

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PEDECIBA BIOLOGÍA**

**NITROALQUENOS AROMÁTICOS COMO
ANTIOXIDANTES Y FÁRMACOS POTENCIALES
EN ARTRITIS REUMATOIDEA**

Magíster Laura Celano Jorcín

Tutoras

Dra. Mercedes González

Dra. Leonor Thomson

**Laboratorio de Enzimología
Facultad de Ciencias – Universidad de la República**

Montevideo, 11 de junio de 2013

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Pepe y Tere que estuvieron todas las tardes y mañanas que fueron necesarias a la orden para que pudiera dedicarme a la escritura sin desatender a la familia.

A Luis, compañero de vida, padre de mis hijos y colega biólogo siempre listo para hacer catarsis profesional y personal.

A mis experimentos más lindos Manuel, Carmela y Elena, que no entienden mucho porque le dedico tanto tiempo a la tesis y tan poco a ellos, pero que igual colaboran portándose bien.

A las Dras. Mercedes González y Leonor Thomson por su generosidad y su calidad académica y personal.

A los pacientes del Instituto Nacional de Reumatología (INRU) y del Hospital de Rosario.

Al Lic. Claudio Carabio con quien recorrí un tramo de este trabajo en el que crecimos juntos y que fue mi mano derecha e izquierda.

A la Lic. Renata Frache y el Bach. Nicolás Cataldo quienes colaboraron sintetizando los compuestos estudiados.

A la Lic. Florencia Tomasina que me dio una mano y su sangre para los experimentos con glóbulos rojos.

A los Dres. Noel Alvarez, Madia Trujillo, Mercedes Naviliat, Ana Denicola, Beatriz Alvarez, Gerardo Ferrer, Camilo López y Marcelo Fernández que en sus respectivas disciplinas aportaron sus conocimientos a este trabajo.

A las Dras. Magna S. Alexandre-Moreira (UFAL) y Lidia Moreira-Lima (UFRJ) que hicieron posible mi pasantía en Maceió, haciéndome sentir muy bien recibida y apoyada en todo lo que fue necesario.

A mi amiga y Dra. Mariela Harguindeguy, de quien entre mates y juegos de niñas conocí la artritis desde el punto de vista médico y que convenció a varios de sus pacientes para donar sangre para este trabajo.

A las rubias del CROERPA, Lucía, Lía, Maggie y Vero que hacen del laboratorio un ambiente laboral más agradable para todos porque no todo es ciencia en esta vida.

A TODOS los compañeros del Laboratorio de Enzimología y Fisicoquímica Biológica con los que en algunos casos ya somos amigos y es un placer trabajar.

A los Dres. Mauricio Cabrera y Paola Hernández por la solidaridad mutua que se estableció cuando trabajábamos en los experimentos de cultivo celular, haciendo de esa etapa una de las más lindas.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme la beca de doctorado.

A PEDECIBA- Biología y CSIC por la financiación para la realización de la pasantía en la UFAL y la asistencia a congresos regionales.

RESUMEN

Durante los procesos inflamatorios se liberan grandes cantidades de especies reactivas que perpetúan esta condición pudiendo además promover el desarrollo de un estado autoinmune. La artritis reumatoidea es una patología autoinmune e inflamatoria asociada a un bajo nivel de antioxidantes plasmáticos que potencia la generación de neo-epitopes activando al sistema inmune hacia la generación de auto-anticuerpos. El tratamiento terapéutico actual para la AR no incluye el uso de terapias antioxidantes, si bien existen evidencias sobre la eficacia de distintas moléculas antioxidantes en este sentido. Por otra parte se conocen ciertos efectos benéficos sobre vías de señalización redox de algunos nitrolípidos endógenos y la actividad tripanosomicida de benzofuroxanos, ambas moléculas conteniendo el grupo funcional nitroalqueno. Además se han estudiado nitroalquenos aromáticos y alifáticos como liberadores de óxido nítrico. Es por ello que en este trabajo se evaluaron 14 compuestos aromáticos conteniendo el motivo nitroalqueno como antioxidantes, siendo 4 de ellos estudiados además como potenciales fármacos antiartríticos, antiinflamatorios y analgésicos. Todos los compuestos modificaron su espectro en presencia de peroxinitrito y reaccionaron en forma directa con éste con una velocidad del orden de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, siendo además capaces de atrapar los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$, productos de su descomposición homolítica. Aquellos que contenían el grupo electrón dador *N,N*-dimetilamino (**B1** y **B2**), y el bioisómero de fenilo **F1** mostraron los mayores valores de constante cinética y una capacidad aumentada para atrapar los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$. Los compuestos más prometedores a partir de los resultados anteriores **B1**, **B2**, **G1** y **G2** se probaron como antioxidantes en cultivo de macrófagos activados. **B1** y **B2** protegieron de la oxidación por $\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$ generados a partir de la descomposición de peroxinitrito producido en cultivo. Además **B2** y **G2** fueron capaz de atrapar los radicales precursores de peroxinitrito $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$. Ninguno mostró reactividad con el H_2O_2 . En un cocultivo de macrófagos activados y condrocitos se observó cierto efecto inhibitorio de **B1** sobre la actividad gelatinasa de metaloproteinasas de la matriz. Los nitroalquenos **B1**, **B2**, **G1** y **G2** mostraron efecto analgésico, mientras que sólo **B1** y **G2** tuvieron efecto antiinflamatorio en modelos de dolor e inflamación aguda. Los cuatro compuestos inhibieron la actividad ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2), destacándose **B2**. Por su parte, el nitroalqueno **B1** ($100 \mu\text{moles.kg}^{-1}$) fue tan efectivo como el fármaco de referencia metotrexato en un modelo de AR inducida (CFA). Los parámetros de estrés oxidativo, capacidad antioxidante plasmática y anticuerpos anti-nitrotirosina planteados como posibles nuevos indicadores de la progresión de la enfermedad, no pudieron discriminar entre los diferentes estadios de la misma. En suma, **B1** fue el único compuesto con efecto antiartrítico, antiinflamatorio y analgésico y es por lo tanto un buen candidato para futuros estudios guiados hacia su potencial uso como fármaco.

1 INTRODUCCIÓN

Se denomina respiración aeróbica a la combustión controlada del oxígeno con el fin de obtener energía en forma eficiente mediante el uso de cadenas transportadoras de electrones que lo utilizan como aceptor final. Debido a su alto potencial de reducción estándar ($E^{\circ}(\text{O}_2, 4\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}) = 0.816 \text{ V}$), la respiración dependiente de oxígeno libera mayor cantidad de energía que la utilización de otros aceptores de electrones como nitrato, ion férrico, sulfato, carbonato y ciertos compuestos orgánicos [1]. La maquinaria metabólica que utiliza oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, puede permitir cierta fuga de electrones, llevando a la reducción parcial del mismo. Es por ello que el desarrollo de la vida aeróbica co-evolucionó con un conjunto de moléculas antioxidantes para controlar, reparar o reemplazar el daño producido, permitiendo una sobrevivencia de hasta 100 años en presencia de oxígeno [2]. Cuando las defensas antioxidantes celulares se ven sobrepasadas por la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN), se genera un desequilibrio entre un estado prooxidante y antioxidante a favor del primero denominado “estrés oxidativo” [3]. Este concepto ha sido utilizado por casi 30 años en la literatura y si bien no ha perdido vigencia actualmente, es claro que el fenómeno es más complejo. En una visión más amplia y actual el concepto abarca no sólo el desbalance entre especies oxidantes y antioxidantes sino también la propensión al desarrollo de distintos estados patológicos asociados a una desregulación en las vías de señalización redox y su control, capaces de modificar en forma reversible o irreversible el estado redox en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta definición provee de un marco conceptual más significativo en cuanto a la evaluación clínica y el desarrollo de una enfermedad específica [4].

1.1 ESPECIES REACTIVAS

Se denominan así a un conjunto de moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno molecular a agua y que poseen gran capacidad de reacción por su alta inestabilidad química. Entre ellos se encuentran varios radicales como el anión superóxido, hidroxilo, dióxido de nitrógeno, óxido nítrico, y moléculas no radicalares como el anión peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno [5, 6]. Los radicales libres se caracterizan por tener en su estructura un electrón desapareado en su orbital externo. Esto les confiere inestabilidad química que tienden a estabilizar por captura de un electrón de una biomolécula cercana. Cuando son generadas dentro de un sistema biológico, su difusión queda limitada a corta distancia a partir del compartimento en el que fueron generados.

1.1.1 SUPERÓXIDO Y OTRAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

A nivel celular, la reducción por un electrón de una molécula O_2 genera una molécula de $O_2^{\cdot-}$ como producto de la respiración y el metabolismo celular. Esta molécula posee una vida media relativamente corta y carga negativa, por lo que sólo difunde a través de membranas biológicas mediante canales aniónicos, actuando en las cercanías a su sitio de producción [7].

De acuerdo a los potenciales redox ($E^{\circ}(O_2/O_2^{\cdot-}) = -0.33 \text{ V}$ y $E^{\circ}(O_2^{\cdot-}, 2 H^+/H_2O_2) = 0.94 \text{ V}$, [8]), el $O_2^{\cdot-}$ puede actuar como oxidante o como reductor. Es capaz de oxidar polifenoles, catecolaminas, tocoferoles, leucoflavinas, ascorbato y algunos tioles. Por otro lado, es capaz de reducir una variedad de complejos férricos y cúpricos, generalmente presentes como cofactores de proteínas [7].

Su principal sitio de producción *in vivo* es la mitocondria debido a la fuga de electrones de la cadena respiratoria, donde entre 1-3 % del O_2 reducido allí da lugar a la formación de $O_2^{\cdot-}$. Concretamente, la cadena respiratoria produce este radical a nivel de la flavoproteína del complejo NADH deshidrogenasa y a nivel de ubiquinona-citocromo b debido a la autooxidación de ubiquinona [9, 10]. El $O_2^{\cdot-}$ se produce además en bajas cantidades durante el metabolismo normal en células no fagocíticas por reacciones catalizadas por ciclooxigenasas, lipooxigenasas, peroxisomas, xantina oxidasa, desacoplamiento de citocromos P_{450} y de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3) y NADPH oxidasas (NOX1, NOX3, NOX4, NOX5) [11-14].

Otra importante fuente de $O_2^{\cdot-}$ son los fagosomas de células fagocíticas activadas durante procesos inflamatorios donde la acción de la isoforma NOX2 provoca un aumento en la concentración de $O_2^{\cdot-}$ [15-17]. La NOX fue inicialmente descrita en macrófagos y neutrófilos como la enzima responsable del “estallido” respiratorio con un rol crítico en la defensa celular. Actualmente se conocen 5 isoformas de NOX que se expresan en distintos tipos celulares. La NOX2 se expresa en células fagocíticas y comprende 5 subunidades: un citocromo asociado a membrana (cytb558) que contiene los componentes gp91^{phox} (nox2) y p22^{phox}, tres subunidades citosólicas regulatorias p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}, y la GTPasa RAC necesaria para su activación. Cuando macrófagos y neutrófilos están en estado basal, las subunidades nox2 y p22^{phox} se encuentran asociadas formando gránulos mayoritariamente unidas a las membranas de vesículas fagocíticas intracelulares y en menor proporción a la membrana plasmática. A partir de la estimulación fagocítica la NOX2 se trasloca hacia la superficie de la membrana y los gránulos se fusionan con ésta. Por su parte, la subunidad p47^{phox} se fosforila y arrastra consigo a las subunidades p40^{phox} y p67^{phox} para interactuar con p22^{phox} y formar el complejo NOX2 activo (**Figura 1.1**, [18]). Esta enzima es capaz de producir grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$ sostenible durante 90 a 120 min. [19].

El $O_2^{\cdot-}$ es la base conjugada del ácido débil HO_2^{\cdot} ($pK_a = 4.7$) que puede dismutar espontánea ($k = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) o enzimáticamente por acción de la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1., $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, [20]) a O_2 y H_2O_2 , un agente oxidante con alta capacidad de difusión. Su afinidad por SOD mantiene una concentración basal intracelular en rangos de nanomolar a picomolar [21], sin embargo la alta tasa de respiración celular puede aumentarla generando flujos intracelulares del orden $\mu\text{M s}^{-1}$ [22].

El H_2O_2 producido es muy estable en condiciones fisiológicas y debido a su neutralidad es permeable a las membranas, pudiendo activar moléculas de señalización lejos de su sitio de síntesis [23]. A su vez el H_2O_2 en presencia de metales de transición (ej. Fe^{2+} , Cu^{2+}), mediante la

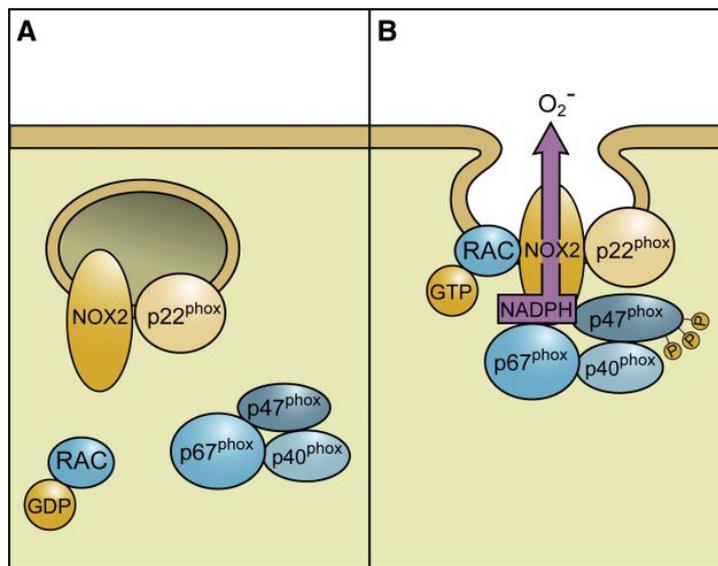


Figura 1.1. Ensamblaje de la NADPH oxidasa fagocítica (NOX2). **A)** En neutrófilos o macrófagos no activados NOX2 y $p22^{phox}$ se encuentran en membranas de vesículas intracelulares. **B)** Luego de la activación ocurre un intercambio de GDP por GTP en la subunidad RAC permitiendo su activación. La fosforilación de la subunidad $p47^{phox}$ provoca un cambio conformacional que permite su interacción con $p22^{phox}$. El movimiento de $p47^{phox}$ ocurre junto al de las subunidades citoplasmáticas $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$ para formar el complejo NOX2 activo. Una vez activado las vesículas que contienen NOX2 se fusionan con las membranas plasmáticas o fagosómica. El complejo activo transporta electrones desde el NADPH citoplasmático hacia el espacio extracelular o fagosómico generando $O_2^{\cdot-}$. Extraído de [18]

reacción de Fenton /Haber-Weiss, puede dar origen al radical hidroxilo, especie oxidante altamente reactiva, poco selectiva y por lo tanto altamente tóxica [24].

Otra fuente importante de especies reactivas es la enzima mieloperoxidasa (MPO, E.C 1.11.2.2) que está ampliamente distribuída en el organismo y se encuentra especialmente activa en células fagocíticas.



Esta enzima utiliza el H_2O_2 generado a partir de la NOX2 en fagosomas de neutrófilos y macrófagos, produciendo ácido hipocloroso (HClO) como especie reactiva oxidante para la defensa celular contra agentes infecciosos (**Ecuación 1**) [25].

1.1.2 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) es un radical libre producido por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, E.C.1.14.13.39) a partir del aminoácido L-arginina (**Figura 1.2**), liberando además citrulina.

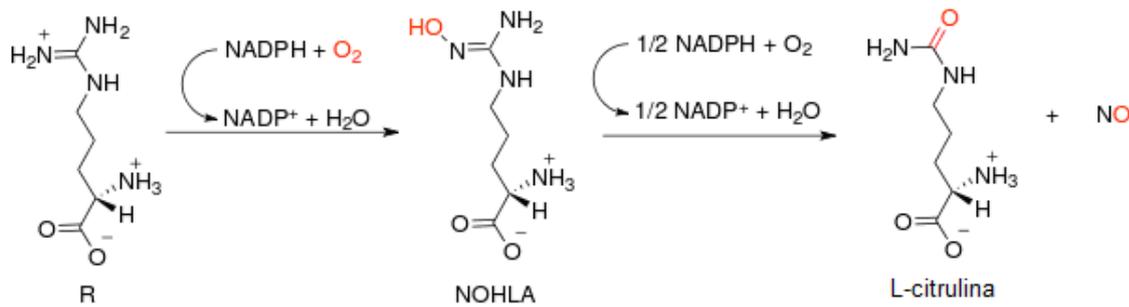


Figura 1.2. Reacción catalizada por la NOS. Se muestra la formación del intermediario *N*_ω-hidroxi-L-arginine (NOHLA). Imagen extraída de Liu, Q. y col. [26].

