expuestos y no expuestos a CSE. Tanto la capacidad de transporte de electrones como la fosforilación oxidativa fueron similares entre todos los

grupos evaluados. Consistentemente, no encontramos diferencias significativas en el nivel de actividad glucolítica y fermentación láctica.

En el trabajo previo sobre CSE reportado por nuestro grupo, se utilizó la actividad en la enzima aconitasa como un biosensor endógeno de la formación de $O_2^{\bullet-}$. Con el objetivo de evaluar el compartimiento celular mayormente afectado por el flujo de $O_2^{\bullet-}$ inducido por CSE, se registraron tanto la actividad aconitasa mitocondrial como la citosólica [23]. En este reporte encontraron que la incubación de BAEC con CSE disminuyó la actividad de la aconitasa citosólica pero no así la mitocondrial, reflejando que el mayor flujo de este oxidante se produjo hacia el citosol y no hacia la matriz del organelo. A pesar de ésto, en este trabajo no fue evaluada la repercusión sobre los complejos de la cadena de transporte por lo que era importante estudiar su posible afectación. Nuestros resultados apoyarían el hecho de que el CSE no mediaría sus efectos a través de la afectación de la función mitocondrial.

Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en cultivos de BAEC expuestas a CSE

El estudio de la función mitocondrial fue complementado con la evaluación del potencial electroquímico transmembrana. El mantenimiento del potencial electroquímico a ambos lados la membrana mitocondrial interna depende de la indemnidad funcional de la mitocondria. Por lo tanto, modificaciones en este organelo inducidas por CSE podrían ser evidenciadas por un cambio en este potencial.

Con este objetivo, cultivos de BAEC fueron expuestos a CSE 30% durante la noche y, a continuación, las células fueron teñidas con JC-1 y la fluorescencia fue registrada mediante microscopía de fluorescencia (Figura 22). Comparando el valor de la relación entre fluorescencia de dímero/monómero (590nm/530nm) no encontramos diferencias significativas en los cultivos control comparado con los expuestos a CSE.

CONTROL

CSE 30%

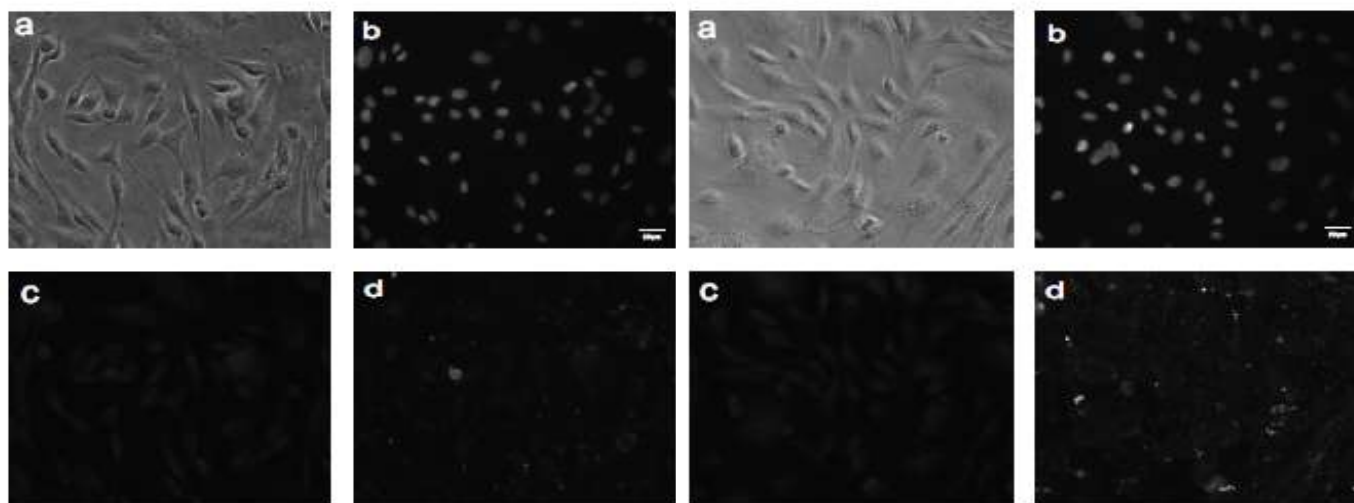


Figura 22. Evaluación de potencial de membrana mitocondrial con JC-1.

En la figura se muestran imágenes representativas de cultivos de BAEC no expuestas (Control) y expuestas a CSE 30%, mostrando imágenes de campo claro (a); con tinción nuclear por 4',6-diamidina-2'-fenilindol dihidroclorato (DAPI) (b); monómero (c) y dímero de JC-1 (d).

En conjunto, los resultados aportados por esta tesis, así como los previamente publicados por nuestro grupo, apuntan al no involucramiento inicial de la mitocondria en el daño inducido por CSE. Sin embargo, otros grupos han publicado datos que relacionan la exposición a CSE a alteraciones en la función mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas e inducción de senescencia celular en diferentes modelos de células epiteliales [188, 190].

Estudio de toxicidad por atrapadores de espín

Para iniciar el estudio de los efectos de los agentes atrapadores de espín a nivel celular comenzamos por evaluar su toxicidad. La determinación de un rango de concentraciones seguras para el uso de los compuestos evaluados, fue fundamental para planificar experimentos de protección frente a daño oxidativo celular. Por esta razón, cultivos de BAEC fueron incubadas en medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes de atrapador por 24 horas. A continuación, se registró la viabilidad celular mediante ensayo de MTT (Figura 23).

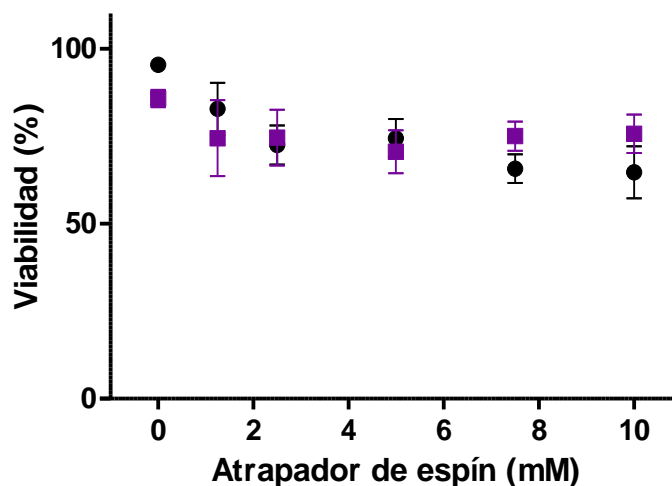


Figura 23. Ensayo de toxicidad de atrapadores de espín en cultivos de BAEC. En la figura se muestra el porcentaje de células viables con respecto al control, luego de la incubación durante la noche con medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de DMPO (●) o PBN (■). Media \pm DE.

En nuestros ensayos, en condiciones de hasta 1 mM, no encontramos diferencias significativas en la viabilidad celular. Sin embargo, por encima de esta concentración la viabilidad celular se ve comprometida tanto para DMPO como para PBN. Estos datos son concordantes con trabajos previamente

publicados [191]. De esta manera, las concentraciones utilizadas de atrapadores de espín en ensayos celulares fueron menores a 1 mM.

Daño oxidativo celular mediado por SIN-1

El SIN1 es un compuesto capaz de generar flujos de $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2\bullet^-$ a través de un mecanismo bien caracterizado. En solución, el anillo sindonimine se abre en una reacción catalizada por base, generando el producto SIN-1A. Luego, este último reduce al oxígeno molecular por un electrón generando $\text{O}_2\bullet^-$ y $\text{SIN1}\bullet^+$. Por último, el radical catiónico se descompone produciendo SIN1-C liberando una molécula de $\bullet\text{NO}$ en el proceso [192]. La velocidad de reacción entre $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2\bullet^-$, cercana al límite difusional, permite proponer al SIN1 como un compuesto dador de flujos de peroxinitrito. La elección de este compuesto como fuente de peroxinitrito para los ensayos con cultivos celulares, en lugar de una solución de peroxinitrito, se fundamenta en lo siguiente: 1) como fue mencionado previamente, la homólisis de peroxinitrito catalizada por protón, hace que al pH óptimo para los cultivos (*i.e.* pH 7,4) el peroxinitrito se descomponga rápidamente y, por lo tanto, la adición en bolo solo permitiría unos pocos segundos de exposición al oxidante; 2) por lo anteriormente mencionado, la adición de peroxinitrito en bolo al cultivo celular resultaría en una exposición heterogénea del cultivo al oxidante y sus derivados; 3) la infusión de peroxinitrito en solución por largos períodos de tiempo representaría un mayor riesgo de contaminación de los cultivos.

De esta manera, la incubación de BAEC a SIN-1 puede simular el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que puede verse en diversas patologías que afectan al endotelio. Por lo tanto, utilizamos este compuesto como un segundo modelo de daño oxidativo celular.