Su coeficiente de difusión es $4.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$ en H_2O a 37°C y su vida media dependiendo del tipo celular va desde 1 s en presencia de glóbulos rojos, hasta 30 s en otros amortiguadores fisiológicos [27]. Cuando es producido en un cultivo de macrófagos activados puede migrar en un radio de 10 a 50 células. Sin embargo, dentro de un sistema biológico más complejo existen otros blancos con los que puede reaccionar antes de alcanzar su máxima migración como la guanilato ciclasa soluble, lípidos, hemoglobina, citocromo c oxidasa u otros radicales libres [28]. Por ejemplo, en la mitocondria y dependiendo del gradiente de concentración de O_2 , la citocromo c oxidasa puede reaccionar con $\cdot\text{NO}$ inhibiendo la respiración mitocondrial, mientras que en macrófagos activados y en presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede limitarse su difusión debido a la formación de peroxinitrito [27, 29]. Entonces, los efectos sistémicos del $\cdot\text{NO}$ son el producto de una serie de efectos parácrinos y autócrinos definidos por el tipo celular en el que se genera [30].

Existen tres isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS): neuronal (NOS1), inducible (NOS2) y endotelial (NOS3). Las isoformas NOS1 y NOS3 son dependientes de calcio [31] y constitutivas, aunque la NOS3 puede aumentar sus niveles durante el ejercicio físico o la estimulación con estrógenos [32, 33]. La NOS2 no responde a cambios en la concentración de calcio y se induce durante la respuesta inmune en células del músculo liso respiratorio y endotelial, macrófagos, células de Kupfer, condrocitos, mastocitos y neutrófilos, entre otros [31]. Sin embargo, también se ha observado cierta expresión constitutiva en neuronas, hepatocitos, mucosa del colon y epitelio respiratorio [31, 34, 35]. La NOS2 inducida en macrófagos luego de

una estimulación inmunológica, es la principal fuente de $\cdot\text{NO}$ en mamíferos. Su función es la producción de peroxinitrito como agente citotóxico para la destrucción de microorganismos o células tumorales. Su sobreproducción lleva a un shock endotóxico que produce disminución en la presión sanguínea y puede poner en riesgo la vida del individuo [36].

Los efectos del $\cdot\text{NO}$ no sólo dependen del tipo celular sino también de las condiciones que éste experimenta y del órgano en que se encuentra. El $\cdot\text{NO}$ producido a bajas concentraciones en el endotelio vascular contribuye a mantener una presión sanguínea normal, mientras que durante un shock séptico la inducción de NOS2 es capaz de producir grandes cantidades de $\cdot\text{NO}$ en ese mismo endotelio, generando un estado descompensado en el individuo [31].

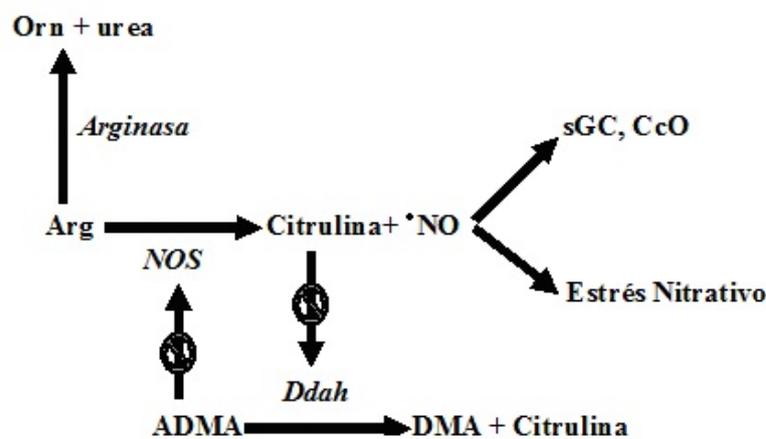


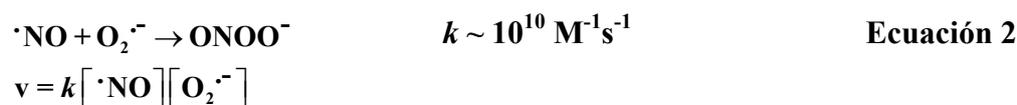
Figura 1.3. Control de la producción de $\cdot\text{NO}$. La NOS2 produce $\cdot\text{NO}$ a partir de arginina (Arg), que interactúa con guanilato ciclasa (sGC) y citocromo c oxidasa (CcO). A su vez la citrulina a altas concentraciones inhibe la N^G, N^G -dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) que como consecuencia produce un aumento en la concentración de N^G, N^G -dimetil-L-arginina (ADMA), potente inhibidor de la NOS2. La concentración de Arg a su vez también es controlada por la enzima arginasa. Adaptado de [30].

La producción de $\cdot\text{NO}$ también es regulada metabólicamente mediante la disponibilidad de arginina que a su vez puede ser modulada por la enzima arginasa que cataliza la transformación de arginina en urea y ornitina. Por otra parte, la N^G, N^G -dimetilarginina-dimetilaminohidrolasa (DDAH) es una enzima cuyo sustrato es N^G, N^G -dimetil-L-arginina (ADMA), un potente inhibidor de la NOS. La DDAH es a su vez inhibida por citrulina (producto de la NOS) (**Figura 1.3**). Ambos mecanismos permiten una fina regulación metabólica que controla la concentración de arginina y la generación de $\cdot\text{NO}$ mediante una inhibición por producto indirecta [37, 38].

1.1.3 PEROXINITRITO

El peroxinitrito¹ (ONOO⁻) es un poderoso agente oxidante y buen nitrante que puede ser generado por varios procesos biológicos. Su síntesis ocurre a partir de la reacción controlada por difusión entre los radicales O₂^{-•} y [•]NO (**Ecuación 2**) [39, 40].

El [•]NO tiene una vida media del orden de segundos y puede difundir a través de las membranas [41, 42], mientras que la vida media del O₂^{-•} es menor a los milisegundos y sólo es capaz de atravesar las membranas por canales aniónicos [7]. Entonces la formación de peroxinitrito ocurrirá principalmente en sitios cercanos a la producción de O₂^{-•} [22].



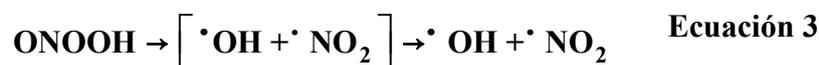
La constante de segundo orden para la reacción entre ambos radicales tiene un valor entre 4-16 x 10⁹ M⁻¹s⁻¹ [43-45], indicando que la reacción es controlada por difusión [22].

El peroxinitrito posee un pKa = 6.8 [40], por lo que la relación entre la forma protonada (ONOOH) y aniónica (ONOO⁻) depende del pH local, y en condiciones fisiológicas (pH 7.4) un 80 % se encuentra en forma aniónica [22]. Ambas especies son capaces de reaccionar en forma directa con biomoléculas, oxidándolas por mecanismos de uno o dos electrones [46].

1.1.3.1 Reactividad general

El ONOO⁻ es estable en soluciones alcalinas (pH ≥ 10), sin embargo a pH fisiológico o ácido se descompone rápidamente en forma exponencial a [•]OH y [•]NO₂ con una constante cinética de 0.9 s⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) [47] cuyo valor aumenta con la temperatura y disminuye con el pH [15, 48].

En presencia de moléculas blanco, el peroxinitrito puede reaccionar en forma directa o indirecta a través de los productos derivados de la descomposición homolítica de su ácido conjugado (**Ecuación 3**) y de esta manera promover diferentes efectos a nivel biológico [22].



Sin embargo, *in vivo* y en un medio acuoso la reacción directa tanto de la forma protonada como aniónica predomina sobre la reacción indirecta mediada por sus radicales de descomposición. Éstos se vuelven relevantes en fases hidrofóbicas donde son los principales responsables del inicio de peroxidaciones lipídicas [49].

¹ El término peroxinitrito utilizado en el texto se refiere tanto a la forma aniónica (ONOO⁻) como a su ácido conjugado (ONOOH). Según la IUPAC los nombres que corresponden son: para la especie ONOO⁻, oxoperoxinitrato (1-) y para el ácido peroxinitroso, ONOOH, oxoperoxinitrato de hidrógeno.

1.1.3.2 Reactividad directa

La reacción directa entre el peroxinitrito y una molécula blanco puede ocurrir mediante la oxidación por uno o dos electrones. Cuando la oxidación ocurre por dos electrones la molécula de peroxinitrito (ONOO^- o ONOOH) reacciona con una cinética de segundo orden que depende de la concentración de la molécula blanco, de modo que la constante aparente de descomposición de peroxinitrito aumenta en forma lineal con la concentración de ésta (**Figura 1.4**, reacciones I y II) [22]. Este tipo de reacciones ocurren con centros metálicos como los que presentan las porfirinas de manganeso sintéticas [50], centros metalo-sulfurados (Fe-S o Zn-S) [51] y los grupos hemo en diferentes peroxidasas con constantes cinéticas de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior [52, 53].

También reacciona en forma directa con tioles presentes en el sitio activo de ciertas peroxirredoxinas (ej: triparredoxina peroxidasa) en el orden $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [54], con aminoácidos libres, albúmina y glutatión, con constantes cinéticas de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [40, 55], y con compuesto de selenio como los residuos selenocisteína, selenometionina y la enzima glutatión peroxidasa en un rango entre 10^3 y $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [56-58].

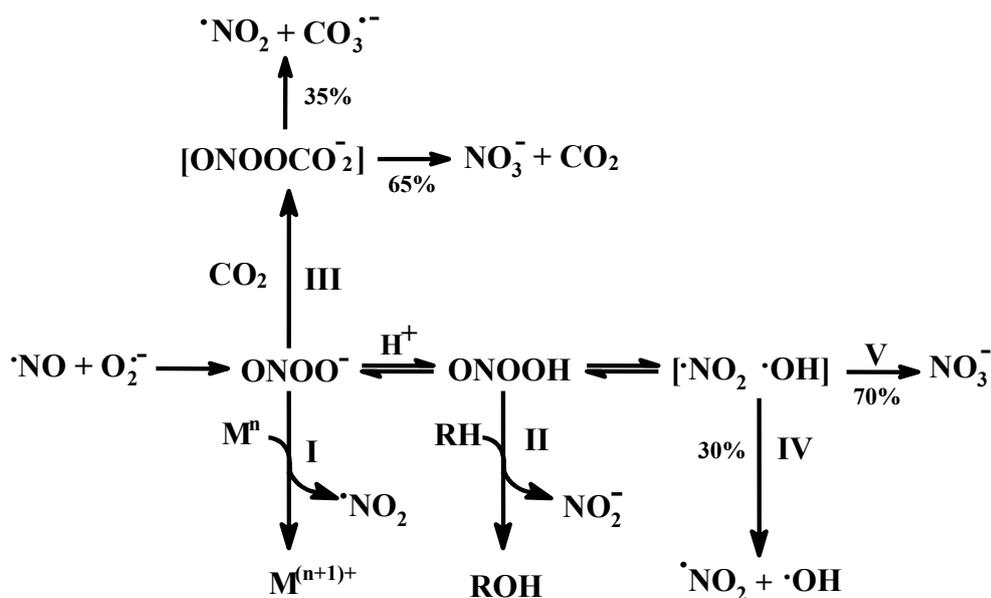
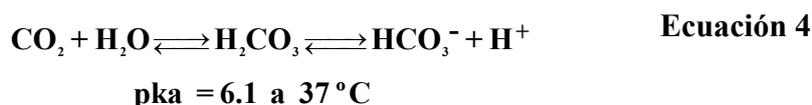


Figura 1.4. Reactividad directa e indirecta del peroxinitrito. El peroxinitrito en sistemas biológicos se produce principalmente a partir de la reacción entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$. Una vez formado puede reaccionar directamente con centros metálicos por un electrón (reacción I) o mediante oxidación por dos electrones con diferentes blancos moleculares (reacción II), o puede reaccionar con CO_2 (reacción III). Una fracción del peroxinitrito (~30%) se homoliza generando $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ promoviendo oxidaciones por un electrón vía radicalar (reacción IV). Extraído de [22].

El peroxinitrito reacciona directamente con CO_2 ($k = 5.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, [42, 59]) a través de la formación del aducto ONOOCO_2^- (1-carboxilato-2-nitrosodioxióxano o nitrosoperoxicarboxilato) que se descompone rápidamente ($<1 \mu\text{s}$) a los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) con un

35 % de rendimiento [60], mientras el 65 % de los radicales restantes se reaarregla para formar CO_2 y NO_3^- relativamente inertes (**Figura 1.4**, reacción III) [39, 61].

El CO_2 no puede ser considerado un atrapador de peroxinitrito porque el aducto que forma no es una especie inerte. Sus productos de homólisis, $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3^{\cdot-}$, son a su vez especies nitrantes y oxidantes [42, 62-64]. El radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ es capaz de oxidar biomoléculas con constantes cinéticas de 10^5 - $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [65] redireccionando la reactividad del peroxinitrito. La reacción entre peroxinitrito y CO_2 es posible fisiológicamente ya que la concentración de éste en plasma es elevada (1.3 mM) y se encuentra en equilibrio con la concentración de bicarbonato (HCO_3^- , 25 mM) formando un amortiguador cuyo pka es igual a 6.1 a 37 °C (**Ecuación 4**) [66].



1.1.3.3 *Reactividad indirecta mediada por radicales*

En ausencia de blancos directos, el peroxinitrito se isomeriza a NO_3^- (70 %) y el 30 % restante se homoliza a los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (**Figura 1.4**, reacción IV) [39]. En este caso la reacción es de primer orden para el peroxinitrito e independiente de la concentración de la molécula blanco ya que el paso limitante es la formación de los radicales, aunque a veces esta relación es más compleja [48, 67]. El radical $\cdot\text{OH}$ es un oxidante más potente pero menos selectivo que el $\cdot\text{NO}_2$ y el $\text{CO}_3^{\cdot-}$, sin embargo dentro de un sistema biológico complejo existen múltiples blancos que pueden reaccionar directamente con el peroxinitrito, por lo que en relación, la reactividad mediada por $\cdot\text{OH}$ es menos relevante. Del peroxinitrito total formado *in vivo* más del 95 % reaccionará directamente con distintas biomoléculas, mientras que menos del 5 % lo hará como $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ [22].

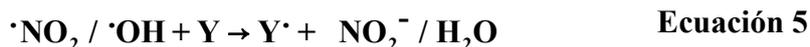
1.1.3.4 *Algunos efectos sobre macromoléculas*

Nitración proteica

El peroxinitrito es capaz de nitrar residuos aromáticos incorporando un grupo nitro, principalmente en tirosinas y triptófanos proteicos, así como en residuos de guanina del ADN y cadenas alifáticas de ácidos grasos [68]. La 3-nitrotirosina ($3\text{NO}_2\text{-Y}$) es uno de los biomarcadores más utilizados para determinar el daño oxidativo por la presencia de peroxinitrito, aunque no es del todo específico para éste [69]. A 25 °C el rendimiento de la nitración, cuantificada como $3\text{NO}_2\text{-Y}$ en relación al peroxinitrito presente es de 6-8 % [70]. La nitración de tirosinas no afecta la velocidad de descomposición del peroxinitrito y rinde además como producto de reacción radicalar ditirosina e hidroxitirosina [71, 72].

La oxidación por un electrón del anillo aromático (ej: tirosina) por parte del $\cdot\text{OH}$ o el $\cdot\text{NO}_2$ genera el radical tirosilo (Y^\cdot) y una molécula de agua o NO_2^- respectivamente (**Ecuación 5**). El

radical Y^{\bullet} formado es capaz de reaccionar con el $\bullet\text{NO}_2$ para dar el producto final $3\text{NO}_2\text{-Y}$ (**Ecuación 6**) con una $k = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [73]. A su vez, dos radicales Y^{\bullet} pueden reaccionar entre sí para dar la 3,3'-ditirosina (**Ecuación 7**) con una constante de $4.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [74]. Debido a que el $\bullet\text{OH}$ tiende a adicionarse al anillo aromático en lugar de extraer un electrón, el rendimiento de radical Y^{\bullet} por reacción con $\bullet\text{OH}$ es del 5 %, siendo el radical hidroxitirosilo el producto mayoritario. Sin embargo, éste puede rearrreglarse en un radical Y^{\bullet} y una molécula de agua aumentando el rendimiento de Y^{\bullet} , o puede unirse a otro Y^{\bullet} y formar 3-hidrox-itirosina. La reacción con Y para formar el radical Y^{\bullet} de todos modos es muy rápida ($1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [75].



A pesar de que el peroxinitrito es un mal agente nitrante, su rendimiento de nitración aumenta en presencia de CO_2 o de centros metálicos proteicos. Si bien la nitración proteica en un sistema biológico no es un proceso exclusivo de la presencia de peroxinitrito [76], el uso de ciertos compuestos que modulan la producción de $\bullet\text{NO}$ (inhibidores de la NOS o atrapadores de $\bullet\text{NO}$), superóxido (miméticos de SOD o atrapadores de $\text{O}_2^{\bullet-}$) o atrapadores de peroxinitrito, ha permitido concluir que la formación *in vivo* de peroxinitrito aporta a la nitración proteica [70, 77].

Nitración lipídica

La nitración lipídica ocurre como consecuencia de la reacción de moléculas derivadas de la oxidación de óxido nítrico entre los que se encuentra el peroxinitrito y el $\bullet\text{NO}_2$, siendo su mecanismo aún desconocido o no determinado [78]. El $\bullet\text{NO}_2$, generado por varias reacciones entre las que se encuentra la descomposición del peroxinitrito, es capaz además de oxidar lípidos, la relación entre lípidos oxidados y nitrados depende de los niveles de oxígeno en el que ocurre el proceso, predominando los productos nitrados a bajas concentraciones [79, 80]. Tanto el peroxinitrito anión como el ácido peroxinitroso son potentes oxidantes capaces de rendir diferentes productos de nitración y oxidación lipídica [81]. La presencia de nitrolípidos endógenos ha sido ampliamente reportada, encontrándose en forma tanto libre como esterificada [82, 83]. Su formación es observada en macrófagos activados frente a un estímulo inflamatorio donde se observa la producción de colesterol-nitrolinoleato que es inhibida por inhibidores de la NOS2, mostrando la reacción directa entre la generación de nitrolípidos y la presencia de especies derivadas de $\bullet\text{NO}$ [83].

1.1.3.5 *Producción de peroxinitrito en macrófagos activados*

El peroxinitrito es considerado una molécula efectora durante la respuesta inmune celular por la presencia de microorganismos extraños [84, 85].

En condiciones de estimulación apropiadas, las células del sistema inmune, en particular los macrófagos, son capaces de producir cantidades importantes de peroxinitrito, mediante la generación simultánea de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, por acción de la NOS2 y NOX2 respectivamente [70, 86]. Los macrófagos expuestos a citoquinas de tipo Th1, principalmente interferón γ (INF γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o a lipopolisacáridos de la pared bacteriana (LPS), inducen la NOS2 obteniéndose niveles significativos de $\cdot\text{NO}$ luego de 3 a 4 h con un flujo de 0.2-0.3 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína que se mantiene durante 15 a 16 h [86].

Por su parte, las partículas fagocitadas, zimosan opsonizado o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), promueven el ensamblaje de los componentes de membrana y citosol de la NOX2 mediante fosforilación de p47phox (gp91phox, p47phox y p67phox) [18, 87, 88]. La liberación de $\text{O}_2\cdot^-$ comienza inmediatamente luego de agregado el estímulo y permanece durante 90 a 120 min con un flujo de 0.3-0.4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹. Es así que la producción simultánea de ambos radicales genera un flujo de peroxinitrito que se mantiene durante un período de 2 h alcanzando niveles intrafagosómicos de 50-100 μM .min⁻¹, que representan un flujo altamente tóxico. Sin embargo, su concentración de estado estacionario efectiva es del orden nanomolar debido a la presencia de múltiples blancos con los que puede reaccionar a nivel celular [19].

Cuando los macrófagos contienen un microorganismo internalizado en el fagolisosoma, éste se expone a $\text{O}_2\cdot^-$ generado hacia el interior de la vacuola por la NOX y al $\cdot\text{NO}$ que difunde desde las formas citosólicas y particuladas de la NOS2 [89] con la consecuente formación de peroxinitrito.

Si bien existe evidencia del rol del peroxinitrito como molécula efectora en la citotoxicidad asociada a macrófagos, su acción podría estar limitada por su corta vida media en medios biológicos (~10 ms) y su difusión transmembrana restringida [19]. El peroxinitrito debe permear la membrana plasmática para ejercer su efecto citotóxico extracelular. Esto es posible gracias a la existencia de canales aniónicos para la especie ONOO⁻, y la difusión pasiva que rige a la especie ONOOH, ya que ambos procesos coexisten a pH fisiológico [49, 90]. Sin embargo, fuera de la célula puede reaccionar con el CO₂ presente u otras moléculas y ser rápidamente consumido, por lo que su alcance real es igual o menor a 20 μm desde su sitio de formación [90, 91]. Debido a que su velocidad de reacción con ciertas moléculas blanco es similar a su velocidad de difusión, el hecho de que ocurra reacción o difusión va a depender de la concentración de blancos potenciales, el sitio de formación y concentración del peroxinitrito y su cinética con los blancos presentes [91].

Como herramienta experimental para determinar la formación de ONOO^- en el medio intracelular se utilizan las sondas fluorescentes 2',7'-dicloro dihidrofluoresceína (DCDHF) y su análogo estructural 123 dihidrorodamina (DHR), que son oxidadas por el peroxinitrito con una eficiencia del 38 y 44 % respectivamente. La cuantificación de peroxinitrito mediante sondas de oxidación ha mostrado ser una técnica más sensible (aunque menos específica) que aquellas que cuantifican nitración, obteniéndose con las primeras resultados más cercanos a los obtenidos a partir de la utilización de peroxinitrito sintetizado [92]. Teniendo en cuenta que en un medio biológico el CO_2 presente reacciona rápidamente con el peroxinitrito generando $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y NO_2 , se podría suponer una subestimación de la presencia de ONOO^- , sin embargo ambos radicales son capaces de oxidar mediante un electrón a ambas sondas, de modo que la presencia de CO_2 en el medio no afecta los rendimientos de ONOO^- producido mediante flujo [86].

1.2 DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos aerobios han desarrollado un complejo sistema de defensa para protegerse del daño por radicales libres, productos secundarios e indeseables de la utilización del oxígeno como fuente de energía., constituido por antioxidantes fisiológicos. Su producción es modulada por mecanismos que se activan frente a un aumento en la producción de radicales libres, para controlar y estabilizar el ambiente redox intra y extracelular.

Un agente antioxidante es una especie química capaz de donar electrones a otra especie que entonces es reducida. Están presentes en bajas concentraciones con respecto a un sustrato oxidable, en este caso biomoléculas (lípidos, proteínas o ácidos nucleicos), y actúan retardando o previniendo su oxidación. Al reaccionar con un radical libre, el agente antioxidante cede un electrón, se oxida y él se transforma en un radical libre débil no tóxico [93].

Los antioxidantes pueden ser clasificados en diferentes categorías, no excluyentes. De acuerdo con su origen pueden ser endógenos o generados a partir de un sistema biológico, o exógenos, provistos a partir de la dieta. Desde el punto de vista fisicoquímico pueden ser hidrosolubles o liposolubles. Finalmente, desde un punto de vista funcional se clasifican en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Nos basaremos en esta última clasificación para detallarlos.

1.2.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Las defensas enzimáticas más importantes en mamíferos son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX) y las peroxirredoxinas (PRX).

1.2.1.1 *Superóxido dismutasa*

La SOD (E.C. 1.15.1.1) cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 , siendo una de las primeras líneas de defensa frente al potencial daño oxidativo de ese radical. Existen varias isoformas de SOD que se clasifican según el ión metálico que actúa como cofactor y su ubicación celular como Cu/Zn-SOD citosólica (SOD1), Mn-SOD mitocondrial (SOD2) y Cu/Zn-SOD extracelular (SOD3). La SOD1 se ubica principalmente en citoplasma y en menor concentración en mitocondria, núcleo, peroxisomas y lisosomas. La SOD2 se sintetiza en el citoplasma y se trasloca a la mitocondria mediante un péptido señal, donde participa en la dismutación de la mayoría del $O_2^{\cdot-}$ generado por la cadena respiratoria mitocondrial. Su acción debe complementarse con otros sistemas que a su vez eliminen H_2O_2 [94]. La SOD3 se ubica fundamentalmente en la matriz extracelular y protege a la célula del daño causado por el $O_2^{\cdot-}$ liberado desde neutrófilos y macrófagos al ejercer su función [94, 95].

1.2.1.2 *Catalasa*

La CAT (E.C. 1.11.1.6) es una enzima tetramérica que cataliza la descomposición del H_2O_2 en agua. Se localiza principalmente en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariotas. Posee dos actividades enzimáticas; la actividad catalasa que descompone H_2O_2 para dar H_2O y O_2 ; y la actividad peroxidasa, que cataliza la oxidación de metanol, etanol y fenoles, a expensas de peróxidos orgánicos [96].

1.2.1.3 *Glutación peroxidasa*

La GPX (E.C. 1.11.1.9) cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O y de otros hidroperóxidos orgánicos (ROOH) a alcohol a expensas de glutación reducido (GSH). El glutación oxidado (GSSG) es entonces nuevamente reducido por la enzima glutación reductasa (GR) a expensas de NADPH de modo de conservar las reservas intracelulares de GSH. Posee varias isoformas algunas dependientes de selenio y otras no. En vertebrados, se encuentran en citosol, mitocondria y membranas celulares [97].

1.2.1.4 *Peroxirredoxinas*

Las peroxirredoxinas (PRX, EC 1.11.1.15) catalizan la reducción de H_2O_2 , $ONOO^-$ y peróxidos orgánicos en presencia de tiorredoxina. Se localizan principalmente en citosol, aunque también existen en la mitocondria, asociadas al núcleo y a la membrana de todos los organismos y poseen un ciclo catalítico altamente conservado. Durante la catálisis participa un residuo de cisteína (Cys) o cisteína peroxidática que se ubica en el sitio activo del extremo amino terminal junto a residuos prolina, arginina y treonina, todos altamente conservados. Esta Cys es capaz de reducir varios tipos de peróxidos con una eficiencia catalítica de entre $10^6 - 10^7 M^{-1}s^{-1}$ [98]. Luego de su oxidación, el tiol se transforma en ácido sulfénico que es reciclado a tiol reducido a

expensas de un segundo tiol libre que puede provenir de la misma enzima (Cys resolutive) o de otra. Las PRX se clasifican en 1-Cys y 2-Cys según su Cys resolutive provenga de otra molécula (1-Cys) o de la misma molécula (2-Cys) [99].

1.2.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Las defensas antioxidantes no enzimáticas se dividen en moléculas hidrosolubles y liposolubles. Dentro de las primeras las más importantes son glutatión y vitamina C (ascorbato) y dentro de las segundas están la vitamina E (tocoferoles) y vitamina A (carotenoides).

1.2.2.1 *Glutatión*

El glutatión (GSH) o γ -glutamylcysteinylglycine es un tripéptido endógeno hidrosoluble constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina, vital para el normal funcionamiento celular. Según su estado de óxido-reducción, puede encontrarse como glutatión reducido (GSH) u oxidado (GSSG). Debido a su rol modulador en la señalización redox celular, es crítico que un pool importante se mantenga en estado reducido (GSH). El glutatión se sintetiza en el citosol y si bien un 90 % se encuentra allí, el 10 % restante se ubica en mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo. Su concentración celular es 0.5-10 mM, siendo la relación GSH:GSSG de 10:1, con excepción del retículo endoplasmático donde la relación cae a 1:1 para permitir el correcto plegamiento y formación de puentes disulfuro de las proteínas. Posee varias funciones como detoxificación de xenobióticos, transporte de Cys, biosíntesis de leucotrienos y prostaglandinas, mantenimiento de función y estructura de varias proteínas, regulación de la actividad enzimática y regeneración de otros antioxidantes (ej. ascorbato). Sin embargo su función más importante es el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular protegiendo a la célula de los efectos indeseados de las especies reactivas por reacción directa con ellas. En presencia de un oxidante, el GSH cede un átomo de hidrógeno y se oxida a $\frac{1}{2}$ GSSG. El GSSG formado es reducido entonces a GSH por la enzima glutatión reductasa (GR), a expensas de los electrones donados por NADPH [100].

1.2.2.2 *Vitamina C*

La vitamina C o ácido ascórbico (**Figura 1.5**) es un diácido que a pH fisiológico se encuentra como monoanión radical o monodehidroascorbato (MDA) y cuya oxidación por dos electrones produce el dehidroascorbato (DA). Es capaz de reaccionar con radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), urato ($\text{UH}\cdot$) y α -tocoferilo ($\text{TO}\cdot$). Su reacción con $\text{TO}\cdot$, producto de la oxidación de la vitamina E, es particularmente importante para la regeneración de ésta última. Dada la naturaleza liposoluble de la vitamina E e hidrosoluble de vitamina C, esta reacción ocurre en la interfase lípido-agua (generalmente en la superficie de lipoproteínas), quedando expuesto hacia la fase acuosa el radical $\text{TO}\cdot$. El potencial redox del par ascorbato/

MDA, le permite además ser un buen dador de un electrón participando como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que involucran oxigenasas e hidroxilasas, donde el ejemplo más conocido es el de la prolil hidroxilasa durante la síntesis de colágeno.

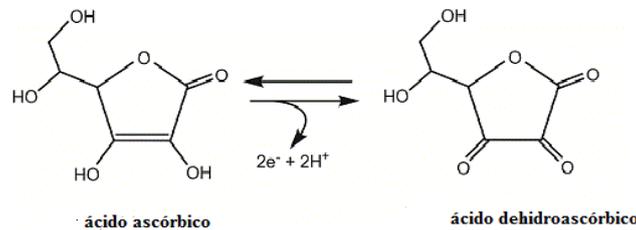


Figura 1.5- Ácido ascórbico o Vitamina C

Debido a su rol clave en la defensa contra las especies reactivas, existen mecanismos redundantes que reciclan tanto MDA como DA a ascorbato. El reciclado de MDA se realiza tanto por la citocromo b5 reductasa como por la tiorredoxina reductasa, ambas dependientes de NAD(P)H como dadores de electrones. El DA por su parte es reducido a ascorbato en células de mamífero a través de numerosas GSH y NADPH dehidroascorbato reductasas (glutarredoxina, tiorredoxina reductasa y proteína disulfuro isomerasa) [101, 102].

1.2.2.3 Vitamina E

Existen 8 estructuras químicas que se incluyen bajo la denominación de vitamina E que tiene como base un núcleo de dos anillos denominado cromano y una cadena alifática de 16 carbonos (**Figura 1.6**). Las estructuras se denominan α , β , γ y δ -tocoferol y α , β , γ y δ -tocotrienol, siendo α -tocoferol el compuesto biológicamente más activo.

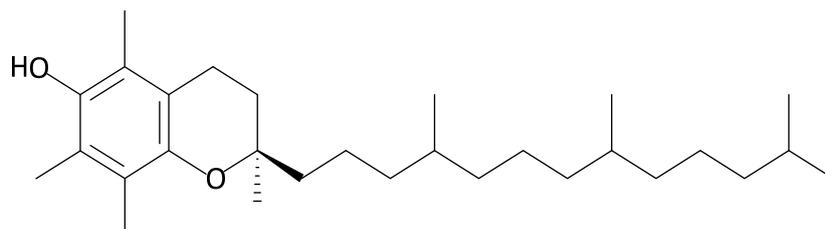


Figura 1.6. α -tocoferol

Es sintetizado exclusivamente en vegetales y su principal función es proteger principalmente los lípidos de membranas biológicas del daño oxidativo, inhibiendo la fase de propagación en la lipoperoxidación mediante la formación del radical α -tocoferilo. Este radical se forma por reacción con un radical libre (ej. $\cdot OH$), mediante la abstracción de un H de su fenol exocíclico, generando un radical menos reactivo y más estable por deslocalización en el anillo

aromático. El radical TO^\bullet puede ser reciclado por otros antioxidantes como ascorbato y ubiquinol [103].

1.2.2.4 Carotenoides

Los carotenoides son isoprenoides de naturaleza liposoluble presentes en vegetales y son responsables de la coloración de sus frutos. Sus propiedades antioxidantes residen en la estructura de largas cadenas con dobles enlaces conjugados. A partir de su reacción con una especie reactiva, el radical generado se estabiliza por deslocalización dentro de la cadena alifática. Al igual que la vitamina E se ubica en membranas biológicas e impide la reacción en cadena que ocurre durante la peroxidación lipídica [103].

1.3 ESPECIES REACTIVAS Y SEÑALIZACIÓN REDOX

Las especies reactivas han sido estudiadas desde un principio como especies tóxicas y principales responsables del desarrollo de diversos estados patológicos a causa de un desbalance oxidativo. Sin embargo, la evidencia acumulada en los últimos años ha obligado a cambiar esta visión, ya que algunas de estas especies producidas en bajas dosis participan en vías normales de señalización celular [104, 105]. Entre ellas se encuentran NO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , ya mencionadas.

El mecanismo principal por el que alteran distintas funciones proteicas se basa en la regulación a través de la oxidación de residuos de cisteína reactivos y presentes en dichas proteínas. Los residuos de cisteína reactivos al ser oxidados forman ácido sulfénico (-SOH) que puede formar puentes disulfuro con cisteínas próximas o ser sobreoxidados a ácido sulfinico (-SO₂H) o sulfónico (-SO₃H) alterando de este modo la estructura y función proteica. Estas modificaciones funcionan como sensores del estado redox celular y poseen sistemas tiorredoxina y peroxirredoxina capaces de revertirlas, sobre todo en los estados sulfénico y disulfuro [106].