Desacoplamiento de eNOS mediante flujos de peroxinitrito

En trabajos previos de nuestro grupo se demostró que la exposición de la eNOS a flujos de peroxinitrito, produce modificaciones oxidativas postraduccionales que llevan a una alteración funcional denominada "desacoplamiento" [193]. En condiciones normales, la eNOS produce óxido nítrico, a partir de L-arginina, oxígeno molecular y electrones provenientes de NADPH. Sin embargo, cuando se produce el desacople de la enzima, los electrones transportados por esta son desviados a la reducción del oxígeno molecular produciendo $O_2^{\bullet-}$ en lugar de $\bullet NO$ [193]. Este hecho, resulta en el aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ por parte de la fracción de enzima modificada, al mismo tiempo que la fracción remanente de enzima nativa produce $\bullet NO$. De esta manera, ante el desacople de una fracción significativa de eNOS se puede provocar un flujo de peroxinitrito endógeno a nivel citoplasmático proveniente de esta enzima. Entonces, la producción de este oxidante puede ser evaluada a través de diferentes herramientas (e.g. sondas fluorescentes) como un indicador indirecto del desacople de la eNOS.

En nuestros experimentos, tratamos cultivos de BAEC con SIN-1 y luego de 24 horas de incubación registramos la producción de peroxinitrito mediante el uso de otra sonda fluorescente derivada de ácido borónico, en este caso fluoresceína boronato (Flb) [194]. En el caso de que el flujo de peroxinitrito generado por SIN-1 hubiera provocado el desacople de la eNOS, deberíamos registrar la oxidación del sonda frente a la activación de la enzima, indicando un aumento en la producción endógena de peroxinitrito. Los resultados resumidos en la figura 24, muestran la oxidación de la sonda en el tiempo luego de la activación de la eNOS en cultivos de BAEC previamente incubados con SIN1. Por un lado, vimos que la incubación con SIN1 provocó un leve desacople en la eNOS. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre las condiciones tratadas con SIN1 en presencia o ausencia de atrapadores de espín, tanto con DMPO como PBN.

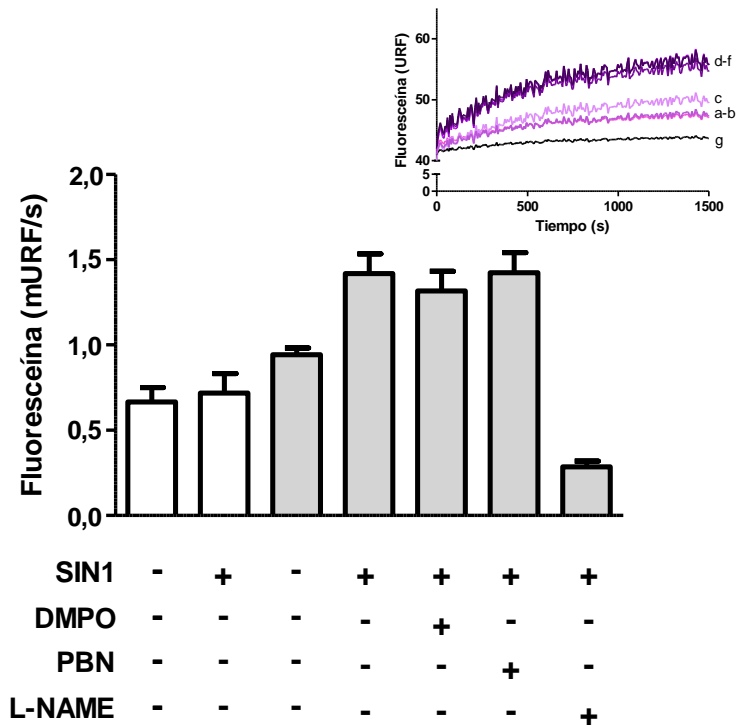


Figura 24. Producción de ONOO⁻ por cultivo de BAEC expuestas a SIN1.

La velocidad de oxidación de Flb refleja, de manera indirecta, el desacople de la eNOS. Se grafican las medias de las velocidades de producción de fluoresceína (barras) y registros primarios representativos de cada condición (inserto). A su vez, se representaron las medidas en ausencia de estímulo con ionomicina (blanco) y estimuladas con este ionóforo (gris). Las condiciones experimentales fueron: 1) BAEC no expuestas a SIN1 (a); 2) BAEC expuestas a SIN1 (b); 3) 1) + ionomicina, c; 4) 2) + ionomicina, d; 5) 4) + DMPO, e; 6) 4) + PBN, f; 7) 4) + L-NAME, g. Media \pm DE.

Aplicando un diseño experimental similar al nuestro, otro grupo demostró previamente un efecto protector del DMPO frente al desacople de eNOS inducido por peroxinitrito [191]. Sin embargo, en este trabajo la incubación con DMPO fue realizada a continuación de la exposición a SIN1, a diferencia de nuestros experimentos en los que la incubación fue simultánea. Esta diferencia metodológica es de gran relevancia ya que la función de atrapamiento de las nitronas depende estar disponibles al momento de la formación del radical

blanco. Como fue mencionado, las nitronas son capaces de reaccionar con diferentes especies radicalares, incluyendo $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3\bullet^-$ derivados de la homólisis del peroxinitrito, así como con radicales secundarios generados a partir de sus reacciones con biomoléculas. Sin embargo, las constantes de reacción entre nitronas y radicales son generalmente bajas, lo que sumado a la corta vida media de estas especies y a sus múltiples blancos a nivel intracelular, hace pensar que la acción evidenciada por estos investigadores ocurra a través de mecanismos diferentes al que intentamos probar en esta tesis. Efectivamente, los autores del trabajo citado estudian modificaciones postraduccionales en la eNOS producto de la incubación con SIN1, pero no se detienen en estudiar modificaciones oxidativas y no reportan efectos de DMPO sobre este punto. En cambio, estudian el estado de fosforilación de un residuo de serina (Ser^{1179}), encontrando que DMPO determina aumento de su actividad mediante el incremento de la fosforilación de este residuo, incluso en ausencia del tratamiento con SIN1.

La importancia de la protección de la eNOS frente al daño oxidativo, en situaciones de desbalance redox, fue evidenciada en un trabajo reciente de nuestro grupo [193]. En este artículo la utilización de un compuesto de organoselenio denominado difenildiselenuro, protegió a la eNOS del desacoplamiento inducido por flujos de peroxinitrito. El mecanismo propuesto para la protección involucra la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes (*i.e.* glutatión peroxidasa, peroxiredoxinas 1 y 3 [195]) aumentando la detoxificación catalítica de peroxinitrito y, por lo tanto, disminuye la concentración intracelular del mismo.

Actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa como biomarcador de daño oxidativo. Protección por atrapadores de espín.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima de la vía glucolítica y, por lo tanto, localizada en el citosol celular. Esta enzima posee un residuo de cisteína libre crítico para su función (Cis^{152}) y su oxidación lleva a la

inhibición de su actividad catalítica. La oxidación de este grupo tiol producto de la exposición a peroxinitrito fue estudiada previamente por nuestro grupo [91]. En este trabajo utilizamos a la GAPDH como marcador de daño oxidativo celular, midiendo su actividad en muestras de citosol de cultivos de BAEC expuestas a SIN1. Dado que el SIN1 es un agente generador de flujos de peroxinitrito, es esperable que la presencia de este oxidante, o la propagación del daño iniciado por éste, sean capaces de oxidar al grupo tiol de la Cis¹⁵² observándose una disminución en la actividad enzimática.

En la figura 25 se muestran los resultados de las medidas de actividad de GAPDH en cultivos de BAEC expuestas por 2 horas a SIN1, tanto en presencia o ausencia de atrapadores de espín. En primer lugar puede observarse una disminución global de la actividad específica en las muestras tratadas con SIN1 pero en ausencia de DTT (agente reductor de grupo tioles) durante el ensayo. En este caso, el incremento en las medidas de actividad luego de la incubación con DTT refleja el nivel de oxidación del tiol de la Cis¹⁵² de la GAPDH, tanto por oxidación espontánea debida a manipulación en presencia de oxígeno (barras blancas en figura 25), como por oxidación mediada por flujos de peroxinitrito (barras grises y negra en figura 25). Es de destacar que en ambas condiciones, con y sin DTT, la actividad de los cultivos que fueron expuestos a SIN1 no alcanza los niveles de la condición control. La incapacidad del DTT de recuperar la actividad de la enzima, sugiere la presencia de productos de sobreoxidación de la Cis¹⁵². Algunas de las reacciones de oxidación de grupos tioles pueden ser fácilmente reversibles (*i.e.* reducción de ácido sulfénico, R-SOH, por DTT para dar un tiol, R-SH), mientras que otras no lo son (*i.e.* oxidación de R-SOH a ácidos sulfínico, R-SO₂, o sulfónico, R-SO₃)[46]. Por lo tanto, inferimos que la incubación con SIN1 provocó la sobreoxidación de la Cis¹⁵² de la GAPDH y la consiguiente pérdida de actividad.