En el caso del NO^\bullet , la respuesta biológica que genera puede ser GMP cíclico (GMPc)-dependiente o GMPc-independiente. El NO^\bullet es un mediador ubicuo de diversos procesos biológicos como vasodilatación, neurotransmisión, citotoxicidad, relajación de músculo liso gastrointestinal y broncodilatación [16, 17, 107]. Esto es posible gracias a la activación de diferentes vías de señalización que inicialmente activan a la guanilato ciclasa soluble y particulada. A su vez el GMPc activa quinasas dependientes de él, por ejemplo la proteína quinasa G, que fosforila varios canales y receptores, regulando así diversos efectos endógenos asociados a GMPc. Además el NO^\bullet puede formar aductos con metales, S-nitrosar y nitrar residuos proteicos (principalmente Y) modulando la actividad enzimática [30].

Por su parte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 han emergido como moléculas señalizadoras, aunque las limitaciones para su detección *in vivo* hacen muy difícil discernir sus efectos, ya que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es

una molécula de corta vida y dismuta rápidamente a H_2O_2 . Sin embargo, las investigaciones realizadas en *Escherichia coli* muestran que este organismo posee vías independientes para cada molécula. Mientras un aumento en la producción de H_2O_2 es detectado por el factor de transcripción OxyR, el SoxS lo hace con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ [105].

El H_2O_2 es capaz de interactuar con la familia de las tirosina fosfatasa (PTP), que poseen en su sitio activo un residuo de cisteína activo, blanco potencial de diversos oxidantes y en cuyo mecanismo catalítico se ha detectado la presencia de un intermediario sulfénico de carácter reversible. Es por eso que la base de la fosforilación de tirosina inducida por agentes oxidantes se relacionaría más bien con una inhibición en la actividad de fosfatasa que con la activación de quinasas [108].

El H_2O_2 también participa en la S-glutationilación de proteínas. El GSH es un importante atrapador de H_2O_2 , generando GSSG a partir de dos moléculas de glutatión por acción de la enzima glutatión peroxidasa (GPX) y es reconvertido a GSH por la glutatión reductasa a expensas de NADPH. El GSSG generado puede reaccionar con el anión tiolato ($-\text{S}^-$) de un residuo de cisteína reactivo cercano, o bien una molécula de GSH puede reaccionar con un intermediario sulfénico ($-\text{SOH}$) generado por oxidación de una cisteína reactiva, para en ambos casos producir un intermediario glutationilado. Esta modificación que ocurre tanto en condiciones fisiológicas como patológicas afecta tanto a factores de transcripción como a enzimas y proteínas estructurales. La S-glutationilación es un mecanismo de señalización por el que las células responden en forma eficiente y reversible a los cambios redox. A través de la modulación del factor de transcripción Nrf2 y la inducción de la expresión de los genes antioxidantes en la región ARE, regulan la mayoría de las rutas celulares. Regulan la sobrevivencia celular a través del factor de transcripción NF κ B, activando genes de supervivencia y la muerte celular programada por modulación de la caspasa 3 [109].

Los estudios moleculares realizados a los 5 isotipos de NOX aislados hasta el momento sugieren que hay un modo general de regulación de la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Se han aislado una serie de proteínas relacionadas a la subunidad gp91^{phox} (nox2), clave en la activación de la NOX2 en macrófagos, que se expresan hacia el exterior de los macrófagos y serían las responsables de dicha producción. De todos modos las cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ generadas por las NOX no fagocíticas nunca alcanza los niveles observados en macrófagos, siendo estas magnitudes más compatibles con su uso como moléculas de señalización. Tanto las NOX como las NOS se ensamblan del mismo modo para producir un “estallido” en células fagocíticas como para producir pequeñas cantidades más compatibles con un sistema de señalización redox en las no fagocíticas [105].

1.4 SEÑALIZACIÓN REDOX Y RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es un proceso inmunológico complejo que se desencadena en condiciones normales en respuesta a una infección o daño producido por un agente patógeno. Se caracteriza por una acumulación de fluidos locales y por el reclutamiento de leucocitos con el objetivo de eliminar el estímulo dañino. Este proceso es acompañado por una serie de síntomas clínicos como calor, rubor, entumecimiento y dolor [110]. Durante el proceso, los monocitos activados a macrófagos aumentan su consumo de oxígeno produciendo lo que se denomina “estallido respiratorio” e incrementando la liberación y acumulación de ERO a nivel local. Por otro lado, las células inflamatorias liberan citoquinas y quimioquinas que a su vez atraen más células inflamatorias al lugar. Estos mediadores solubles son clave en la activación de distintas cascadas de señalización a través de cambios a nivel de factores de transcripción que provocan una respuesta inmediata ante dicho estrés [111].

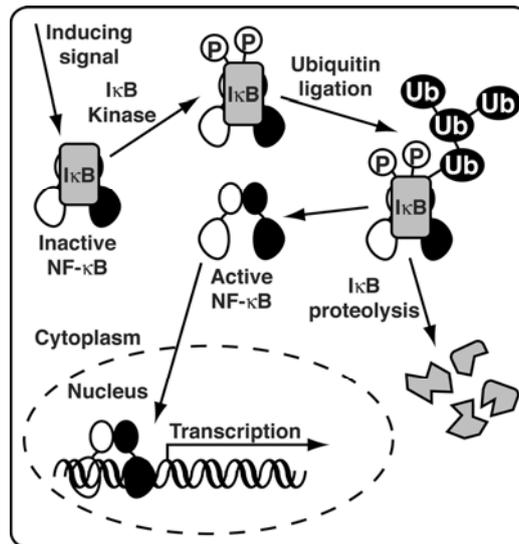
El proceso inflamatorio en su etapa inicial o fase aguda es mediada por la activación de las células del sistema inmune, es de corta duración y muy favorable para el hospedero. Cuando esta etapa se prolonga en el tiempo y no se resuelve, se establece un estado en el que el hospedero queda predispuesto a una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas. Las principales moléculas mediadoras de la inflamación son el ^1NO , las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y selectina E, las prostaglandinas E2 e I2, los leucotrienos B4 y C4 y las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1, IL-6, además de los factores NF- κ B, AP-1, PPARs y Nrf2 cuya capacidad de unión al ADN es alterada por las distintas vías de señalización y las quinasas PTKs y MAPKs. En un ambiente donde existe un proceso inflamatorio y oxidativo sostenido en el tiempo se genera un círculo vicioso que puede dañar los tejidos adyacentes sanos y luego de determinado tiempo desencadenar enfermedades crónicas tales como diabetes, Alzheimer, trastornos cardiovasculares y enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso o artritis reumatoidea [112].

1.4.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

1.4.1.1 *NF- κ B*

La vía de señalización mediada por NF- κ B es considerada la mayor reguladora de la respuesta inmune innata e inflamatoria. El NF- κ B es un factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) que controla la transcripción del ADN. Este factor de transcripción responde a señales de estrés oxidativo e induce la producción de proteínas vinculadas a la inflamación como la NOS2 y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), además de varios mediadores de la inflamación como TNF- α e IL-6. Este factor puede ser activado por un estímulo inflamatorio como el lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS), citoquinas (INF γ) y

oxidantes (H_2O_2), mediante la fosforilación de su inhibidor I κ B por la I κ B quinasa (IKK), que a su vez es un marcador para su ubiquitinación y degradación en el proteosoma (**Esquema 1.1**). La degradación de I κ B deja libre el motivo de localización nuclear de NF- κ B, permitiendo su rápida translocación y la transcripción de genes blanco [113]. La importancia de esta vía en la modulación de procesos inflamatorios, la transforma en blanco para el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios [114]



Esquema 1.1. Activación del factor de transcripción NF- κ B. Extraído de [115].

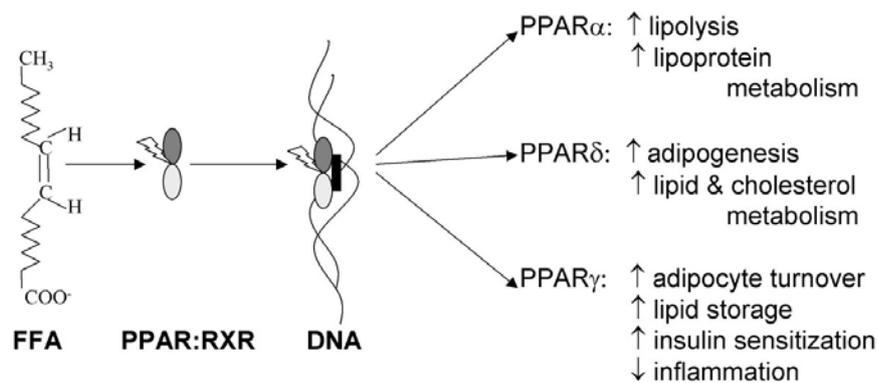
La activación de este factor también es crítica en otros procesos fisiológicos que incluyen crecimiento, supervivencia, desarrollo y proliferación celular [116-118], regulando la expresión de cientos de genes involucrados en respuesta al estrés, inflamación y apoptosis [119, 120].

Debido a que NF- κ B es activado en varios tipos celulares por diversos agentes estimulantes que poseen regulación redox, se propuso que las ERO podrían estar involucradas en su modulación actuando como segundos mensajeros [121-123]. La modulación redox de la vía aún no está clara. Existen estudios que demuestran que cuando el grado de estrés oxidativo es bajo se favorece la activación de NF- κ B, mientras que la presencia de grandes cantidades de oxidantes la inhiben conduciendo a la célula a la apoptosis [124]. Las ERO podrían ejercer cierta modulación en la respuesta y en los productos de los genes activados por NF- κ B que atenuaran su propio efecto promoviendo la supervivencia [119].

1.4.1.2 PPAR

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son una familia de factores de transcripción nuclear que pertenecen a la superfamilia de receptores esteroideos. Están formados por las isoformas PPAR α , δ (o β) y γ , siendo ésta última la más estudiada. Estos

receptores regulan principalmente el metabolismo de la glucosa, lípidos y lipoproteínas, por unión a pequeñas moléculas lipofílicas. Son activados por ligandos naturales derivados de los lípidos de la dieta, por ligandos sintéticos como fibratos, glitazonas y antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Entre los ligandos fisiológicos de los PPARs se encuentran los ácidos grasos libres, eicosanoides y sus derivados de las vías de la lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasa (COX) [125].



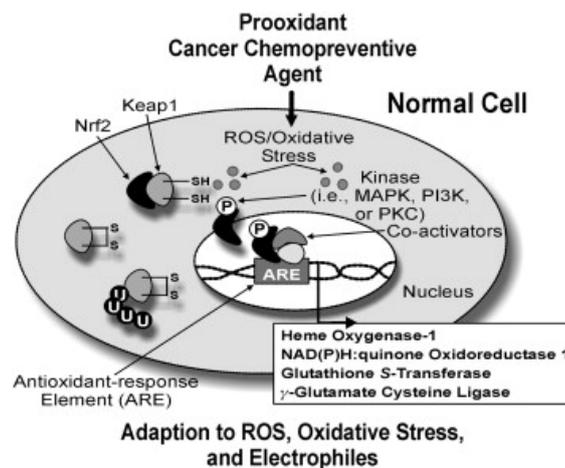
Esquema 1.2. Activación y efectos de PPARs. Extraído de [126].

Luego de su unión al ligando, PPAR forma un heterodímero con el RXR α , para luego unirse a PPRE modulando la transcripción de sus genes blanco (**Esquema 1.2**). Si bien PPAR regula el transporte y metabolismo lipídico [127], también disminuye la producción de TNF- α , INF γ e IL-6) y algunas proteínas de fase aguda como la PCR [128]. Los mecanismos moleculares antiinflamatorios de los PPAR se basan en su acción inhibitoria sobre promotores de los genes que codifican proteínas inflamatorias. Para reprimir la transcripción los PPARs se unen a factores represores como *c-Jun* y la subunidad p65 de NF- $\kappa\beta$. Los agonistas de este receptor reprimen la expresión de VCAM1 en trombocitos inducida por citoquinas; en monocitos y macrófagos reducen la expresión de factor tisular y metaloproteinasas; en endotelio inhiben la expresión de IL-6 y COX-2 y en linfocitos T inhiben la secreción de IL-2 y TNF- α [129].

1.4.1.3 *Nrf2*

El factor de transcripción Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2) regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés Antioxidant Response Element), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa.

Este factor se encuentra normalmente inhibido por su unión a la proteína de citoesqueleto *keap-1*. La estimulación con agentes electrofílicos (xenobióticos o antioxidantes) modifica esta interacción para que el factor pueda traslocarse hacia el núcleo. Una vez allí actúa en la región ARE promotora de genes de múltiples enzimas detoxificantes entre las que se encuentran la NAD(P)H quinona reductasa, las enzimas de fase II que participan en el metabolismo de xenobióticos (GST, UGT), hemoxygenasa y tiorredoxina [130-134] (**Esquema 1.3**).



Esquema 1.3. Activación y efectos de Nrf2. Extraído de [135].

Este factor además es capaz de modular la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular y la expresión de COX-2 y NOS2.

1.4.1.4 AP-1

Este es un factor sensible a los cambios redox que regula la expresión de varios mediadores inflamatorios. Se encuentra formando un heterodímero con miembros de la superfamilia Jun y Fos y se une a una secuencia palíndrome en el ADN, regulando la expresión de genes vinculados a la apoptosis, respuesta celular a estrés e inflamación [136]. Su actividad es regulada principalmente por JNK, perteneciente a las MAPKs [137, 138].

1.4.2 MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

El NO en condiciones proinflamatorias es sintetizado en macrófagos activados a partir de la NOS2 y es beneficioso cuando se produce durante un corto período de tiempo, sin embargo cuando la condición se mantiene, el exceso de NO puede conducir a shock séptico y enfermedades inflamatorias [139, 140]. Es por esta razón que la inhibición selectiva en la expresión o actividad de la NOS2 es un efecto deseable en un fármaco antiinflamatorio.

En las células inflamatorias, las prostaglandinas son sintetizadas por COX-2 donde es altamente expresada, sin embargo hasta el momento los inhibidores selectivos de COX-2 no han

mostrado ser seguros, probablemente debido a la presencia de tromboxanos producidos a nivel de COX-1. Los leucotrienos que participan en los procesos inflamatorios son peptidoleucotrienos, LTB₄, LTC₄ y LTD₄, generados principalmente por la lipooxigenasa-5. En ambos casos la investigación se dirige a encontrar inhibidores seguros que actúen a nivel de dichas enzimas [111].

Las citoquinas son responsables de la mayoría de los efectos biológicos en el sistema inmune como la inmunidad mediada por células y respuestas de tipo alérgico. Si bien existen numerosas citoquinas, éstas pueden ser subdivididas en 2 grupos: las proinflamatorias y las antiinflamatorias. La mayor fuente de producción de citoquinas son los linfocitos T que poseen receptores específicos de antígeno en su superficie para reconocer patógenos extraños y tejido normal durante episodios de autoinmunidad. Existen dos subpoblaciones de linfocitos T que se diferencian por sus moléculas de superficie en CD4⁺ y CD8⁺. Los linfocitos CD4⁺ son conocido como células T helper (Th) y son los más prolíficos generadores de citoquinas. Poseen un estado inicial indiferenciado (Th0) en el que liberan pequeñas cantidades de IL-2, IL-4 e IFN- γ . En presencia de ciertas citoquinas esta población puede diferenciarse en dos subgrupos denominados Th1 y Th2. La diferenciación a Th1 ocurre a través de la IL-12 producida por macrófagos activados o células dendríticas y es potenciada por la presencia de IL-18 (o factor inductor de IFN- γ) [141]. La diferenciación a Th2 es inducida por IL-4 producida en varios tipos celulares como mastocitos, basófilos, linfocitos T NK (asesinas naturales) o en forma autócrina por ellas mismas y potenciada por IL-6 e IL-7 secretadas por macrófagos y fibroblastos [142].

Las citoquinas liberadas por los linfocitos Th1, como IL-2, IFN- γ , TNF- α y linfotóxina- α (denominada indistintamente TNF- β o LT- α) están asociadas a la producción de IgG₂ promoviendo respuestas proinflamatorias responsables de la eliminación de parásitos y de perpetuar reacciones de autoinmunidad. Una excesiva respuesta proinflamatoria conduce a un daño tisular descontrolado que debe ser regulado. Las citoquinas liberadas por los linfocitos Th2 incluyen IL-4, 5, 9 y 13 y están asociadas con la producción de IgG₁, IgE e IL-10 con respuesta antiinflamatoria. Estas citoquinas producidas en exceso son capaces de contrarrestar la acción microbicida mediada por las Th1 [143].

Dentro de los linfocitos CD4⁺ o Th, existe un subgrupo con características de linaje diferente a Th1 que produce IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y TNF- α y se denominan Th17 [144, 145]. La IL-17 induce la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y PGE₂ y actúa sinérgicamente con IL-1 α , TNF- β , IFN- γ y con ligandos CD40⁺ de linfocitos T [146].

Los macrófagos por su parte son también capaces de liberar numerosas citoquinas proinflamatorias y regulatorias a partir de estímulos solubles tales como complejos inmunes, componentes bacterianos, metabolitos lipídicos, hormonas y sus propias citoquinas. Dentro de

las citoquinas proinflamatorias producidas por macrófagos se encuentran el MIF, TNF- α , IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-18), IL-2 (IL-15) e IL-12 (IL-23 e IL-27) y dentro de las regulatorias están IL-1Ra, IL-10, TGF- β , y TNF-Rs. Ambos grupos son capaces de ejercer un efecto autócrino que se vuelve importante en el desarrollo de un estado patológico [147].

La producción de las citoquinas proinflamatorias como consecuencia de un estímulo puede ser disminuída por diferentes moléculas entre las que se encuentran los polifenoles, conocidos antioxidantes, que ejercen de este modo entonces una acción antiinflamatoria [148, 149].

Las quimioquinas son pequeñas citoquinas quimiotácticas que controlan la migración de leucocitos en estado fisiológico y patológico. Una de ellas, la CXCL8, es producida en macrófagos y células epiteliales, siendo inhibida su expresión por diversos compuestos polifenólicos como quercetina, ácido cafeico y resveratrol [149, 150]. La principal quimioquina involucrada en la migración de leucocitos polimorfonucleares es CXCL2 y su expresión también es inhibida por polifenoles [151].

Por su lado la adhesión de monocitos circulantes a la vasculatura endotelial es clave en los procesos de inflamación. Las células endoteliales responden a los estímulos proinflamatorios de TNF- α , LPS e IL-1 β atrayendo a los monocitos por la expresión selectiva en su superficie de las moléculas de adhesión celular VCAM-1, ICAM-1 selectina-E (ELAM-1). Estos procesos pueden ser inhibidos también por sustancias antioxidantes como los polifenoles, curcumina, resveratrol y quercetina entre otros [152, 153].

1.5 ARTRITIS REUMATOIDEA

1.5.1 GENERALIDADES

La artritis reumatoidea (AR) se define como una patología sistémica y autoinmune, caracterizada por provocar una inflamación crónica articular, que comienza principalmente en diartrosis pequeñas. Esta inflamación sostenida en el tiempo provoca hiperplasia y destrucción progresiva o sinovitis erosiva simétrica con distintos grados de deformidad que conduce a la incapacidad funcional de la articulación. A nivel sistémico provoca trastornos cardiovasculares, pulmonares, psicológicos y esqueléticos (**Figura 1.7**) [154], y se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos, principalmente anti-proteínas citrulinadas (AAPC) y factor reumatoideo (FR).

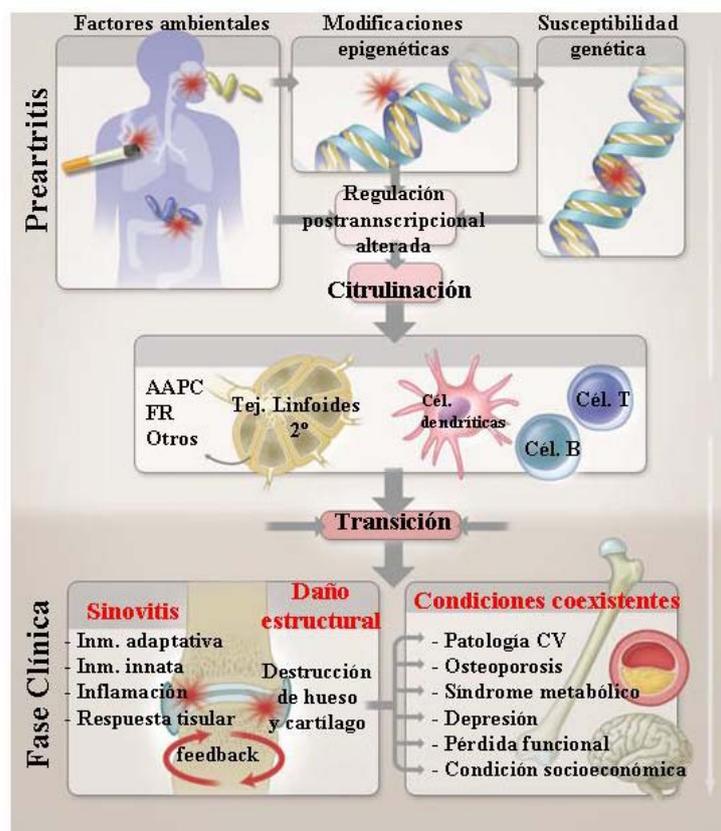


Figura 1.7. Desarrollo del síndrome de artritis reumatoidea. La interacción entre factores ambientales y genéticos promueve la pérdida de tolerancia hacia proteínas propias que contienen citrulina como consecuencia de la modificación postraduccional de la arginina. Ocurre entonces una respuesta de los linfocitos T y B a un estímulo generado en tejidos linfoides y médula ósea, que se inicia en la articulación por un mecanismo poco entendido y complejo. La sinovitis se inicia y perpetúa en la articulación, promoviendo otros estados patológicos a nivel sistémico que definen el síndrome de la AR. Adaptado de [154].

Esta enfermedad dolorosa e incapacitante, conduce a una pérdida de calidad de vida en el paciente y a un aumento de su morbilidad. Se presenta con mayor frecuencia en personas del sexo femenino, en una relación de 3:1 y tiene una prevalencia estimada entre 0.5 y 1 % de la población mundial [155, 156]. En el Uruguay, tanto la prevalencia como la incidencia son desconocidas, pero se estima similar a la europea (0.5 %) dadas las características mayoritariamente caucásica de nuestra población [157]. La edad promedio de aparición se ubica entre los 40 y 50 años, aunque también puede afectar a niños en la forma de artritis idiopática juvenil [158, 159]. Para definir la presencia y estadio de la enfermedad, la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) y el Colegio Americano de Reumatología (ACR) colaboran en la elaboración de un listado que actualmente incluye 7 criterios: presencia de entumecimiento matinal, presencia de nódulos subcutáneos, factor reumatoideo positivo, cambios radiográficos, inflamación simétrica simultánea de una misma articulación, hinchazón en muñeca o entre falanges y un mínimo de tres articulaciones inflamadas [160].

Su etiología es desconocida y su patogenia autoinmune es determinada por un antígeno desencadenante aún no determinado presente en individuos genéticamente predispuestos que conduce a una reacción inmunológica e inflamatoria que inicia en la sinovia articular [156].

Existen varios genes candidatos para el desarrollo de una respuesta inmunológica alterada que operan ya sea mediante la selección defectuosa del repertorio de células T (ej: *HLA-DRB1*), la estimulación y diferenciación funcional de dichas células (ej: *PTPN22* y *CTLA4*), o la señalización mediada por el factor nuclear NF- κ B (ej: *TRAF1-C5* y *c-REL*) [154, 161]. Si bien el componente genético es importante y está presente en el 50 % de los casos, la respuesta autoinmune anormal observada también puede ser producto de la combinación de distintos factores biológicos y ambientales como cambios hormonales, agentes infecciosos virales o bacterianos y tabaquismo, entre otros (**Figura 1.7**) [162, 163].

1.5.2 PROCESO INFLAMATORIO E INMUNOLÓGICO EN LA ARTICULACIÓN SINOVIAR ARTRÍTICA

Una articulación sinovial sana contiene neutrófilos, mastocitos, sinoviocitos tipo A o macrófagos sinoviales capaces de presentar antígenos, y sinoviocitos tipo B con características de fibroblastos. Estos últimos son los encargados de la formación y mantenimiento de la matriz extracelular, mediante la producción de colágeno y ácido hialurónico, componente principal del líquido sinovial para el normal funcionamiento articular (**Figura 1.8**).

La matriz extracelular está integrada por tres grandes grupos de componentes: proteoglicanos (principalmente agregán) y glucosaminoglicanos; proteínas estructurales (colágeno tipo II, IX y XI y elastina) y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). En condiciones normales los sinoviocitos A y B secretan cantidades controladas de metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Las MMPs constituyen una familia de más de 25 miembros de endopeptidasas dependientes de zinc que digieren distintos componentes de la matriz (colagenasas, estromelisin, gelatinasas) para mantener la estructura y flexibilidad de la cápsula articular a través del remodelado [164]. Durante su actividad se desencadenan cascadas de señalización que promueven la diferenciación, migración y movilización celular, por eso se encuentran bajo estricto control a nivel de su transcripción, su secreción como zimógenos inactivos y la presencia de inhibidores tisulares endógenos de MMP (TIMP) [165].

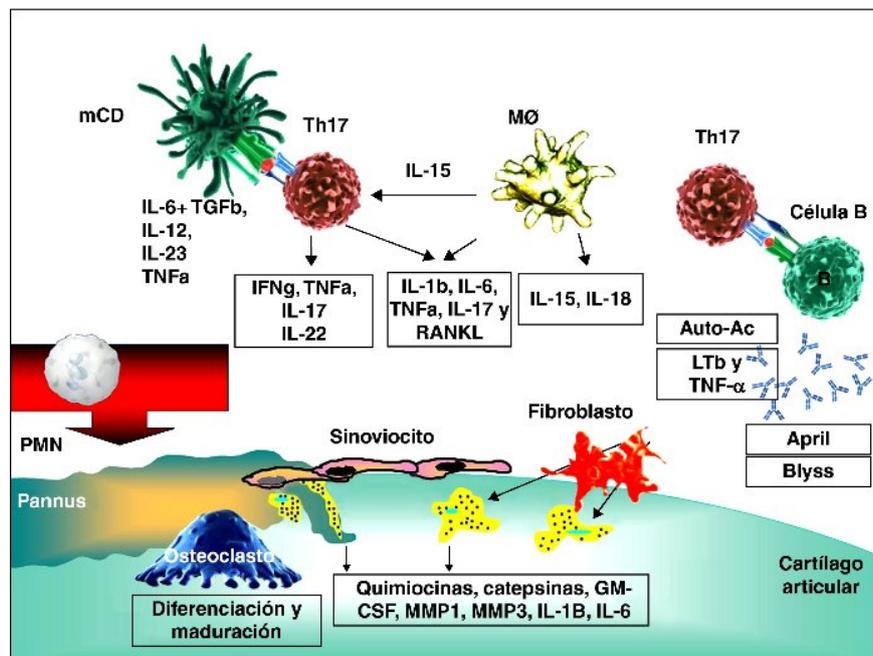


Figura 1.8. Proceso inflamatorio e inmunológico en AR. Interacción de las principales células implicadas en la fisiopatología de la sinovitis y la resorción ósea que conduce a la liberación de enzimas y al daño tisular asociado. Adaptada de Isaacs et al.[166].

Varias MMPs se expresan en forma diferencial tanto en cartilago normal como patológico [167, 168], observándose altas concentraciones en el líquido sinovial de paciente con AR, que sugiere un rol en el cartilago asociado a la patología [169]. En condiciones proinflamatorias los macrófagos activados secretan zimógenos (pro-MMP) en grandes cantidades y su activación ocurre por proteinasas solubles y asociadas a la membrana de los condrocitos (**Figura 1.8**).

1.5.2.1 Activación del sistema inmune innato

La sinovitis o inflamación de la membrana sinovial ocurre a partir de la activación por una causa desconocida de células del sistema inmune innato.

Si bien la AR es considerada una patología mediada por linfocitos Th1, recientemente ha crecido el interés en el rol como mediadores en la génesis del proceso de los subgrupos Th17 y T reguladoras (Treg), presentes en la sinovial de pacientes con AR [170]. Por un lado las Th17, liberan IL-17 que media la respuesta inflamatoria y la activación de los osteoclastos, y por el otro las Treg (CD4+/CD25+), que normalmente inhiben la proliferación celular y secreción de citoquinas, son incapaces de ejercer esta función en la sinovial de estos pacientes [156].

En las primeras etapas, los sinoviocitos tipo B adoptan un fenotipo semiautónomo que muestra independencia de unión, pérdida de inhibición por contacto y expresión de altos niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y quimioatrayentes, moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las interleuquinas quimioatrayentes IL-8, IL-16, MCP-1,

MIP-1 α y el ligando de RANK (RANKL), reclutan células inflamatorias desde la sangre hacia la articulación. Además actúan en sinergia con las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-16, TNF- α , IL-11, IL-15, RANK-L, MIF y con PGE2 aumentando la permeabilidad vascular y la adhesión celular [171]. En particular RANK-L es uno de los más importantes en la destrucción articular ya que es capaz de reclutar monocitos e inducir su diferenciación a osteoclastos activos (**Figura 1.8**) [172].

La multiplicación celular en la capa subíntima de la membrana sinovial produce engrosamiento e inflamación articular [156] generando un tejido altamente proliferativo llamado pannus. Este tejido posee una resistencia alterada a sufrir apoptosis fomentada por diferentes factores como la presencia de citoquinas anti-apoptóticas (IL-2 e IL-4), la pérdida funcional del gen de supresión tumoral p53 o la expresión de proteínas de estrés (ej: hsp70) contribuyendo al mantenimiento y propagación del proceso inflamatorio [173, 174]. Durante este proceso ocurre neoangiogénesis como consecuencia de la hipoxia generada por aumento de la población celular en el compartimiento articular [154].

Los macrófagos también son importantes efectores de la sinovitis mediante la liberación de TNF- α , IL-1, 6, 12, 15, 18 y 23, y de ERO y ERN por activación de NOX y NOS2, producción de prostanoïdes, MMPs, fagocitosis y presentación de antígenos. Esta activación polarizada al fenotipo M1 activado de macrófagos ocurre como consecuencia de la presencia en el medio de IFN- γ , TNF- α , GM-CSF y productos microbianos como LPS, mediante receptores TLRs y NLRs capaces de reconocer patrones moleculares asociados a la presencia de patógenos y daño celular [154, 175].

Los neutrófilos presentes en el líquido sinovial sintetizan PGs, proteasas y ERO, mientras que los mastocitos producen aminas vasoactivas (serotonina e histamina), citoquinas, quimioquinas y proteasas [176, 177].

Durante la instalación de la AR comienza un proceso de destrucción articular que involucra tanto al hueso como al cartílago con erosión local y osteopenia general del hueso. Si bien estos procesos son diferentes, ambos dependen en parte del estado inflamatorio determinado por el patrón de citoquinas proinflamatorias presentes. Este patrón varía en los distintos estadios de la enfermedad y es capaz de activar tanto a condrocitos, encargados de la producción de la matriz ósea, como a osteoclastos, responsables de la reabsorción del hueso, provocando erosión y pérdida de la función articular [178].

Los sinoviocitos tipo B además de favorecer la diferenciación de monocitos a osteoclastos activos, promueven en el cartílago la destrucción de la red de colágeno tipo II mediante la secreción de MMPs entre las que se encuentran MMP-1, 3, 8, 13, 14 y 16, siendo

principalmente expresada MMP-14 (o MMP tipo I). Los inhibidores de MMPs (TIMPs) se vuelven incapaces de revertir esta cascada destructiva [179].

A su vez en estadios tempranos de la enfermedad, condrocitos y macrófagos inducen mutuamente alteraciones en los perfiles de expresión de las MMP y sus inhibidores. En particular se ha demostrado que la activación del zimógeno MMP-9 producido por monocitos/macrófagos, es dependiente de factores derivados de los condrocitos, tales como MMP-3 [180]. La exposición reiterada de los condrocitos a citoquinas como IL-1, IL-17A y especies reactivas provoca su apoptosis y por ende la pérdida de la capacidad regenerativa del cartílago [154].

La erosión ósea también ocurre en respuesta a citoquinas presentes en la sinovial. En particular GM-CSF y RANK-L, promueven la diferenciación y activación de osteoclastos y su invasión al periostio adyacente al cartílago articular, mientras que TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-17 amplifican este efecto [181, 182].

1.5.2.2 Respuesta inmune adaptativa

La autoinmunidad ocurre como consecuencia de una falla en la selección y eliminación a nivel del timo y luego a nivel periférico, de aquellos linfocitos T capaces de reaccionar contra péptidos propios.

La sinovial artrítica presenta abundantes células dendríticas mieloides y plasmocitoides, que expresan diferentes citoquinas (IL-12, 15, 18 y 23), moléculas de MHC II, y moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de las células T y la presentación de antígenos [183].

La activación de las células T requiere de al menos dos señales diferentes. La primera señal ocurre como consecuencia de la unión de un linfocito T virgen (timocito) con un receptor de células T (TCR) unido al complejo CD3. A su vez la interacción entre TCR/CD3 y moléculas de MHC I o MHC II direcciona el linaje hacia linfocitos T CD8⁺ (T citotóxicas) o T CD4⁺ (Thelper), respectivamente. Mientras que las moléculas clasificadas como MHC I se expresan en prácticamente todas las células nucleadas, las de tipo MHC II se limita a células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) como linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T activados. La segunda señal ocurre por interacción con moléculas diversas que activan las células T favoreciendo su multiplicación, supervivencia y producción de citoquinas. Estas moléculas coestimuladoras se clasifican en tres grandes grupos: inmunoglobulinas (CD28 y CD2), receptores de TNF- α (CD40, CD27, CD134, CD137) y receptores de citoquinas (IL-2R, IL-7R, IL-1R, IL-6R). Una de las formas de coestimulación mejor caracterizada es la que se establece entre la familia de receptores CD28 (CD28 e ICOS) expresados en la superficie de los linfocitos T y los ligandos CD80 y CD86 expresados en todos los tipos de CPA [184]. En la sinovial de pacientes con AR se ha observado además la presencia de CD80 y CD86 en la superficie de

linfocitos T activados, lo que sugiere un mecanismo autosustentable de activación. La presencia de grandes cantidades de estas moléculas coestimuladoras en la sinovial artrítica sugiere una activación aún en ausencia de antígeno [185].