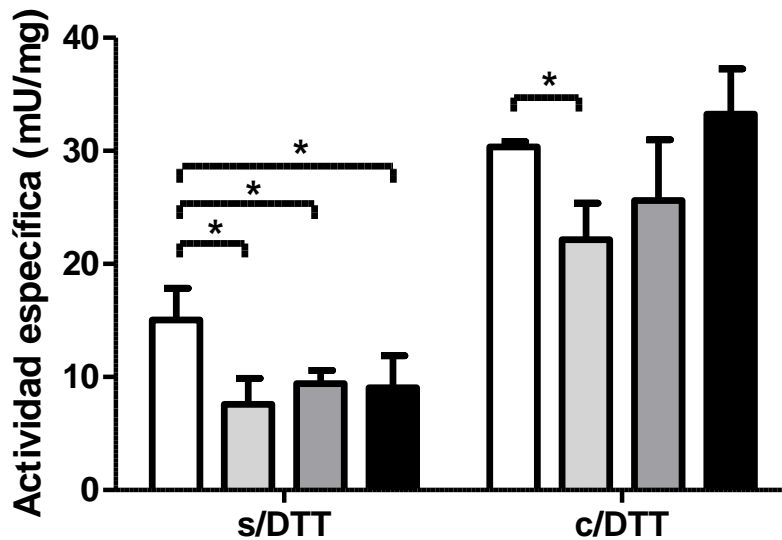


Figura 25. Estudio de actividad GAPDH en cultivos de BAEC expuestos a SIN1. En la figura se grafican las medidas de actividad GAPDH en fracción citosólica de cultivos de BAEC sin tratamiento (blanco), sin tratamiento expuestos a SIN1 (gris claro), precargados con DMPO y expuestos a SIN1 (gris oscuro), precargados con PBN y expuestos a SIN1 (negro). Además se agrupan los datos en función de que las medidas hayan sido realizadas en ausencia (s/DTT) o presencia (c/DTT) de DTT. Media \pm DE, * $p < 0,05$.

Por otro lado, nuestro modelo experimental también fue utilizado para evaluar el efecto de dos compuestos atrapadores de espín, DMPO y PBN, sobre la inactivación oxidativa de la GAPDH. En la figura 25 se muestran los resultados obtenidos con cultivos que fueron preincubados con estos compuestos previo a la exposición a SIN1. De manera similar a lo ya discutido, en ausencia de DTT la incubación con SIN1 determinó un descenso en la actividad específica de la GAPDH. A su vez, no encontramos diferencias significativas en la repercusión del SIN1 entre condiciones tratadas y no tratadas con atrapadores de espín. Sin embargo, una vez que las muestras fueron incubadas con DTT, la recuperación de la actividad enzimática fue mayor en los cultivos pretratados con PBN que en los expuestos a SIN1 en ausencia de atrapador, asemejándose a la actividad de la condición control. En el caso del DMPO, la respuesta observada no fue similar al PBN y no encontramos un efecto

significativo de este atrapador en la protección de la inactivación de GAPDH. Es posible que esta diferencia sea debida a la ausencia de atrapamiento de radicales centrados en GAPDH por parte de DMPO o, por el contrario, de una unión estable a la Cis¹⁵² lo que podría impedir la participación de este residuo en el ciclo catalítico manteniendo la inactivación de la enzima.

Para dilucidar esta interrogante, intentamos la detección de aductos DMPO-proteína mediante western blot bajo estas condiciones experimentales. La detección de una banda correspondiente al aducto DMPO-GAPDH (~36 kDa) apoyaría la formación de un radical centrado en esta proteína. Sin embargo, no pudimos detectar señales correspondientes a estos aductos en nuestras condiciones experimentales. Es probable que la intensidad del flujo de ONOO⁻ en combinación con la baja concentración de DMPO utilizado, no hayan sido suficientes para generar un nivel detectable de estos aductos. Sin embargo, tampoco pudimos detectarlos con mayores concentraciones de SIN1 (500 μM) y DMPO (10 mM). Por lo tanto, realizamos experimentos adicionales para evaluar la formación de estos aductos. En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos con dos modelos diferentes: a) modelo *in vitro*, mioglobina tratada con H₂O₂ en presencia de DMPO; b) modelo *in cellula*, cultivos de BAEC tratados con DMNQ por 24 hs en presencia de DMPO. En la figura 26a se demuestra la formación de aductos DMPO-Mb ante la exposición a H₂O₂, de forma consistente con los resultados presentados en la figura 10 así como con los reportados en la literatura [130]. A su vez, para evaluar la formación de estos aductos en cultivos celulares, replicamos condiciones experimentales previamente exitosas [196]. En la figura 26b se muestra la formación de aductos DMPO-proteína en cultivos de BAEC expuestas a DMNQ, compuesto capaz de generar flujos intracelulares de O₂^{•-} producto de su participación en ciclos redox de reducción univalente del oxígeno molecular. De esta manera, pudimos detectar estos aductos en nuestros cultivos probablemente debido a una mayor duración del flujo de oxidantes en comparación con la incubación con SIN1 (24 hs vs ~3-4 hs). De acuerdo a estimaciones previas de nuestro grupo la incubación con DMNQ 20 μM lleva a la producción endógena de 2 μM/min de O₂^{•-} en BAEC [20]. Como resultado, nuestros cultivos fueron expuestos a un acumulado de 2,88 mM de esta especie reactiva al final de las

24hs de incubación. En cambio, en los cultivos expuestos a SIN1 el flujo de radicales fue considerablemente menor. De hecho, asumiendo una producción equimolar de ONOO^- por parte del SIN1 agregado (*i.e.* 100 μM) la exposición a especies reactivas sería de al menos un orden de magnitud menor. No obstante, como fue mencionado en la introducción, la células cuentan con eficientes mecanismos de detoxificación de especies reactivas, por lo que sería esperable que solo una fracción de las especies generadas pudieran provocar modificaciones en biomoléculas celulares. Sin embargo, a mayores producciones netas de estas especies mayor es la probabilidad de escape y acumulación aductos con DMPO. Por esta razón, es esperable que la exposición a DMNQ haya permitido la acumulación de aductos DMPO-proteína suficiente para superar el límite de detección de la técnica de immuno-spin trapping. A pesar de esto, utilizando técnicas más sensibles de detección (*i.e.* Flb), nuestro grupo demostró previamente que la incubación de BAEC con SIN1, resulta en la presencia de ONOO^- en el interior celular, incluso con concentraciones menores a las nuestras (20 μM) [194].

Por otro lado, aportes previos de nuestro grupo así como de otros investigadores, demostraron mediante immuno-spin trapping la formación de aductos DMPO-proteína *in vivo* y *ex vivo* en modelos animales de enfermedad [128-129]. Entonces, quizás la formación de estos aductos requiera de un estado de distrés oxidativo más avanzado y, de esta manera, sea más factible su acumulación y detección a nivel celular.

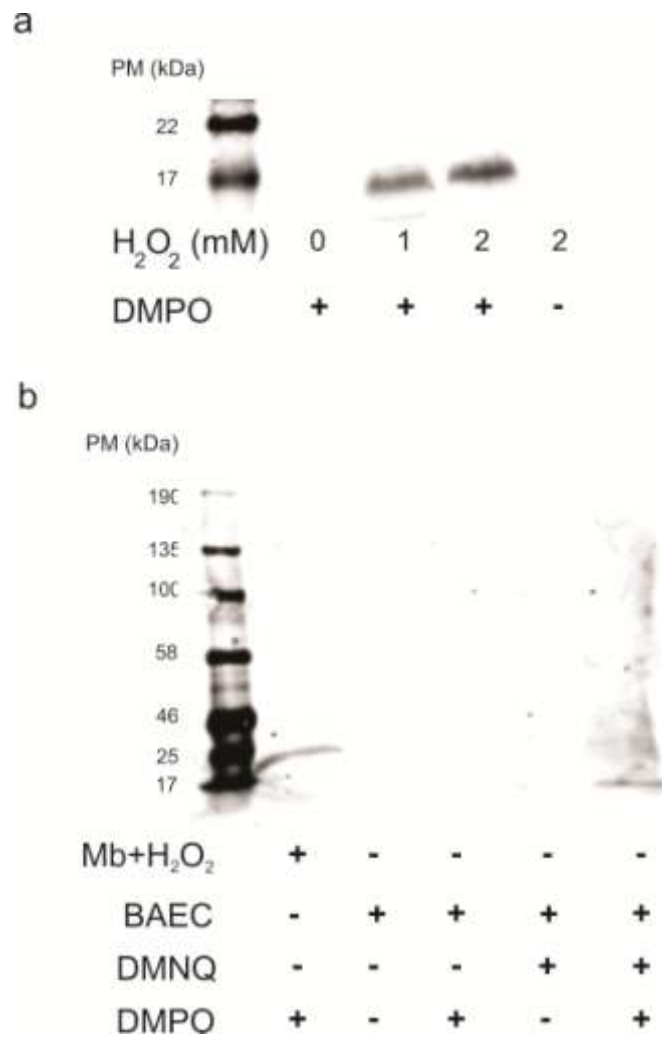


Figura 26. Detección de aductos DMPO-proteína por immuno-spin trapping. En la figura se muestra el análisis por western blot de aductos DMPO-proteína en: a) mioglobina 500 μ M expuesta a H₂O₂ en presencia o ausencia de DMPO 30 mM por 30 minutos a temperatura ambiente; en b) lisados de BAEC expuestas a DMNQ 20 μ M en ausencia o presencia de DMPO 10 mM. A su vez, en el carril 2 se sembró una muestra de Mb/H₂O₂/DMPO como control positivo.