En condiciones normales, los linfocitos B en presencia de antígeno se diferencian en dos poblaciones efectoras. Una subpoblación desarrolla una respuesta inmune primaria e independiente de linfocitos T mediada por IgM, que constituye la primera línea de defensa inmunológica y no genera memoria inmunológica. La otra, está integrada por linfocitos B activados y diferenciados ante la presencia de un antígeno reconocido y se denominan plasmocitos o células B de memoria. Poseen memoria inmunológica y secretan grandes cantidades de anticuerpos o autoanticuerpos en el caso de patologías autoinmunes. Los factores que determinan que un linfocito B residente en los centros germinales pertenezca a uno u otro subgrupo no son claros. Tanto en la sangre periférica como en la sinovial artrítica, se observa una frecuencia elevada de plasmocitos con respecto a un individuo sano. Ésto no necesariamente significa una pérdida de tolerancia inmunológica o fallas en el proceso de selección y tampoco se sabe si son o no autoreactivos. Sin embargo, la presencia de una elevada concentración de células B de memoria es un factor de riesgo para el desarrollo de autoinmunidad y la producción de autoanticuerpos, ya que poseen umbrales de activación más bajos y han escapado al proceso de selección negativa [186].

Los procesos de recombinación e hipermutación somática para la maduración de la afinidad están normalmente bajo estrictos controles para proteger al organismo de la autoinmunidad. Mientras que un individuo sano posee un 20 % de células B autoreactivas, en un paciente con AR este porcentaje asciende a 35-52 %. Si bien una causa podría ser la presencia de puntos de control defectuosos, la situación no mejora luego de terapias con anti-TNF- α , anti-CD20 o metotrexato. Esto indica que la autoinmunidad podría tener un origen secundario a la inflamación, eliminando su rol en la etiología [187].

1.5.3 AUTOANTICUERPOS DIAGNÓSTICOS EN AR

La autoinmunidad está dirigida a moléculas modificadas que no son reconocidas como propias, generando la producción de autoanticuerpos. La exactitud y frecuencia de medidas de la actividad de la AR es crítica para un planteo óptimo de tratamiento y la obtención de un mejor pronóstico [188].

Los principales marcadores serológicos de autoinmunidad sistémica en esta patología son el factor reumatoideo (FR) y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados (AAPC). Si bien se incluyen en el protocolo de diagnóstico junto con la determinación de VES y PCR (marcadores de inflamación), existe un porcentaje de pacientes FR negativo (~20 %) que sin embargo

desarrollan la enfermedad y pacientes FR positivos que presentan otra patología o están sanos, por lo que los resultados deben considerarse en conjunto con pruebas radiográficas y exámen clínico [189]. Ambos puede preceder en varios años a la aparición de la enfermedad por lo que no son consecuencia de la enfermedad ni causa suficiente para generarla [190].

El FR está formado por una familia de autoanticuerpos, principalmente de tipo IgM, dirigidos contra el dominio Fc de IgG. Son producidos localmente por los linfocitos B presentes en folículos linfoides y centros germinales que se desarrollan en la sinovial inflamada y se detecta en el 60-80 % de los casos [191]. El FR de individuos sanos tiene baja afinidad y su función es eliminar complejos inmunes y ayudar a los linfocitos B a procesarlos y presentarlos a las células T. En la AR, el FR está presente en grandes cantidades en la sinovial y posee mayor afinidad, por lo que ejerce su función de manera patológica, potenciando la inflamación y captura de autoantígenos dentro de la articulación [192].

Los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (AAPC) constituyen un grupo presente en el 70-90 % de los casos de AR y poseen alta especificidad para la enfermedad (95 %) [193]. Los pacientes AAPC positivos presentan mayor erosión a nivel articular y una asociación directa con la presencia del componente genético *HLA-DRB1* de la enfermedad [194, 195]. Los blancos de los AAPC son varios, pudiéndose encontrar citrulinados fibrinógeno, fibrina, colágeno tipo I y II, vimentina, queratina, el factor perinuclear, y α -enolasa, entre otros [196-199]. La citrulina es un aminoácido no estándar que se origina como resultado de una modificación postraduccional realizada por la enzima peptidilarginina deiminasa (PAD), sobre un residuo de arginina. El rol fisiológico de la citrulinación no es claro, pero el cambio en la carga del residuo arginina (+) a neutro en la citrulina, vuelve a las proteínas modificadas más propensas a la degradación (**Figura 1.9**) [200].

Cuando las células apoptóticas son eliminadas de manera eficiente, las proteínas citrulinadas y PAD se liberan hacia el espacio extracelular. Allí, las proteínas modificadas son capturadas por las CPA y la enzima PAD actúa sobre las proteínas de la sinovial [201]. Se ha comprobado experimentalmente la formación de un complejo inmune entre las proteínas citrulinadas y los AAPC, con la subsiguiente fijación al complemento en la sinovial artrítica capaz de perpetuar la inflamación [202].

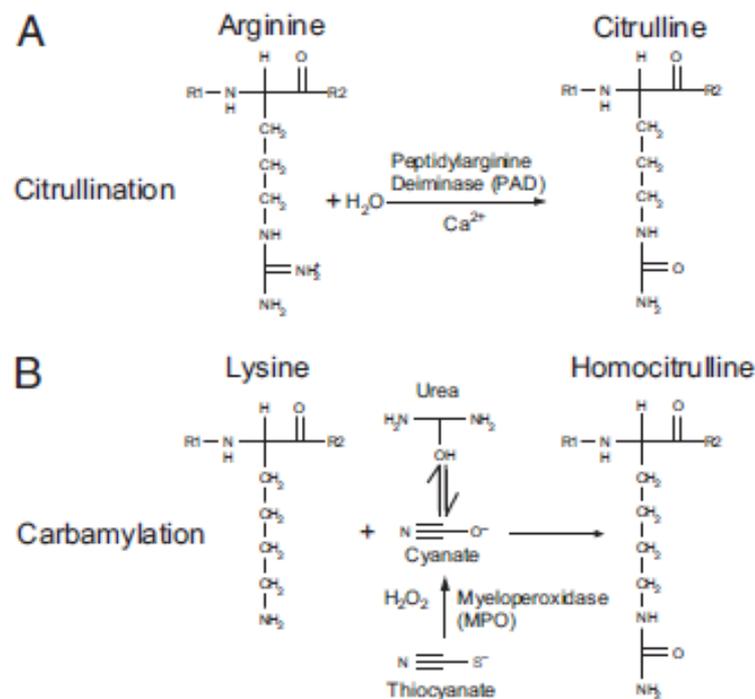


Figura 1.9. Reacciones de citrulinación y carbamilación. A. Generación de un residuo de citrulina a partir de arginina y catalizada por la enzima peptidilarginina deiminasa (PAD). B. Reacción de carbamilación de un residuo de lisina a expensas de urea. Extraído de [203].

Recientemente se han detectado autoanticuerpos contra proteínas carbamiladas (anti-CARP). La carbamilación es una modificación postraduccional que ocurre entre el cianato (OCN^-) presente en el organismo y el aminoácido lisina, formando homocitrulina [204]. Tanto la citrulina como la homocitrulina poseen una estructura muy similar y carga neutra, teniendo la homocitrulina un grupo CH_3 extra (**Figura 1.9**). La carbamilación proteica se encuentra aumentada en falla renal, fumadores e inflamación crónica donde la expresión de MPO está aumentada y favorece la transformación de tiocianato a cianato a expensas de H_2O_2 [205, 206]. Los anticuerpos anti-CARP se han detectado en pacientes con AR tanto AAPC positivos como negativos, lo que indica una reacción específica, por lo que podrían ser especialmente útiles en aquellos pacientes AAPC negativos, donde no existen otros valores pronósticos fiables [203]

1.5.4 ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS EN AR

En la AR como en el resto de las enfermedades autoinmunes, es necesario diferenciar los factores desencadenantes de aquellos que favorecen la persistencia y progresión del estado patológico. La condición autoinmune se asocia a la activación de células efectoras produciendo grandes cantidades de especies reactivas que tienen un rol importante en procesos de inflamación y autoinmunidad, aunque se desconoce la etapa de la patología en la que participan [207, 208]. Se establece así un estado prooxidante que promueve la inflamación y la generación de neoantígenos [209, 210].

El $O_2^{\cdot-}$ es producido por la isoforma NOX2 ensamblada en macrófagos, células dendríticas y otras células efectoras una vez activadas por algún estímulo externo. Este radical tiene un rol proinflamatorio ya que produce daño en células y matriz extracelular y aumenta la permeabilidad en la microvasculatura promoviendo la migración de neutrófilos hacia el foco de la inflamación. El $O_2^{\cdot-}$ también es producido por los osteoclastos durante la resorción ósea normal. Este proceso se intensifica en presencia de IL-1 β , liberándose grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$ y provocando un daño articular [211]. La enzima encargada de detoxificar el $O_2^{\cdot-}$ en estos entornos es la isoforma SOD3, que tiene a su cargo el 80 % de la actividad SOD en el fluido articular, sin embargo los pacientes con AR poseen la actividad de esta enzima disminuída en un 50 %, volviendo los tejidos tisulares más vulnerables a esta especie reactiva [212]. De hecho, la sobreexpresión de SOD3 en ratones transgénicos suprime la incidencia y desarrollo de la enfermedad en el modelo de AR inducida por colágeno (CIA) [213]. Como se mencionó en la sección 1.1.1, el $O_2^{\cdot-}$ además puede dar origen a las especies reactivas $\cdot OH$, H_2O_2 , HClO y ONOO $^-$, de acuerdo al entorno en que se encuentre, aumentando su potencial daño oxidativo. Por ejemplo, la exposición de los condrocitos a H_2O_2 inhibe la síntesis de proteoglicanos y la síntesis de ADN, disminuyendo además las reservas de ATP por inactivación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [214]. El $\cdot OH$ originado a partir de $O_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 mediante reacción de Fenton posee alta reactividad y puede oxidar lípidos, proteínas y ADN cercanos a su sitio de generación modificando su función [215]. Los pacientes con AR presentan una expresión incrementada de MPO y por lo tanto el HClO se produce en cantidades importantes induciendo la descomposición de ácido hialurónico, entrecruzamiento anormal de colágeno tipo I y disminución de la viscosidad del líquido sinovial [216, 217].

De los compuestos miméticos de SOD los más estudiados son el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (tempol), un nitróxido de bajo peso molecular capaz de atravesar membranas, y el complejo de Mn(II) pentaazamacrocíclico M40403. El tempol además de atenuar los efectos *in vitro* del $O_2^{\cdot-}$ ha mostrado su eficiencia también en diferentes modelos de AR [218, 219]. El M40403 atrapa directamente $O_2^{\cdot-}$ y a su vez ejerce una acción sinérgica con otros tratamientos de rutina en AR como metotrexato y dexametasona [220, 221].

Por su parte, el $\cdot NO$ es producido a nivel articular por sinoviocitos A o macrófagos activados, osteoclastos y osteoblastos. La expresión de NOS2 se encuentra aumentada en el fluido sinovial de pacientes con AR produciéndose una mayor concentración de $\cdot NO$ allí [222, 223]. La liberación endógena de $\cdot NO$ induce la actividad COX en macrófagos y por lo tanto la producción de prostaglandinas inflamatorias y vasodilatadoras [224]. En los condrocitos el $\cdot NO$ presenta dos tipos de respuestas, a bajas concentraciones inhibe a las MMPs y estimula la síntesis de proteoglicanos; mientras que a altas concentraciones como las inducidas por

citoquinas proinflamatorias, activa las MMP e induce apoptosis por alteración del potencial transmitocondrial mediante la inhibición del complejo IV [225]. Si bien existen múltiples estudios que utilizando inhibidores de NOS muestran que el $\cdot\text{NO}$ afecta la producción de diferentes moléculas de la matriz como agregán o condroitinsulfato, en última instancia la molécula efectora es el ONOO^- , producido a partir de su reacción con $\text{O}_2^{\cdot-}$ [226, 227].

Como ya se mencionó, en condiciones proinflamatorias se liberan grandes cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ en forma simultánea que conducen a la formación de ONOO^- . El ONOO^- genera un desbalance en el estado redox celular mediado por la oxidación de GSH que provoca que la IKK fosforile a I κ B posibilitando la translocación de NF κ B hacia el núcleo para mediar en la transcripción de diversos mediadores inflamatorios [228]. También afecta la producción de colágeno tipo II y agregán, disminuye la respuesta de los condrocitos a IGF-1, incrementa la expresión de MMP-3 y MMP-13 y disminuye la activación de los TIMPs, provocando la ruptura de la matriz [229, 230].

Tanto las especies reactivas liberadas por células efectoras en el entorno de los linfocitos T como las producidas internamente por las actividades COX y LOX, actúan sobre diferentes moléculas de membrana alterando la transducción de señales y la respuesta celular externa e interna en los linfocitos T y por lo tanto son clave para su activación en el desarrollo de la AR. Las células T de líquido sinovial de AR contienen una mayor concentración de especies reactivas en relación a las de la sangre periférica, que se asocia a una concentración disminuida de GSH y un incremento de tiorredoxina. Este ambiente oxidante favorece la apoptosis mediante un cambio de respuesta de Th1 a Th2, caracterizado por la liberación de IL-4, IL-12 e inhibición de IFN γ [231]. Varios factores de transcripción como NF κ B, STAT y AP-1 están sujetos a regulación redox. El aumento de especies reactivas favorece la activación, proliferación y muerte celular, sin embargo, si su producción se vuelve crónica podría conducir a un fenotipo refractario a estímulos antigénicos, mitogénicos y apoptóticos, y en última instancia a la cronicidad [232]. Además en la articulación artrítica las células T poseen un comportamiento disfuncional ya que allí se acumula una población oligoclonal primando la expansión y retención sobre el proceso de eliminación [233].

1.5.5 MODELOS DE GENERACIÓN DE NEO-ANTÍGENOS

Como ya se mencionó, la condición autoinmune está asociada a una producción elevada de especies reactivas que producen diversas modificaciones postraduccionales en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, generando ligandos para los que los autoanticuerpos poseen gran afinidad [234]. Este comportamiento se atribuye a una población de células T cuyo fenotipo es

CD4+/CD28^{null}, que poseen características proinflamatorias y citotóxicas, y son resistentes a la apoptosis [233].

La generación de neo-antígenos puede ocurrir a partir de diferentes procesos. El modelo conocido como “mimetismo molecular” se basa en la existencia de una subpoblación de células T que reconocen antígenos propios que escapan a su delección clonal en el timo, persisten en individuos sanos y bajo el estímulo apropiado pueden iniciar respuestas autoinmunes. Entonces, ciertos péptidos de patógenos con estructura similar a péptidos propios se expresan y reconocen por ese grupo de linfocitos T [156].

Un segundo modelo llamado “extensión de epitope” sugiere el desarrollo de anticuerpos contra nuevos epítopes en el antígeno original basado en una pérdida de tolerancia. Estos nuevos epítopes inmunogénicos se originan como consecuencia de un procesamiento alterado de diferentes biomoléculas modificadas por acción de las especies reactivas. Los anticuerpos reactivos contra esos determinantes neo-antigénicos poseen reactividad cruzada con antígenos propios. Se considera que ambos mecanismos participan en la instalación de la patología autoinmune, siendo el “mimetismo molecular” quien iniciaría el proceso y la “extensión de epitope” quien prolonga su patogenicidad [234].

1.5.5.1 Biomoléculas modificadas por ERO y ERN como potenciales neo-antígenos

La presencia de productos de peroxidación lipídica, nitrito, 3NO₂-Y, colágeno tipo II nitrado, LDL e IgG oxidadas en diferentes fluidos biológicos de pacientes con AR evidencia la participación indirecta de especies reactivas en la destrucción articular [235-237].

Todas estas modificaciones podrían afectar el procesamiento de la molécula afectada favoreciendo su reconocimiento como componente extraño por parte de los linfocitos T.

Las proteínas autólogas pueden transformarse en inmunogénicas por modificaciones postraduccionales tan variadas como transglutaminación, desaminación, glicosilación, nitración o proteólisis limitada pudiendo desenmascarar un nuevo antígeno que conduzca a la pérdida de tolerancia [171]. De todas estas modificaciones la más ampliamente reconocida como biomarcador de inflamación y daño oxidativo es la nitración de tirosinas [238]. Las proteínas con tirosinas nitradas se han aislado de suero y sinovial de pacientes con AR y osteoartritis y su aumento intraarticular se asocia con el daño [239]. Al exponer 3NO₂-Y al suero de pacientes con AR se observó la presencia de anticuerpos anti proteínas nitradas, siendo mayores sus niveles en los estadios más avanzados de la enfermedad [240, 241].