Protección por atrapadores de espín de la disfunción mitocondrial inducida por SIN1

En el marco del estudio de las modificaciones del metabolismo energético inducidas por SIN1, conocer el estado del funcionamiento mitocondrial resulta un aspecto fundamental. En este sentido, diseñamos experimentos para medir el impacto de la incubación con SIN1 sobre el consumo de oxígeno por parte de cultivos de BAEC. Para estos experimentos, utilizamos cultivos de BAEC que fueron expuestos a SIN1 durante 2 horas previo al ensayo. A su vez, para estudiar el efecto de los atrapadores de espín, los cultivos fueron precargados con DMPO o PBN antes de la incubación con SIN1.

El protocolo de adición de moduladores de la ETC en estos experimentos fue igual al mencionado para los ensayos de exposición a CSE. Sin embargo, a diferencia de los resultados de estos últimos, la incubación con SIN1 tuvo consecuencias importantes sobre la actividad de la ETC (figura 27). En primer lugar, registramos una caída del consumo basal luego de la incubación con SIN1. El descenso en este consumo sugiere, globalmente, la presencia de un menor número de mitocondrias funcionales. Además, también encontramos diferencias en la respuesta al primer inhibidor agregado, oligomicina. El freno al consumo de oxígeno provocado por oligomicina está en relación con el control ejercido por la ATP sintasa sobre el transporte de electrones (*i.e.* acoplamiento mitocondrial). De esta manera, en la figura 27 vemos que la respuesta a la incubación con oligomicina fue menor, en las expuestas a SIN1 que en las no expuestas). Por otro lado, también estudiamos el efecto de SIN1 sobre la máxima capacidad de transporte de electrones midiendo el consumo de O₂ luego del agregado de un ionóforo de protones, el FCCP. La disipación del gradiente electroquímico provoca un aumento del flujo de electrones a través de la ETC y finalmente en un aumento del consumo de O₂. Encontramos que el incremento del consumo de O₂ en respuesta a la adición de FCCP a los cultivos, fue menor en las células expuestas a SIN1 que en las condiciones control. Por el contrario, los cultivos que habían sido precargados con DMPO, fueron capaces de prevenir el efecto deletéreo del SIN1 evitando una caída de los parámetros de función mitocondrial estudiados. Es decir que, el DMPO evitó el descenso de la respiración basal, así como de la capacidad de producción

de ATP (consumo de O₂ sensible a oligomicina) y de la máxima capacidad de transporte de electrones (consumo de O₂ en respuesta a FCCP) (Figura 27).

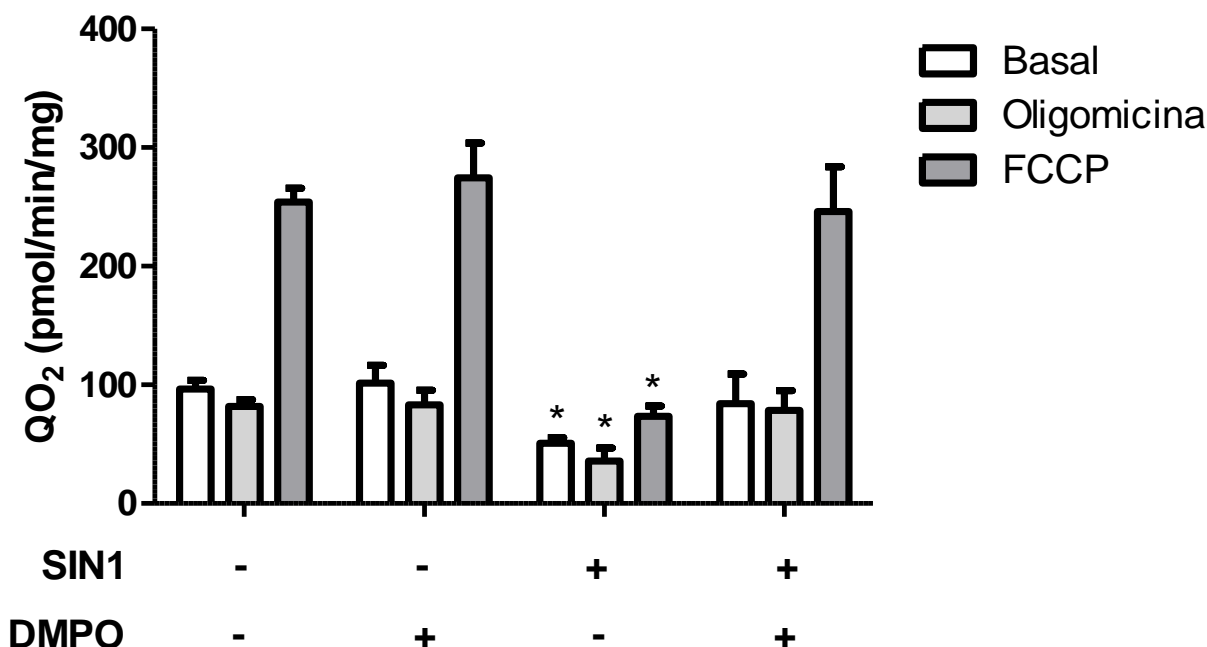


Figura 27. Análisis de función mitocondrial en cultivos de BAEC expuestas a SIN1. Protección por DMPO. En el gráfico se muestran los consumos de oxígeno de cultivos de BAEC no expuestas o expuestas a SIN1, en ausencia o presencia de DMPO. Se registraron los consumos basales (blanco), luego de la adición de oligomicina (gris claro), y máximo (gris oscuro). Media \pm DE, *p<0,05.

Como fue explicado previamente, el analizador de flujo metabólico registra en forma simultánea el pH del medio durante el ensayo. Adicionalmente, estos datos son utilizados para el cálculo de la velocidad de acidificación del medio en respuesta a los compuestos agregados. En nuestros experimentos registramos un incremento en la velocidad de acidificación del medio como resultado del agregado de inhibidores de la ETC, sugiriendo un direccionamiento de metabolitos desde la vía oxidativa aeróbica hacia la

fermentación láctica. Sin embargo, en los cultivos expuestos a SIN1 esta respuesta fue menos pronunciada, sugiriendo una alteración importante del metabolismo energético, probablemente por afectación simultánea de la GAPDH de acuerdo a los resultados previamente mencionados. Por el contrario, en los cultivos precargados con DMPO, la nitrona fue capaz de prevenir las modificaciones inducidas por SIN1 evidenciándose un comportamiento similar a la condición control.

En el caso de los cultivos pretratados con PBN, no encontramos diferencias significativas para los parámetros evaluados. Sin embargo, existen reportes de protección de la función mitocondrial por parte del tratamiento con PBN. En un modelo de isquemia reperusión cerebral, se evidenció que el PBN fue capaz de recuperar la caída de la función mitocondrial que ocurre durante falla energética secundaria (*i.e.* horas después de reiniciada la circulación sanguínea) [197-198]. Por lo tanto, será necesario continuar trabajando para confirmar la ausencia de efecto sobre el metabolismo mitocondrial de este tipo celular.

Las nitronas han demostrado efectos protectores de la función mitocondrial en diferentes modelos experimentales. Estudios realizados por diferentes autores han evidenciado que el rol protector de la actividad mitocondrial ocurre a través de diferentes mecanismos: 1) Zou et al. reportan que el tratamiento con DMPO revierte la disminución de la expresión y actividad de los complejos en un modelo de isquemia-reperusión [199]; 2) el tratamiento de cultivos de BAEC con nitronas (*i.e.* DMPO y PBN) protege de la apoptosis inducida por H₂O₂, a través de la promoción de la traslocación de Nrf2 al núcleo y la expresión de enzimas de fase 2 (*e.g.* HO-1, GR, GPx) [200]; 3) en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica la administración de DMPO recupera la función mitocondrial en neuronas del asta anterior de la médula espinal [128]; 4) en un modelo de isquemia hepática el DMPO disminuyó la presencia de biomarcadores de daño oxidativo lipídico (*e.g.* MDA, 4-HNE) [201]; 5) la presencia de DMPO previene la formación de radical tiilo, así como de derivados sulfonilados, en tioles del complejo I de la ETC ante la incubación con menadiona [202].

En nuestro modelo, las mitocondrias de las BAEC fueron expuestas a un flujo exógeno de ONOO^- generado durante la descomposición de SIN1. Como resultado de este protocolo experimental, reacciones de oxidación/nitración de los complejos de la ETC son esperables y, en consecuencia, la actividad de los complejos afectada. Ha sido propuesto que la actividad de transferencia de electrones del complejo I conduce a la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y a la formación de residuos tiilo y tirosilo atrapables por DMPO. La formación de estos derivados radicalares de los residuos aminoacídicos se asoció a una disminución de la actividad del complejo representando un mecanismo de retroalimentación negativa [203]. A su vez, ha sido evidenciado por nuestro grupo que la formación de ONOO^- en mitocondrias aisladas expuestas a $\bullet\text{NO}$, lleva a la inhibición de los complejos I y II, así como de la actividad ATPasa del complejo IV [204]. Entonces, resulta consistente con el conocimiento acumulado que, en nuestras condiciones experimentales, la presencia de DMPO contrarreste los potenciales efectos deletéreos mitocondriales generados por flujos de especies reactivas.

CONCLUSIONES

Reacciones de oxidación proteica en cadena en ambientes hacinados

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información de relevancia sobre fenómenos redox en condiciones raramente exploradas. Los diseños experimentales utilizados intentaron emular algunas de las características fisicoquímicas de los compartimientos celulares (*e.g.* elevada concentración de macromoléculas), con el objetivo de estudiar el rol del hacinamiento molecular en reacciones redox.

En este sentido, soluciones de BSA hicieron a la vez de agente hacinador y de biomarcador para la detección de este tipo de reacciones. Por lo tanto, frente a la generación de radicales proteicos en ambientes hacinados, encontramos que la alta densidad de blancos moleculares favoreció el inicio de cadenas de oxidación no evidentes en soluciones diluidas. Entonces, mediante la aplicación de diferentes técnicas analíticas demostramos que: 1) la exposición de soluciones hacinadas de BSA a radicales, desencadenó reacciones de oxidación en cadena registradas mediante el consumo de oxígeno, oxidación de sondas redox fluorescentes (*i.e.* DHR y CBA), el atrapamiento de radicales tiilo con PBN y su detección por EPR, así como la emisión de quimioluminiscencia producto de la oxidación residuos de triptofano; 2) la formación de estas cadenas fue dependiente de la concentración de oxígeno en solución, ya que el desplazamiento de este gas mediante flujos de argón, disminuyó los niveles de consumo de oxígeno así como la formación de hidroperóxidos proteicos; 3) mediante la adición de agentes capaces de establecer una competencia por los radicales involucrados, encontramos que compuestos de bajo peso molecular pueden actuar como facilitadores (*i.e.* NaNO_2) o inhibidores (*i.e.* cisteína, GSH) de este tipo de reacciones; 4) la coexistencia de las condiciones mencionadas resulta en la formación de ciclos redox capaces de propagar el daño oxidativo proteico independizándose de los radicales inicialmente generados; 5) la incubación con agentes atrapadores de espín resultó en la restricción del fenómeno observado. Por un lado, el DMPO fue capaz de inhibir la oxidación del residuos de triptofano cuando la actividad peroxidasa de la mioglobina fue la fuente de radicales proteicos. Por otro lado, el PBN fue un eficiente inhibidor de las cadenas de propagación radicalar en las soluciones de BSA que fueron expuestas a ONOO^- .

Efectos biológicos de atrapadores de espín

A lo largo de las últimas tres décadas los agentes atrapadores de espín, y las nitronas en particular, han sido utilizados como compuestos capaces de disminuir las repercusiones celulares del aumento en la producción de especies reactivas. Estados patológicos en los que el estrés oxidativo juega un rol central han brindado la posibilidad de testear la acción farmacológica de estos compuestos, alcanzando incluso ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, mecanismos de acción alternativos a la detoxificación estequiométrica de especies reactivas no han sido profundamente estudiados.

En esta tesis, utilizamos cultivos de células endoteliales de aorta bovina desafiadas con flujos de ONOO^- como modelo celular para el estudio de agentes atrapadores de espín. Los resultados encontrados fueron disimiles para las nitronas estudiadas. Inicialmente, estudiamos el nivel de toxicidad de estos compuestos sobre nuestros cultivos y encontramos que ambos, DMPO y PBN, presentaron baja toxicidad a concentraciones en el orden μM . Sin embargo, a concentraciones mayores estos compuestos parecen ser tóxicos para este tipo de cultivos. Este dato apoya la hipótesis de que el mecanismo de acción de estos compuestos no esté vinculado a la reacción bimolecular con radicales libres generados a nivel celular. Como fue mencionado previamente, la relativamente baja velocidad de reacción de éstos compuestos obliga a alcanzar altas concentraciones en el interior celular, para de esta manera competir eficientemente con los blancos celulares. En este contexto, cobra relevancia la posibilidad de que la interrupción de reacciones en cadena, más que un atrapamiento global indiscriminado, sea uno de potenciales mecanismos que expliquen el rol protector de estos agentes.

A continuación, evaluamos la capacidad de las nitronas de proteger los cultivos de células endoteliales de las modificaciones provocadas por ONOO^- . Diferentes trabajos previos de nuestro grupo han tenido como objetivo de estudio las repercusiones celulares de esta especie reactiva del nitrógeno, por lo que retomamos sus aportes para evaluar efecto de los atrapadores de espín. En primer lugar, dirigimos nuestros esfuerzos a estudiar la capacidad de las nitronas de prevenir el desacople de la eNOS inducido por ONOO^- [193-194].

Sin embargo, no registramos diferencias significativas entre los cultivos tratados y no tratados con DMPO o PBN. A continuación, evaluamos el impacto del flujo de ONOO^- sobre dos actores centrales del metabolismo energético celular, la GAPDH y la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En el caso de la primera, la incubación con SIN1 llevó a la disminución de la actividad enzima recuperable por DTT, sugiriendo la sobreoxidación de la Cis^{152} (residuo crítico para la su actividad [91]). Sin embargo, la incubación con PBN permitió recuperar la actividad a niveles comparables a los del control no expuesto a SIN1.

Por otro lado, con el objetivo de complementar estos resultados, realizamos análisis de flujo metabólico para evaluar las modificaciones de la función mitocondrial en nuestro modelo experimental. Como resultado, encontramos que el flujo de ONOO^- generado por SIN1 disminuyó todos los parámetros funcionales evaluados de la ETC. A pesar de esto, la incubación con DMPO recuperó la capacidad de transporte de electrones así como su regulación por parte de la ATP sintasa.

En conjunto, los datos presentados en esta tesis realizan aportes sobre el comportamiento de especies reactivas en condiciones de hacimiento molecular, aspectos previamente poco estudiados en el área de la bioquímica redox. A su vez, nuestros resultados sientan la bases para proponer un nuevo mecanismo de acción de los agentes atrapadores de espín, al mismo tiempo que evalúa sus efectos sobre el metabolismo energético celular en células endoteliales, aspectos escasamente estudiados en este modelo.

Por último, la relevancia de estos resultados queda reflejada en publicaciones de nuestro grupo [118] y otros, quienes a partir de nuestros datos, registraron fenómenos similares en modelos diferentes a los utilizados en esta tesis [205-206].

PUBLICACIONES

A continuación se listan publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis

- Aicardo, A., Mastrogiovanni, M., Cassina, A., & Radi, R. (2018). Propagation of free-radical reactions in concentrated protein solutions. *Free radical research*, 52(2), 159-170.
- Santos, G. B., Gonzalez-Perilli, L., Mastrogiovanni, M., Aicardo, A., Cerdeira, C. D., Trostchansky, A., & Brigagão, M. R. P. L. (2017). Nitroxide 4-hydroxy-2, 2', 6, 6'-tetramethylpiperidine 1-oxyl (Tempol) inhibits the reductase activity of protein disulfide isomerase via covalent binding to the Cys400 residue on CXXC redox motif at the a' active site. *Chemico-biological interactions*, 272, 117-124.
- Aicardo, A., Martinez, D. M., Campolo, N., Bartesaghi, S., & Radi, R. (2016). Biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite: sources, targets and biological implications. In *Biochemistry of Oxidative Stress* (pp. 49-77). Springer, Cham.

AGRADECIMIENTOS

A las agencias que financiaron el trabajo realizado durante mi tesis:

- Agencia Nacional de Investigación e Innovación con el otorgamiento de una beca de Doctorado.
- Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República con el otorgamiento de una beca de finalización.
- Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República con el financiamiento de un proyecto de Iniciación a la Investigación

A mi director, Prof. Dr. Rafael Radi, por sus aportes durante el diseño del proyecto de Doctorado, la planificación del trabajo experimental, la discusión de resultados y la redacción de la presente tesis.

A Mauri (Lic. Mauricio Mastrogiovanni), por su dedicación durante el estudio de nitración de pHPA por LC-MS/MS.