La sinovial de pacientes con AR contiene agregados producidos por entrecruzamiento covalente de IgG nitrosada y clorinada por acción de ONOO⁻ y HClO respectivamente, sin embargo estos agregados no mostraron propiedades inflamatorias, produciendo una inhibición

dosis-dependiente de la activación del complemento y disminuyendo su afinidad tanto por C1q como por C3 convertasa [235]. En este caso la modificación oxidativa no funcionaría como neoantígeno.

Por otra parte si bien el colágeno tipo II sin modificar produce cierto nivel de autoanticuerpos, su significado clínico no es claro. Cuando el colágeno se expuso a oxidantes $^{\bullet}\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$ y ONOO^- o se glicosiló se observó fragmentación y agregación, además de una mayor afinidad al suero de paciente con AR. Esto muestra la existencia de potenciales anticuerpos presentes en el suero capaces de reconocer específicamente al colágeno tipo II modificado, que sería entonces un potencial neo-antígeno [242].

También se han aislado anticuerpos contra LDL oxidada y nitrada del suero de pacientes con AR y lupus eritematoso sistémico. Los pacientes con AR temprana presentan títulos elevados de autoanticuerpos contra LDL oxidada. En aquellos que presentan complicaciones cardiovasculares, donde la LDL nitrada es atrapada por macrófagos con mayor avidez que la LDL nativa u oxidada, se han observado mayores niveles de autoanticuerpos contra LDL nitrada [243].

Las modificaciones oxidativas en general causan agregación y cambios conformacionales que favorecen la exposición de nuevas zonas hidrofóbicas, ambas características podrían explicar la interacción incrementada que se observa entre autoantígenos y autoanticuerpos [234].

1.5.6 TRATAMIENTO TERAPÉUTICO

Los tratamientos remisivos actuales en AR incluyen fármacos antiartríticos modificadores de la enfermedad (FAME) sintéticos y biológicos. Los objetivos terapéuticos principales incluyen la disminución del dolor, mantenimiento de la función articular y disminución de la progresión de la enfermedad.

1.5.6.1 *Fármacos de primera línea*

En etapas tempranas de la enfermedad se aplica lo que se denomina un tratamiento de primera línea basado en el uso de antiinflamatorios no esteroideo (AINEs), corticoides y FAME sintéticos. Los AINEs controlan el dolor y el edema reduciendo la inflamación aguda, pero no alteran el curso de la enfermedad ni previenen el daño articular. Su uso a altas dosis y durante tiempos prolongados presenta efectos colaterales importantes, principalmente sobre el aparato gastrointestinal, y en el caso de los inhibidores selectivos de la COX-2 un aumento del riesgo cardiovascular [244]. Los corticoides (principalmente la prednisona) por su poder antiinflamatorio brindan un alivio sintomático rápido en pacientes con gran inflamación y compromiso funcional. Se utilizan en la menor dosis posible y en forma transitoria, como puente mientras se produce el efecto de los FAME. Se administran siempre en forma conjunta con algún

otro fármaco y si bien no está considerado como tal estudios recientes han mostrado que los glucocorticoides en etapas tempranas podrían actuar como FAME, mejorando los registros radiográficos [245].

Los FAME sintéticos más utilizados son el metotrexato (MTX), leflunomida, sulfasalacina, sales de oro (ej. aurotioglucosa), hidroxicloroquina y cloroquina. El MTX es un análogo del dihidrofolato, por lo que inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa. Además posee propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias, ya que inhibe la proliferación y función de los linfocitos T y B, suprimiendo la liberación de IL-1, INF γ , TNF- α y otras citoquinas. Es el fármaco más utilizado de este grupo por su eficacia y bajo costo. Actúa tanto en el control de síntomas y recuperación funcional como en la disminución de la progresión de erosiones óseas. Los efectos adversos más frecuentes incluyen cirrosis hepática, neumonitis intersticial, mielosupresión y riesgo aumentado de desarrollo de linfomas, que ya es alto en pacientes con AR [246]. El MTX penetra en las células utilizando un transportador de folato reducido o por difusión pasiva. Cuando se administra por vía oral, se absorbe en el tracto digestivo mediante un mecanismo de transporte activo y se metaboliza a nivel hepático, lo que limita su biodisponibilidad. Adicionalmente, parte del metotrexato es metabolizado por la flora intestinal ocasionando un metabolito inactivo. Por ambas razones se han observado mejores resultados cuando es administrado en ayunas [247]. Una vez en la circulación sanguínea, el MTX se une a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, en un 50-60 %. Entre el 80 y 90 % es eliminado por vía renal dentro de las primeras 24 h [248].

Los FAME leflunomida, sulfasalazina y sales de oro hasta el momento son utilizados como terapia combinada sólo en casos de intolerancia al MTX. La hidroxicloroquina y cloroquina son fármacos antimaláricos, con escasa habilidad para prevenir la destrucción articular. Se utilizan en regímenes combinados, aunque no está claro si son capaces de potenciar el efecto, es por eso que no son considerados en los actuales algoritmos [249].

1.5.6.2 *Fármacos de segunda línea*

El término “agentes biológicos”, incluye agentes terapéuticos que tienen el potencial de inhibir la acción de citoquinas, la activación celular y la transcripción de genes por diversos mecanismos. Se indican a pacientes que no responden frente al uso de al menos dos fármacos de primera línea en dosis adecuadas durante 6 meses [250].

Dentro de los bloqueadores de actividad TNF- α más utilizados se encuentran Adalimumab (IgG1 monoclonal recombinante humana), Infliximab (anticuerpo monoclonal quimérico 75 % humano y 25 % ratón) y Etanercept (proteína de fusión entre receptor p75 de TNF- α y porción Fc de IgG1 humana). Se utilizan en terapia combinada con MTX y poseen

importantes efectos colaterales, ya que las citoquinas participan en la inmunidad contra infecciones y el consumo de antagonistas de citoquinas, aumentan el riesgo de contraerlas [251].

En aquellos casos en que existe una ausencia de respuesta, respuesta subóptimas o intolerancia al uso de anti-TNF- α , se utilizan fármacos alternativos dirigidos a blancos diferentes. El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano anti-CD20 que se obtiene por ingeniería genética y se administra en combinación con el MTX. El Abatacept es una proteína de fusión (CTLA4-Ig), que inhibe selectivamente la co-estimulación para la activación completa de los linfocitos T que expresan CD28, mediante su unión específica a CD80 y CD86, disminuyendo por igual la producción de TNF- α específico de antígeno, INF γ e IL-2 por los linfocitos y se administra junto con MTX. El Tocilizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a receptores de IL-6 tanto solubles como unidos a membranas (IL-6Rs e IL-Rm) e inhibe la señalización mediada por ambos y se administra junto con MTX. Por último, Arkinra es una forma recombinante no glicosilada del antagonista del receptor de IL-1, IL-1R α y compite con éste por la unión a IL-1 α y β , inhibiendo la señalización intracelular [252].

Sus efectos secundarios son variados e incluyen infección en vías respiratorias superiores; celulitis, neumonía, herpes, gastritis; erupción, cefalea, mareos; elevación de transaminasas hepáticas, leucopenia, neutropenia; hipercolesterolemia, conjuntivitis, eritemas e infecciones óseas y articulares entre otras [253].

1.6 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El tratamiento terapéutico actual para la AR se basa en el uso de fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos y biológicos, que ocasionan importantes efectos secundarios en el individuo y no incluye ningún abordaje antioxidante. En este sentido se ha observado que el antioxidante curcumina es capaz de inhibir la activación de neutrófilos y sinoviocitos *in vitro* [254], los retinoides ejercen inmunomodulación mediante la disminución de la producción de especies reactivas en células polimorfonucleares activadas y en modelos animales [255, 256], además la *N*-acetilcisteína es capaz de bloquear el efecto del factor nuclear NF κ B en el modelo CIA [257]. La suplementación con vitamina E en un modelo de artritis espontánea, fue capaz de detener la destrucción articular pero no modificó otros parámetros de la enfermedad ni alteró la respuesta inmunológica [258]. Estudios doble ciegos de suplementación con ésta no mostraron cambios en la probabilidad de desarrollar AR en relación con el placebo [259]. En pacientes con AR, no tuvo efectos sobre la actividad de la enfermedad ni sobre la inflamación, sin embargo mostró una disminución del dolor y un posible rol analgésico [260].

Por otra parte, el consumo regular de suplementos y/o alimentos ricos en de vitamina C [261] y carotenoides [262] se asoció positivamente con menor riesgo de desarrollar la enfermedad.

Los nitrolípidos son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que contienen un grupo nitroalqueno como consecuencia de su reacción con ERN y se encuentran en plasma, tejidos y células [78]. El grupo nitroalqueno le confiere un carácter electrófilo al C β adyacente pudiendo actuar como antioxidante mediante adición de Michael con moléculas neutrófilas como tioles y aminas primarias y secundarias [263, 264]. A concentraciones reportadas del orden de micromolar, estas moléculas son capaces de inhibir la activación de plaquetas, de macrófagos, la secreción de citoquinas proinflamatorias y la proliferación de células de músculo liso [265-267].

El grupo de investigación de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias ha estudiado una serie de derivados de benzofuroxanos conteniendo un grupo funcional nitroalqueno con actividad tripanosomicida, capaces de liberar $^{\bullet}\text{NO}$ [268]. Por otra parte se han estudiado diversos nitroalquenos aromáticos y alifáticos como liberadores de $^{\bullet}\text{NO}$, destacándose en tal sentido el fenileténitro derivado [269]. También se han estudiado nitroalquenos aromáticos similares a los sintetizados para este trabajo, como agentes biológicos, mostrando que su actividad antifúngica se encuentra asociada al motivo β - nitroestireno [270].

2 HIPÓTESIS

Los nitroalquenos aromáticos sintéticos son capaces de reaccionar con especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno gracias a su electrofilicidad, reaccionando con moléculas nucleofílicas para lograr productos de adición estables. Adicionalmente estas moléculas, como sus análogos lineales podrían tener efectos sobre la actividad de enzimas y mecanismos de señalización celular, previniendo o disminuyendo el desarrollo de respuesta inflamatoria, en particular en artritis reumatoidea. Esta propiedad será útil para el desarrollo de fármacos capaces de prevenir o disminuir el daño tisular asociado a procesos inflamatorios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar una serie de nitroalquenos aromáticos sintéticos como antioxidantes y como potencial fármaco en el tratamiento de la artritis reumatoidea.
2. Analizar los marcadores de actividad de artritis disponible y explorar potenciales nuevos índices

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Estudiar la capacidad de los nitroalquenos aromáticos para atrapar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, producidas por distintos sistemas *in vitro* y generadas por macrófagos murinos activados.
- B. Evaluar el efecto de los nitroalquenos sobre condrocitos expuestos en co-cultivo a los oxidantes derivados de macrófagos activados.
- C. Probar aquellos nitroalquenos que muestren mejores resultados como antiinflamatorios, analgésicos y agentes antirreumáticos en un modelo animal de artritis reumatoidea inducida por adyuvante completo de Freund (CFA)..
- D. Analizar la relación entre la progresión de la patología y los índices clásicos de artritis y desarrollar nuevos indicadores que incluyan nivel de antioxidantes totales en plasma y el estudio de la presencia de anticuerpos antinitrotirosina en el suero de pacientes portadores de artritis reumatoidea.

4 MÉTODOS

4.1 SÍNTESIS DE NITROALQUENOS

4.1.1 SÍNTESIS DE BENCENOS 1-(1-PROPENIL-2-NITRO)-4-SUSTITUIDO Y 1-(1-ETENIL-2-NITRO)-4-SUSTITUIDO

Los nitroalquenos fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Orgánica (Facultad de Ciencias). Sumariamente se presenta la forma general de síntesis de los 14 nitroalquenos utilizados en este trabajo. Todos los reactivos utilizados están disponibles comercialmente y fueron utilizados sin purificación posterior. Previo a su uso, los disolventes fueron secados y destilados. La reacción se llevó a cabo entre aldehídos aromáticos y nitroalcanos (reacción de Henry) utilizando una amina primaria como catalizador y metanol o etanol como disolvente, que conduce directamente al producto de condensación nitroaldólica [271], con modificaciones de acuerdo a lo descrito en la literatura [272, 273]. Una mezcla del correspondiente benzaldehído-4-sustituido (1 eq.), nitroetano (2.1 eq.) o nitrometano (2.1 eq.), *n*-butilamina (0.14 mL) y etanol (5.6 mL) fueron calentados a reflujo durante 10-15 h o 5 h (propenil y etenil derivados, respectivamente). Luego, el disolvente se destiló *in vacuo* y el producto se lavó con hexano para obtener el correspondiente producto. Los nitroalquenos fueron caracterizados mediante espectroscopia de ¹H-RMN y espectrometría de masa, confirmando la presencia del isómero *Z* como único producto obtenido [272].

4.1.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE NITROALQUENOS

Las soluciones stock de nitroalquenos se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) a partir de los sólidos, se utilizaron en el día y se descartaron cada vez. En los experimentos realizados en cultivos celulares y debido a su conocida citotoxicidad, la concentración final de DMSO utilizada fue siempre menor a 0.5 %. Las diluciones se realizaron en amortiguador fosfato al pH y fuerza iónica requeridos en cada experimento. Los controles correspondientes de absorbancia y fluorescencia para el DMSO y los compuestos también fueron realizados en cada caso.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS NITROALQUENOS

Los nitroalquenos se evaluaron como antioxidantes mediante la técnica de ORAC (del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity). En este método, los radicales ROO[•] producidos por termólisis a 37 °C del azocompuesto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP, 30 mM) oxidan al fluoróforo fluoresceína sódica (FL, 7.5 nM) en amortiguador fosfato (75 mM, pH 7.4,

0.1 mM DTPA), apagando su fluorescencia [274]. Al adicionar a este sistema concentraciones crecientes de un compuesto antioxidante la oxidación del fluoróforo se ve retardada en el tiempo en relación directa con la eficiencia del antioxidante. El decaimiento de la fluorescencia de FL (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 512 nm) se registró durante 140 min en un lector de placas. La curva de calibración se realizó utilizando como patrón de referencia el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromanocarboxílico (Trolox), análogo hidrosoluble de la vitamina E, en concentraciones entre 1.5 y 24 μ M. Los nitroalquenos fueron ensayados en un rango de concentraciones entre 1.5 y 13 μ M. Las curvas de fluorescencia vs tiempo en ausencia y en presencia de los compuestos antioxidantes, fueron primero normalizadas dividiendo los valores entre el dato original de la fluorescencia a $t = 0$ (f_0). A partir de dichas curvas normalizadas, se calculó el área bajo la curva (ABC) para cada caso de acuerdo a la **Ecuación 4.1**.

$$ABC = 1 + \sum_{i=1}^{i=140} \frac{f_i}{f_0} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

El valor neto obtenido como ABC para cada concentración se calculó restando el ABC correspondiente a la reacción entre ABAP y FL en ausencia de antioxidantes (blanco). Para cada nitroalqueno se obtuvo una ecuación de regresión lineal para ABC neta vs concentración de antioxidante. El valor ORAC para cada compuesto fue expresado como equivalentes de Trolox a partir de la curva de calibración obtenida. El valor relativo ORAC fue calculado de la siguiente manera (**Ecuación 4.2**).

$$\text{Valor relativo ORAC} = \frac{\text{pendiente muestra}}{\text{pendiente Trolox}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

4.3 ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CON PEROXINITRITO

4.3.1 PREPARACIÓN DE PEROXINITRITO

El peroxinitrito fue sintetizado en el Laboratorio del Dr. R. Radi (Facultad de Medicina) según metodología descrita anteriormente [275], a partir de NaNO_2 y H_2O_2 en HCl. El ácido peroxinitroso formado (ONOOH) es muy inestable por lo que debió ser estabilizado con NaOH para su conservación como anión peroxinitrito (ONOO^-). Este método genera un producto con alta fuerza iónica con H_2O_2 , NO_2^- y NO_3^- como contaminantes. El contenido de NO_2^- remanente resultó menor a 0.25 moles NO_2^-/mol de peroxinitrito y el exceso de H_2O_2 fue removido con MnO_2 . Se obtuvo un stock de peroxinitrito con una concentración superior a 100 mM determinada por espectrofotometría a 302 nm en NaOH 0.1 M ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [276]. El total del volumen obtenido se conservó alicuotado (500 μ L) a -80 °C.

4.3.2 ESPECTROS UV-VIS EN PRESENCIA DE PEROXINITRITO

Los nitroalquenos (200 μM) fueron termostatizados durante 2 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente expuestos a diferentes concentraciones de ONOO^- (50, 100 y 200 μM) agregadas en bolos consecutivos, en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM) y en agitación continua. Luego se incubaron durante 2 min adicionales a 37 $^{\circ}\text{C}$ y los espectros (280-700 nm) fueron registrados.