A Ruth (Dra. Natalia Ríos), por la síntesis de los boronatos usados en esta tesis

A Pao (Lic. Paola Rosenberg) por los muchos geles y litros de medio de cultivo y buffers

A los amigos del laboratorio, por hacer que la risa sea parte de la rutina

Al resto de los compañeros del CEINBIO, por estar siempre dispuestos a ayudar

A Juli y Anita, por haber compartido este proceso

A Cristina y Luis Alberto, por una vida de apoyo incondicional

REFERENCIAS

1. Neta, P., R.E. Huie, and A.B. Ross, *Rate constants for reactions of peroxy radicals in fluid solutions*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1990. **19**(2): p. 413-513.
2. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
3. Sies, H. and D.P. Jones, *Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents*. Nature reviews Molecular cell biology, 2020. **21**(7): p. 363-383.
4. Schröder, K., *Redox control of angiogenesis*. Antioxidants & redox signaling, 2019. **30**(7): p. 960-971.
5. Förstermann, U., N. Xia, and H. Li, *Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis*. Circulation research, 2017. **120**(4): p. 713-735.
6. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. The Journal of physiology, 2003. **552**(2): p. 335-344.
7. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 2015: Oxford university press, USA.
8. Radi, R., et al., *Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates*. Free Radical Biology and Medicine, 1990. **8**(2): p. 121-126.
9. Zangar, R.C., D.R. Davydov, and S. Verma, *Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450*. Toxicology and applied pharmacology, 2004. **199**(3): p. 316-331.
10. Wardman, P., *Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1989. **18**(4): p. 1637-1755.
11. Ferradini, C., et al., *The reaction between superoxide anion and hydrogen peroxide*. Photochemistry and Photobiology, 1978. **28**(4-5): p. 697-700.
12. Fridovich, I., *Superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 147-59.
13. Klug, D., J. Rabani, and I. Fridovich, *A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis*. Journal of Biological Chemistry, 1972. **247**(15): p. 4839-4842.
14. Tainer, J.A., et al., *Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 284-287.
15. Getzoff, E.D., et al., *Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 287-290.
16. Moreno, D.M., et al., *Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration*. Archives of biochemistry and biophysics, 2011. **507**(2): p. 304-309.
17. MacMillan-Crow, L., et al., *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(21): p. 11853-11858.
18. Brand, M.D., *Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **100**: p. 14-31.
19. Tyler, D.D., *Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver*. Biochemical journal, 1975. **147**(3): p. 493-504.
20. Quijano, C., et al., *Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007. **293**(6): p. H3404-H3414.
21. Emptage, M., et al., *Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(18): p. 11106-11111.

22. Castro, L., et al., *Aconitases: Non-redox iron–sulfur proteins sensitive to reactive species*. Accounts of chemical research, 2019. **52**(9): p. 2609-2619.
23. Peluffo, G., et al., *Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2009. **296**(6): p. H1781-H1792.
24. Aicardo, A., et al., *Biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite: sources, targets and biological implications*, in *Biochemistry of Oxidative Stress*. 2016, Springer. p. 49-77.
25. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(24): p. 9265-9269.
26. Palmer, R.M., A. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-526.
27. Félétou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture)*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2006. **291**(3): p. H985-H1002.
28. Martásek, P., et al., *The C331A mutant of neuronal nitric-oxide synthase is defective in arginine binding*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(52): p. 34799-34805.
29. Zou, M.-H., C. Shi, and R.A. Cohen, *Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(6): p. 817-826.
30. Qian, J. and D. Fulton, *Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium*. Frontiers in physiology, 2013. **4**: p. 347.
31. Rocha, B.S., et al., *Pepsin is nitrated in the rat stomach, acquiring antiulcerogenic activity: a novel interaction between dietary nitrate and gut proteins*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **58**: p. 26-34.
32. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. Nature medicine, 2003. **9**(12): p. 1498-1505.
33. Maia, L.B., et al., *Nitrite reductase activity of rat and human xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, and aldehyde oxidase: evaluation of their contribution to NO formation in vivo*. Biochemistry, 2015. **54**(3): p. 685-710.
34. Nottingham, W.C. and J.R. Sutter, *Kinetics of the oxidation of nitric oxide by chlorine and oxygen in nonaqueous media*. International journal of chemical kinetics, 1986. **18**(11): p. 1289-1302.
35. Padmaja, S. and R. Huie, *The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals*. Biochemical and biophysical research communications, 1993. **195**(2): p. 539-544.
36. Madej, E., et al., *Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. **44**(12): p. 2013-2018.
37. Eiserich, J., et al., *Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals*. Biochemical journal, 1995. **310**(3): p. 745-749.
38. Goldstein, S. and G. Czapski, *The reaction of NO· with O₂⁻ and HO₂⁻: A pulse radiolysis study*. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **19**(4): p. 505-510.
39. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(4): p. 1620-1624.
40. Romero, N., et al., *Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite: isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(45): p. 44049-44057.

41. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi, *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(7): p. 3566-3571.
42. Alvarez, M.N., et al., *Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to Trypanosoma cruzi*. Archives of biochemistry and biophysics, 2004. **432**(2): p. 222-232.
43. Ferrer-Sueta, G. and R. Radi, *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals*. ACS chemical biology, 2009. **4**(3): p. 161-177.
44. Denicola, A., et al., *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*. Archives of biochemistry and biophysics, 1996. **333**(1): p. 49-58.
45. Ferrer-Sueta, G., et al., *Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration*. Chemical reviews, 2018. **118**(3): p. 1338-1408.
46. Trujillo, M., B. Alvarez, and R. Radi, *One-and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates*. Free radical research, 2016. **50**(2): p. 150-171.
47. Zhang, X., et al., *Pulse radiolysis of 2-mercaptoethanol in oxygenated aqueous solution. Generation and reactions of the thiylperoxyl radical*. The Journal of Physical Chemistry, 1994. **98**(26): p. 6541-6547.
48. Campolo, N., S. Bartesaghi, and R. Radi, *Metal-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems*. Redox Report, 2014. **19**(6): p. 221-231.
49. Bartesaghi, S., et al., *Lipid peroxyl radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes*. Chemical research in toxicology, 2010. **23**(4): p. 821-835.
50. Van Der Vliet, A., et al., *Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 7617-7625.
51. Thomas, D.D., et al., *Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: An alternative to the NO/O reaction*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 12691-12696.
52. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(12): p. 4003-4008.
53. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. Accounts of chemical research, 2013. **46**(2): p. 550-559.
54. Pehar, M., et al., *Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **41**(11): p. 1632-1644.
55. Grimsrud, P.A., et al., *Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(32): p. 21837-21841.
56. O'Donnell, V.B., et al., *Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with α -tocopherol*. Biochemistry, 1997. **36**(49): p. 15216-15223.
57. Baker, P.R., et al., *Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(32): p. 11577-11582.
58. Baker, P.R., et al., *Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(8): p. 989-1003.
59. Trostchansky, A., et al., *Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate*. Biochemistry, 2007. **46**(15): p. 4645-4653.
60. Trostchansky, A., et al., *Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(15): p. 12891-12900.
61. Zhang, J., et al., *Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension*. Circulation research, 2010. **107**(4): p. 540-548.

62. Villacorta, L., et al., *Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts*. Cardiovascular research, 2013. **98**(1): p. 116-124.
63. Koenitzer, J.R., et al., *Fatty acid nitroalkenes induce resistance to ischemic cardiac injury by modulating mitochondrial respiration at complex II*. Redox biology, 2016. **8**: p. 1-10.
64. Rudolph, T.K., et al., *Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2010. **30**(5): p. 938-945.
65. Kennett, E.C., et al., *Peroxynitrite modifies the structure and function of the extracellular matrix proteoglycan perlecan by reaction with both the protein core and the heparan sulfate chains*. Free Radical Biology and Medicine, 2010. **49**(2): p. 282-293.
66. Kennett, E.C. and M.J. Davies, *Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **47**(4): p. 389-400.
67. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares α -tocopherol during lipid peroxidation: greater oxidant protection from the pair nitric oxide/ α -tocopherol than α -tocopherol/ascorbate*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(15): p. 10812-10818.
68. Cuddihy, S.L., et al., *Ascorbate interacts with reduced glutathione to scavenge phenoxyl radicals in HL60 cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. **44**(8): p. 1637-1644.
69. Bisby, R.H. and A.W. Parker, *Reaction of ascorbate with the α -tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems*. Archives of biochemistry and biophysics, 1995. **317**(1): p. 170-178.
70. Ford, E., M.N. Hughes, and P. Wardman, *Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32**(12): p. 1314-1323.
71. Szabó, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nature reviews Drug discovery, 2007. **6**(8): p. 662-680.
72. Negre-Salvayre, A., et al., *Role of reactive oxygen species in atherosclerosis: Lessons from murine genetic models*. Free Radical Biology and Medicine, 2020. **149**: p. 8-22.
73. Zhong, S., et al., *An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases*. Free Radical Biology and Medicine, 2019. **144**: p. 266-278.
74. Ignarro, L.J. and C. Napoli, *Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis*. Current diabetes reports, 2005. **5**(1): p. 17-23.
75. Beckmann, J.S., et al., *Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry*. Biological chemistry Hoppe-Seyler, 1994. **375**(2): p. 81-88.
76. Depre, C., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque*. Cardiovascular research, 1999. **41**(2): p. 465-472.
77. Dikalov, S., et al., *Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2019. **316**(3): p. H639-H646.
78. Shemiakova, T., et al., *Atherosclerosis as Mitochondriopathy: Repositioning the Disease to Help Finding New Therapies*. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2021. **8**: p. 374.
79. Dikalov, S.I., et al., *Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension*. Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(2): p. 281-294.

80. Gioscia-Ryan, R.A., et al., *Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice*. The Journal of physiology, 2014. **592**(12): p. 2549-2561.
81. Rossman, M.J., et al., *Chronic supplementation with a mitochondrial antioxidant (MitoQ) improves vascular function in healthy older adults*. Hypertension, 2018. **71**(6): p. 1056-1063.
82. Redondo-Horcajo, M., et al., *Cyclosporine A-induced nitration of tyrosine 34 MnSOD in endothelial cells: role of mitochondrial superoxide*. Cardiovascular research, 2010. **87**(2): p. 356-365.
83. Oliveira, C.H., et al., *Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria*. The FASEB Journal, 2005. **19**(2): p. 1-14.
84. Ballinger, S.W., et al., *Hydrogen peroxide–and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells*. Circulation research, 2000. **86**(9): p. 960-966.
85. Madamanchi, N.R. and M.S. Runge, *Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation research, 2007. **100**(4): p. 460-473.
86. Culic, O., M. Gruwel, and J. Schrader, *Energy turnover of vascular endothelial cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1997. **273**(1): p. C205-C213.
87. Quintero, M., et al., *Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(14): p. 5379-5384.
88. Tossounian, M.-A., B. Zhang, and I. Gout, *The Writers, Readers, and Erasers in Redox Regulation of GAPDH*. Antioxidants, 2020. **9**(12): p. 1288.
89. Hyslop, P., et al., *Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(4): p. 1665-1675.
90. Broniowska, K.A. and N. Hogg, *Differential mechanisms of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosothiols and NO in cellular and cell-free conditions*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2010. **299**(4): p. H1212-H1219.
91. Souza, J.M. and R. Radi, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite*. Archives of biochemistry and biophysics, 1998. **360**(2): p. 187-194.
92. Little, C. and P. O'brien, *Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. European journal of biochemistry, 1969. **10**(3): p. 533-538.
93. McDonald, L.J. and J. Moss, *Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(13): p. 6238-6241.
94. Brandes, N., S. Schmitt, and U. Jakob, *Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins*. Antioxidants & redox signaling, 2009. **11**(5): p. 997-1014.
95. van der Reest, J., et al., *Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 1-16.
96. Seidler, N.W., *Basic biology of GAPDH*. GAPDH: Biological Properties and Diversity, 2013: p. 1-36.
97. Tabata, F., et al., *Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker*. Antioxidants, 2021. **10**(4): p. 503.
98. Brioschi, M., et al., *S-Thiolation targets albumin in heart failure*. Antioxidants, 2020. **9**(8): p. 763.
99. Fujii, R., et al., *Oxidized human serum albumin as a possible correlation factor for atherosclerosis in a rural Japanese population: The results of the Yakumo Study*. Environmental health and preventive medicine, 2018. **23**(1): p. 1-7.

100. Lim, P.S., et al., *Serum oxidized albumin and cardiovascular mortality in normoalbuminemic hemodialysis patients: a cohort study*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70822.
101. Taylor, A.E., D.C. Johnson, and H. Kazemi, *Environmental tobacco smoke and cardiovascular disease. A position paper from the Council on Cardiopulmonary and Critical Care, American Heart Association*. Circulation, 1992. **86**(2): p. 699-702.
102. Li, Y., et al., *Healthy lifestyle and life expectancy free of cancer, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: prospective cohort study*. bmj, 2020. **368**.
103. Pryor, W.A. and K. Stone, *Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite a*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. **686**(1): p. 12-27.
104. Church, D.F. and W.A. Pryor, *Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications*. Environmental health perspectives, 1985. **64**: p. 111-126.
105. Murohara, T., et al., *Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1994. **266**(3): p. H874-H880.
106. Celermajer, D.S., et al., *Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults*. Circulation, 1993. **88**(5): p. 2149-2155.
107. Wu, K., et al., *Cigarette smoke extract increases mitochondrial membrane permeability through activation of adenine nucleotide translocator (ANT) in lung epithelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2020. **525**(3): p. 733-739.
108. Ballweg, K., et al., *Cigarette smoke extract affects mitochondrial function in alveolar epithelial cells*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2014. **307**(11): p. L895-L907.
109. Mannam, P., et al., *MKK3 influences mitophagy and is involved in cigarette smoke-induced inflammation*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **101**: p. 102-115.
110. Gornati, R., et al., *Protein carbonylation in human endothelial cells exposed to cigarette smoke extract*. Toxicology letters, 2013. **218**(2): p. 118-128.
111. Davies, M.J., *Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods*. Methods, 2016. **109**: p. 21-30.
112. Hawkins, C.L., *EPR spin trapping of protein radicals*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(9): p. 1072-1086.
113. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014. **1840**(2): p. 708-721.
114. Kalyanaraman, B., et al., *Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical-and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols—a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 Ghz)*. Analytical biochemistry, 1996. **241**(1): p. 75-81.
115. Van Der Zee, J., D.P. Barr, and R.P. Mason, *ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **20**(2): p. 199-206.
116. Romero, N., et al., *Incorporation of the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester to red blood cell membranes to study peroxynitrite-dependent reactions*. Chemical research in toxicology, 2007. **20**(11): p. 1638-1648.
117. Piacenza, L., et al., *Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage-and endogenously-derived peroxynitrite*. Biochemical journal, 2008. **410**(2): p. 359-368.
118. Aicardo, A., et al., *Propagation of free-radical reactions in concentrated protein solutions*. Free radical research, 2018. **52**(2): p. 159-170.

119. Mason, R.P., *Using anti-5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (anti-DMPO) to detect protein radicals in time and space with immuno-spin trapping*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(10): p. 1214-1223.
120. Ramirez, D.C., S.E. Gomez-Mejiba, and R.P. Mason, *Immuno-spin trapping analyses of DNA radicals*. Nature protocols, 2007. **2**(3): p. 512-522.
121. Buxton, G.V., et al., *Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot OH/\cdot O^-$ in aqueous solution*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1988. **17**(2): p. 513-886.
122. Davies, M.J., L.G. Forni, and S.L. Shuter, *Electron spin resonance and pulse radiolysis studies on the spin trapping of sulphur-centered radicals*. Chemico-biological interactions, 1987. **61**(2): p. 177-188.
123. Alvarez, M.N., et al., *Reaction of the carbonate radical with the spin-trap 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance, and kinetic-competition studies*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. **43**(11): p. 1523-1533.
124. Goldstein, S., et al., *Kinetics of spin trapping superoxide, hydroxyl, and aliphatic radicals by cyclic nitrones*. The Journal of Physical Chemistry A, 2004. **108**(32): p. 6679-6685.
125. Saito, K., et al., *Comparison of superoxide detection abilities of newly developed spin traps in the living cells*. Free radical research, 2009. **43**(7): p. 668-676.
126. Gomez-Mejiba, S.E., et al., *Immuno-spin trapping from biochemistry to medicine: advances, challenges, and pitfalls. Focus on protein-centered radicals*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014. **1840**(2): p. 722-729.
127. Kim, Y.-M., et al., *Decay studies of DMPO-spin adducts of free radicals produced by reactions of metmyoglobin and methemoglobin with hydrogen peroxide*. Free radical research, 1995. **22**(1): p. 11-21.
128. Cassina, P., et al., *Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants*. Journal of Neuroscience, 2008. **28**(16): p. 4115-4122.
129. Towner, R.A., et al., *In vivo detection of free radicals using molecular MRI and immuno-spin trapping in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **63**: p. 351-360.
130. Detweiler, C.D., et al., *Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(3): p. 364-369.
131. Towner, R.A., et al., *In vivo imaging of immuno-spin trapped radicals with molecular magnetic resonance imaging in a diabetic mouse model*. diabetes, 2012. **61**(10): p. 2405-2413.
132. Tosaki, A., et al., *Heart protection and radical trapping by DMPO during reperfusion in isolated working rat hearts*. Free Radical Biology and Medicine, 1990. **8**(4): p. 363-372.
133. Tabatabaie, T., et al., *Spin trapping agent phenyl N-tert-butyl nitron protects against the onset of drug-induced insulin-dependent diabetes mellitus*. FEBS letters, 1997. **407**(2): p. 148-152.
134. Kuroda, S., et al., *Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1999. **19**(7): p. 778-787.
135. Lees, K.R., et al., *NXY-059 for acute ischemic stroke*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(6): p. 588-600.
136. Shuaib, A., et al., *NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(6): p. 562-571.

137. Doblas, S., et al., *Phenyl-tert-butyl nitron* induces tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008. **44**(1): p. 63-72.
138. Garteiser, P., et al., *Multiparametric assessment of the anti-glioma properties of OKN007 by magnetic resonance imaging*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2010. **31**(4): p. 796-806.
139. He, T., et al., *Effects of PBN and OKN007 in rodent glioma models assessed by 1H MR spectroscopy*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. **51**(2): p. 490-502.
140. Monti, E., et al., *Protective effects of spin-trapping agents on adriamycin-induced cardiotoxicity in isolated rat atria*. *Free radical research communications*, 1991. **14**(1): p. 41-45.
141. Samuni, A., et al., *On the spin trapping and ESR detection of oxygen-derived radicals generated inside cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986. **83**(20): p. 7593-7597.
142. Chen, S.-n. and M.Z. Hoffman, *Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution*. *Radiation research*, 1973. **56**(1): p. 40-47.
143. Nucifora, G., et al., *Transient radicals of DNA bases by pulse radiolysis. Effects of cysteine and cysteamine as radioprotectors*. *Radiation research*, 1972. **49**(1): p. 96-111.
144. Bielski, B.H. and G.G. Shiue, *Reaction rates of superoxide radicals with the essential amino acids*. *Oxygen free radicals and tissue damage*, 1979: p. 43-56.
145. Zhang, H., et al., *Intramolecular electron transfer between tyrosyl radical and cysteine residue inhibits tyrosine nitration and induces thiyl radical formation in model peptides treated with myeloperoxidase, H₂O₂, and NO₂⁻: EPR SPIN trapping studies*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(49): p. 40684-40698.
146. Minton, A.P., *Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity*. *Biophysical journal*, 1992. **63**(4): p. 1090-1100.
147. Medalia, O., et al., *Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography*. *Science*, 2002. **298**(5596): p. 1209-1213.
148. Guin, D. and M. Gruebele, *Weak chemical interactions that drive protein evolution: crowding, sticking, and quinary structure in folding and function*. *Chemical reviews*, 2019. **119**(18): p. 10691-10717.
149. Ellis RJ, M.A., *Protein aggregation in crowded environments*. *Biological Chemistry*, 2006. **387**(5): p. 485-97.
150. Zhou, H.-X., G. Rivas, and A.P. Minton, *Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences*. *Annu. Rev. Biophys.*, 2008. **37**: p. 375-397.
151. Bhattacharjee, S., et al., *Electron transfer between a tyrosyl radical and a cysteine residue in hemoproteins: spin trapping analysis*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(44): p. 13493-13501.
152. Zhang, H., et al., *The effect of neighboring methionine residue on tyrosine nitration and oxidation in peptides treated with MPO, H₂O₂, and NO₂⁻ or peroxy nitrite and bicarbonate: Role of intramolecular electron transfer mechanism?* *Archives of biochemistry and biophysics*, 2009. **484**(2): p. 134-145.
153. Radi, R., et al., *Peroxy nitrite oxidation of sulfhydryls.: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(7): p. 4244-4250.
154. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1959. **82**(1): p. 70-77.
155. Alvarez, B., et al., *Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin*. *Methods in enzymology*, 2010. **473**: p. 117-136.

156. Han, S., C. Kim, and D. Kwon, *Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol*. *Polymer*, 1997. **38**(2): p. 317-323.
157. Davies, K. and M. Delsignore, *Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(20): p. 9908-9913.
158. Michalski, R., et al., *Real-time measurements of amino acid and protein hydroperoxides using coumarin boronic acid*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(32): p. 22536-22553.
159. Zielonka, J., et al., *High-throughput assays for superoxide and hydrogen peroxide: design of a screening workflow to identify inhibitors of NADPH oxidases*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(23): p. 16176-16189.
160. Radi, R., et al., *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001. **30**(5): p. 463-488.
161. Folkes, L.K., et al., *Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2009. **484**(2): p. 122-126.
162. Kalyanaraman, B., et al., *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012. **52**(1): p. 1-6.
163. Bartsaghi, S., et al., *Reactions of desferrioxamine with peroxynitrite-derived carbonate and nitrogen dioxide radicals*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004. **36**(4): p. 471-483.
164. Su, Y., et al., *Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 1998. **19**(5): p. 819-825.
165. Du, X., et al., *Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation*. *The Journal of clinical investigation*, 2006. **116**(4): p. 1071-1080.
166. Alvarez, B., et al., *Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(2): p. 842-848.
167. Davies, M.J., *Protein oxidation and peroxidation*. *Biochemical journal*, 2016. **473**(7): p. 805-825.
168. Koppenol, W., et al., *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. *Chemical research in toxicology*, 1992. **5**(6): p. 834-842.
169. Quijano, C., et al., *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups*. *Biochemical journal*, 1997. **322**(1): p. 167-173.
170. Carballal, S., et al., *Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. **50**(1): p. 196-205.
171. Ellis, R.J., *Macromolecular crowding: obvious but underappreciated*. *Trends in biochemical sciences*, 2001. **26**(10): p. 597-604.
172. Asmus, K., H. Möckel, and A. Henglein, *Pulse radiolytic study of the site of hydroxyl radical attack on aliphatic alcohols in aqueous solution*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1973. **77**(10): p. 1218-1221.
173. King, N.K. and M. Winfield, *The mechanism of metmyoglobin oxidation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1963. **238**(4): p. 1520-1528.
174. Kelman, D., J. DeGray, and R. Mason, *Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(10): p. 7458-7463.
175. DeGray, J.A., et al., *Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(4): p. 2359-2362.

176. Barnard, M.L., et al., *Protein and amino acid oxidation is associated with increased chemiluminescence*. Archives of biochemistry and biophysics, 1993. **300**(2): p. 651-656.
177. Aspée, A. and E. Lissi, *Kinetics and mechanism of the chemiluminescence associated with the free radical-mediated oxidation of amino acids*. Luminescence, 2000. **15**(5): p. 273-282.
178. Gunther, M.R., et al., *Self-peroxidation of Metmyoglobin Results in Formation of an Oxygen-reactive Tryptophan-centered Radical (*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(27): p. 16075-16081.
179. Bisby, R., S. Ahmed, and R. Cundall, *Repair of amino acid radicals by a vitamin E analogue*. Biochemical and biophysical research communications, 1984. **119**(1): p. 245-251.
180. Neuzil, J., J. Gebicki, and R. Stocker, *Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants*. Biochemical journal, 1993. **293**(3): p. 601-606.
181. Burton, G.W. and K.U. Ingold, *Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function*. Accounts of chemical research, 1986. **19**(7): p. 194-201.
182. Hunter, E.P., M.F. Desrosiers, and M.G. Simic, *The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization*. Free Radical Biology and Medicine, 1989. **6**(6): p. 581-585.
183. Kikugawa, K., T. Kato, and Y. Okamoto, *Damage of amino acids and proteins induced by nitrogen dioxide, a free radical toxin, in air*. Free Radical Biology and Medicine, 1994. **16**(3): p. 373-382.
184. Prütz, W.A., et al., *Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins*. Archives of biochemistry and biophysics, 1985. **243**(1): p. 125-134.
185. Mezyk, S.P., *Rate constant determination for the reaction of hydroxyl and glutathione thiyl radicals with glutathione in aqueous solution*. The Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(21): p. 8861-8866.
186. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J.S. Beckman, *Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide*. Archives of biochemistry and biophysics, 1992. **298**(2): p. 446-451.
187. Gatti, R.M., R. Radi, and O. Augusto, *Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical*. FEBS letters, 1994. **348**(3): p. 287-290.
188. Van Der Toorn, M., et al., *Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2009. **297**(1): p. L109-L114.
189. Squadrito, G.L., et al., *Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. **31**(9): p. 1132-1138.
190. Hara, H., et al., *Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2013. **305**(10): p. L737-L746.
191. Das, A., et al., *Reversal of SIN-1-induced e NOS dysfunction by the spin trap, DMPO, in bovine aortic endothelial cells via e NOS phosphorylation*. British journal of pharmacology, 2014. **171**(9): p. 2321-2334.
192. Feelisch, M., J. Ostrowski, and E. Noack, *On the mechanism of NO release from sydnonimines*. Journal of cardiovascular pharmacology, 1989. **14**: p. S13-S22.
193. Fiuza, B., et al., *Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: Protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins*. Free radical research, 2015. **49**(2): p. 122-132.

194. Rios, N., et al., *Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **101**: p. 284-295.
195. de Bem, A.F., et al., *Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen*. Nitric oxide, 2013. **31**: p. 20-30.
196. Ganini, D., et al., *Switch of Mitochondrial Superoxide Dismutase into a Prooxidant Peroxidase in Manganese-Deficient Cells and Mice*. Cell Chem Biol, 2018. **25**(4): p. 413-425 e6.
197. Kuroda, S., et al., *Delayed treatment with α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) attenuates secondary mitochondrial dysfunction after transient focal cerebral ischemia in the rat*. Neurobiology of disease, 1996. **3**(2): p. 149-157.
198. Folbergrova, J., et al., *N-tert-butyl-alpha-phenylnitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(11): p. 5057-5061.
199. Zuo, L., et al., *The radical trap 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide exerts dose-dependent protection against myocardial ischemia-reperfusion injury through preservation of mitochondrial electron transport*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. **329**(2): p. 515-523.
200. Das, A., et al., *Inhibition of ROS-induced apoptosis in endothelial cells by nitron spin traps via induction of phase II enzymes and suppression of mitochondria-dependent pro-apoptotic signaling*. Biochemical pharmacology, 2012. **84**(4): p. 486-497.
201. Dogan, S., et al., *Measurement of intracellular biomolecular oxidation in liver ischemia-reperfusion injury via immuno-spin trapping*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(3): p. 406-414.
202. Kang, P.T., et al., *Protein thiyl radical mediates S-glutathionylation of complex I*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(4): p. 962-973.
203. Chen, Y.-R., et al., *Superoxide generation from mitochondrial NADH dehydrogenase induces self-inactivation with specific protein radical formation*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(45): p. 37339-37348.
204. Cassina, A. and R. Radi, *Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport*. Archives of biochemistry and biophysics, 1996. **328**(2): p. 309-316.
205. Fuentes-Lemus, E., et al., *High concentrations of casein proteins exacerbate radical chain reactions and increase the extent of oxidative damage*. Food Hydrocolloids, 2021. **121**: p. 107060.
206. Fuentes-Lemus, E., et al., *Effect of macromolecular crowding on protein oxidation: Consequences on the rate, extent and oxidation pathways*. Redox biology, 2021. **48**: p. 102202.