4.3.3 ESTUDIO DE LA CINÉTICA RÁPIDA DE REACCIÓN

Los experimentos de cinética rápida se realizaron en un espectrofotómetro provisto con un accesorio de flujo detenido con un tiempo de mezclado simétrico en dos jeringas menor a 10 ms y con una presión de 90 – 120 psi (Applied Photophysics RX2000, Leatherhead, England). En todos los casos se utilizó amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) y se midió el pH de la mezcla al inicio y al final de cada reacción para descartar posibles cambios debidos al NaOH (5 mM) presente en la solución de peroxinitrito. El ajuste de los registros cinéticos se realizó con el software provisto por el instrumento y la temperatura en la celda de reacción se mantuvo a 37.0 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$, mediante utilización de un Peltier.

La cinética de reacción entre el peroxinitrito y los nitroalquenos se siguió a 302 nm donde los cambios en la absorbancia se deben únicamente a la descomposición del peroxinitrito, y los cambios espectrales de los compuestos por agregado de peroxinitrito son mínimos. Se trabajó con una concentración única de peroxinitrito (200 μM) y 5 concentraciones de compuestos entre 20 y 100 μM .

Como método indirecto para determinar la constante cinética se realizó un ensayo de competencia entre los nitroalquenos y Fe^{2+} -Cyt c, que es capaz de reaccionar en forma directa con peroxinitrito [277]. El Fe^{2+} -Cyt c fue generado a partir de la reducción de Fe^{3+} -Cyt c por el agregado de un exceso conocido de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), seguido por una gel filtración para remover el exceso de reductor inmediatamente antes de su uso. El stock de ditionito de sodio se preparó en NaOH (0.1M) previamente desgasificada y fue cuantificado a 420 nm por reducción de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\epsilon_{420} = 1020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) asumiendo una estequiometria de 2:1 [278]. La concentración de Fe^{2+} -Cyt c obtenido fue determinada espectrofotométricamente a 550 nm en el mismo amortiguador ($\epsilon_{550 \text{ nm}} = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [279]. Se expuso Fe^{2+} -Cyt c (360 μM) a 100 μM de peroxinitrito en presencia y ausencia de los nitroalquenos (360 μM) y se cuantificó el Fe^{3+} -Cyt c producido a partir de la disminución de la absorbancia a 550 nm del Fe^{2+} -Cyt c. Previo al agregado de peroxinitrito en agitación continua, las muestras se termostataron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min en amortiguador fosfato (0.1M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA).

Control de adición reversa. El ensayo de adición reversa consiste en agregar en orden inverso los reactivos a la mezcla de reacción. Este control permite descartar la contribución de contaminantes y productos de descomposición (principalmente NO_2^- y H_2O_2) presentes en preparaciones de peroxinitrito. Para ello se preincubó el peroxinitrito en la concentración ensayada en amortiguador a 37 °C durante 2 min para asegurar su descomposición. Luego se agregó Fe^{2+} -Cyt c en agitación continua con vortex y se incubó la mezcla por 2 min adicionales.

4.3.4 CAPTURA DE RADICALES LIBRES DERIVADOS DE PEROXINITRITO

Para estudiar la reactividad de los nitroalquenos con los radicales derivados de la descomposición homolítica del peroxinitrito, $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$, se utilizó la sonda dihidrorodamina 123 (DHR 123, 50 μM). La oxidación de la dihidrorodamina genera rodamina que es fluoróforo ($\lambda_{\text{exc}}=485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$). y cromóforo ($\epsilon_{500 \text{ nm}}=78.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a la vez [92]. La DHR en ausencia y en presencia de nitroalquenos (400 μM), fue expuesta a peroxinitrito (50 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 °C. La producción de rodamina fue determinada a 500 nm ($\epsilon_{500 \text{ nm}}=78.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [280].

Se determinó además la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), para concentraciones de nitroalquenos entre 20 y 300 μM . Los datos obtenidos se ajustaron a una función logística (**Ecuación 4.3**).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Donde A_1 y A_2 son los valores de la asíntota cuando el valor de la variable independiente (x) tiende a 0 y a ∞ , respectivamente. Los valores en el eje de las x se graficaron como \log_{10} de la concentración. Por su parte x_0 representa el punto de inflexión del gráfico y p es la pendiente de la parte recta. El 100 % de oxidación de DHR correspondió a la condición en ausencia de compuesto y en base a dicho valor se hallaron los porcentajes correspondiente a cada concentración de compuesto. El valor del inv log de x_0 corresponde al valor de IC_{50} .

4.4 ATRAPAMIENTO DE ESPECIES REACTIVAS GENERADAS POR MACRÓFAGOS ACTIVADOS

4.4.1 CULTIVO DE MACRÓFAGOS J774

La línea de macrófagos murinos J774 (ATCC- TIB-67, American Type Culture Collection) fue generosamente provista por la Dra. Mariela Bollati (Institute Pasteur, Montevideo) y mantenida por pasajes en DMEM (Gibco®, Invitrogen), conteniendo glutamina (4 mM), piruvato de sodio (110 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), glucosa (4.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) penicillina (100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, Applichem,

Germany), estreptomicina (100 mg.L^{-1}) y 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco®, Invitrogen™) inactivado por calor (30 min a $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Los macrófagos se incubaron a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera con 5 % de CO_2 , hasta confluencia de la monocapa, correspondiente a una población aproximada de 5×10^5 células por pocillo para placas de 24 pocillos. Para minimizar la interferencia debida a la absorbancia del rojo de fenol presente en el DMEM, en todos los experimentos, luego de obtenida la confluencia el medio fue sustituido por amortiguador fosfato salino de Dulbecco (dPBS) conteniendo CaCl_2 (0.9 mM), MgCl_2 (0.5 mM), KCl (2.7 mM), NaH_2PO_4 (1.5 mM), NaCl (137 mM), Na_2HPO_4 (8.1 mM), glucosa (5.5 mM) y *L*-arginina (1 mM).

4.4.2 ACTIVACIÓN DE NOS2 Y DETERMINACIÓN DE $\cdot\text{NO}$

Los macrófagos J774 en monocapa confluyente fueron expuestos a 400 U.mL^{-1} de interferón γ ($\text{IFN}\gamma$) y $8 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS, serotype 0127:B8), conocidos inductores de la expresión de la NOS2. Luego de 4 h, que es cuando se alcanza la producción máxima [86], el sobrenadante fue sustituido por dPBS conteniendo la sonda fluorescente 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM-DA, $5 \text{ }\mu\text{M}$) y los nitroalquenos ($10 \text{ }\mu\text{M}$). Esta sonda es capaz de permear dentro de las células para ser rápidamente transformada en DAF-FM por acción de las esterasas citosólicas, reaccionando con el $\cdot\text{NO}$ producido dentro de las mismas. Para ello, luego del agregado de la sonda y previo a la toma de las medidas, los macrófagos se incubaron durante 30 min a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera con 5 % de CO_2 . Cuando DAF-FM es oxidada por el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), molécula derivada de $\cdot\text{NO}$, se transforma en la forma triazol fluorescente ($\lambda_{\text{exc}}=485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$) [281]. El aumento de la fluorescencia en presencia y en ausencia de los compuestos se registró durante 1 h a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en lector de placas. La capacidad de los nitroalquenos para reaccionar directamente con $\cdot\text{NO}$ también se determinó mediante la oxidación de oxihemoglobina (HbO_2) a metahemoglobina (MetHb). Primero los glóbulos rojos fueron lavados 4 veces con amortiguador fosfato salino (PBS) mediante centrifugación (800 rpm, 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y se cuantificó la hemoglobina total. Los glóbulos rojos (c.f: $50 \text{ }\mu\text{M}$ Hb total), fueron agregados luego de la inducción de la NOS2 en ausencia y junto con los nitroalquenos ($50 \text{ }\mu\text{M}$). Se utilizó como control un inhibidor de la NOS2 el *N*-(3-(aminometil) bencil) acetamidina (1400W, $100 \text{ }\mu\text{M}$). Luego de 1 h de co-incubación en atmósfera de CO_2 (5 %) y $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se retiraron $500 \text{ }\mu\text{L}$ de sobrenadante conteniendo glóbulos rojos que se congelaron a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para facilitar la ruptura celular y se centrifugaron a $18000 \times g$ para bajar las membranas. Para cada muestra se registró el espectro entre 400 y 700 nm. La concentración de HbO_2 y MetHb obtenida se calculó a partir de las **Ecuaciones 4.4 y 4.5** respectivamente [282].

$$\text{HbO}_2 (\mu\text{M}) = 66 * \text{Abs}_{577\text{nm}} - 88 * \text{Abs}_{630\text{nm}} \quad \text{Ecuaci3n 4.4}$$

$$\text{MetHb} (\mu\text{M}) = 273 * \text{Abs}_{630\text{nm}} - 3 * \text{Abs}_{577\text{nm}} \quad \text{Ecuaci3n 4.5}$$

4.4.3 ENSAMBLAJE DE NADPH OXIDASA Y DETERMINACI3N DE $\text{O}_2^{\cdot-}$

Para el ensamblaje de la NOX2, los macr3fagos J774 fueron activados con 4 β -forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Calbiochem, Millipore), un estimulador soluble de la prote3na quinasa C [86] [283]. Luego de 30 min el cultivo alcanz3 la m3xima producci3n de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y la capacidad de los nitroalquenos (10 μM) para atrapar dicho radical se determin3 mediante la reducci3n de Fe^{3+} -Cyt c (50 μM) inhibible por super3xido dismutasa (SOD, E.C.1.15.1.1., 0.5 μM). Tanto los nitroalquenos como la SOD (600 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) se agregaron en dPBS y la formaci3n de Fe^{2+} -Cyt c se sigui3 espectrofotom3tricamente ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 2 min en lector de placas [20, 279].

4.4.4 REACTIVIDAD CON PEROXINITRITO Y SUS PRODUCTOS DE DESCOMPOSICI3N $\cdot\text{OH}$ Y $\cdot\text{NO}_2$

Los macr3fagos J774 fueron activados para la expresi3n de la NOS2 y el ensamblaje de NOX2 produciendo en forma simult3nea $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ para generar un flujo de ONOO- [86]. La DHR (15 μM) se oxida en presencia de los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$, al producto fluorescente rodamina ($\lambda_{\text{exc}}=485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$). Los cambios en la fluorescencia en ausencia y en presencia de nitroalquenos (10 μM) se registraron durante 120 min en un lector de placas. Se determin3 adem3s la concentraci3n inhibitoria 50 (IC_{50}), para concentraciones de nitroalquenos entre 2.5 y 10 μM .

4.4.5 REACTIVIDAD CON PER3XIDO DE HIDR3GENO

La reducci3n por un electr3n del an3n $\text{O}_2^{\cdot-}$ genera H_2O_2 . Los macr3fagos J774 en monocapa confluyente fueron activados para el ensamblaje de la NOX2 y luego de 30 min el sobrenadante (15 μL) fue retirado e incubado durante 30 min en ausencia y en presencia de nitroalquenos (50 μM). El H_2O_2 residual se cuantific3 mediante la t3cnica de FOX [284], basada en la capacidad del H_2O_2 de oxidar el Fe^{2+} a Fe^{3+} en condiciones 3cidas. En presencia de 3,3'-bis(*N,N*-di(carboximetil)-(aminometil-*O*-cresil)-sulfonaftale3na, naranja de xilenol), el Fe^{3+} forma un complejo de color violeta que se determina a 560 nm, previo desarrollo de color (30 min., T. amb.) [284]. El reactivo de FOX se prepar3 y us3 inmediatamente. Para ello se mezclaron naranja de xilenol (100 μM), sulfato ferroso am3nico ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 250 μM), H_2SO_4 (25 mM) y 4 mM de *tert*-butilhidroxitolueno (BHT) en metanol (90 % w/v). La

curva de calibración se realizó con H_2O_2 (0.5 – 20 μM), a partir de un stock previamente cuantificado por absorbancia a 240 nm ($\epsilon_{240\text{ nm}} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN MACROFAGOS J774

Para evaluar la citotoxicidad de los nitroalquenos se utilizó el marcador de actividad metabólica celular bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El ensayo se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de reducir el MTT a formazán, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán [285]. La toxicidad de los compuestos se evaluó durante el tiempo (2 h) y concentraciones ensayadas (10 y 20 μM), y a largo plazo (24 h) con un mayor intervalo de concentraciones (5 a 100 μM). Luego de transcurrido el tiempo correspondiente (2 ó 24 h), el medio de cultivo se sustituyó por una solución de MTT (0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en dPBS, y las células fueron nuevamente incubadas durante 3 h a 37 °C en atmósfera de CO_2 (5 %). Posteriormente el sobrenadante se removió y los cristales de formazán se disolvieron en una solución reveladora conteniendo DMSO y amortiguador glicina (0.1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 M glicina, pH 10.5) (90:10 v/v). La absorbancia se registró a 560 nm en lector de placas y los resultados se expresaron como porcentajes, correspondiendo el 100 % de viabilidad a la condición en ausencia de compuestos.

4.6 EFECTO DE B1 SOBRE LA COMUNICACIÓN PARÁCRINA ENTRE CONDROCITOS Y MACRÓFAGOS J774

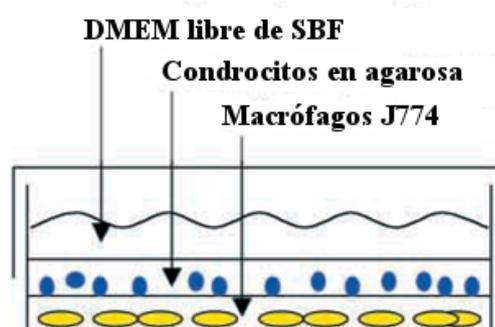
4.6.1 CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS

Los condrocitos se obtuvieron a partir de cartílago de esternón de pollo de acuerdo con el procedimiento descrito por Dreier y col. con modificaciones [286]. El cartílago se cortó en trozos pequeños y se lavó 4 veces en amortiguador Krebs (15.7 mM NaH_2PO_4 , 1.6 mM KH_2PO_4 , 111.2 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM MgCl_2 , 4 mM NaHCO_3 y glucosa (13 mM), pH 7.4) [287], complementado con penicilina (100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), estreptomina (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y anfotericina B (fungizona®, 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Gibco™, Invitrogen) para minimizar el riesgo de contaminación microbiana [286]. Luego se colocaron en DMEM sin SFB, suplementado con antibióticos, colagenasa B (1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, tipo I de *Clostridium*, C0130) y cisteína (1 mM) y se incubaron en atmósfera de CO_2 5 % a 37 °C durante 48 h para favorecer la liberación de los condrocitos. El sobrenadante conteniendo las células se centrifugó (5500 rpm, 10 min, T amb.) y el pellet se resuspendió en 10 mL de DMEM sin SFB, con cisteína (1 mM), ascorbato (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y antibióticos (medio A), y se sembró en botella de 75 cm^2 . Luego de 96 h los condrocitos se

despegaron con 0.05 % de tripsina (0.25 %, Gibco™, Invitrogen) en PBS (amortiguador fosfato de sodio 0.1 M con 0.15 M NaCl, pH 7.2) y EDTA (cf: 0.016 %), 5 min a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5 %. Luego se agregó DMEM con antibióticos y SFB para inactivar la tripsina, se centrifugó (3000 rpm, 10 min, T.amb.) y las células se resuspendieron en 10 mL de medio A. La población de células vivas se determinó por tinción con azul tripán (0.4 %), obteniéndose 2×10^5 células.mL⁻¹. Una alícuota de 200 µL conteniendo 4×10^4 condrocitos obtenidos a partir del cultivo primario se cultivaron 96 h sobre un cubreobjeto y luego se fijaron y tiñeron con hematoxilina/eosina (H/E) para su observación al microscopio.

4.6.2 CO-CULTIVO DE MACRÓFAGOS J774 Y CONDROCITOS

El co-cultivo de condrocitos con macrófagos activados permite modelar las condiciones del cartílago articular durante el proceso inflamatorio en la artritis reumatoidea. Luego de 5 días de crecimiento en botella de 75 cm², los condrocitos se despegaron con tripsina, se centrifugaron (3000 rpm 5 min, T.amb.) y se resuspendieron en DMEM con antibióticos, libre de SFB, conteniendo agarosa de bajo punto de fusión (0.5 %). Los macrófagos J774 en confluencia se activaron 4 h con INF γ (400 U.mL⁻¹) y LPS (8 µg.mL⁻¹) y luego se lavaron dos veces con PBS estéril, para quitar restos de SFB presentes en el medio de cultivo. Los condrocitos (1 x 10⁵ células/pocillo, 0.5 mL) se sembraron sobre los macrófagos y la placa de 24 pocillos se colocó a 4 °C durante 15 min para solidificar la agarosa. Luego a cada pocillo se agregó 1 mL de DMEM sin SFB, con antibióticos conteniendo o no el compuesto **B1** (20 µM) y se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5 %. (**Esquema 4.2**).



Esquema 4.2- Representación del co-cultivo entre condrocitos primarios y macrófagos J774. Extraído de Dreier y col.[286].

Luego de 24 h se extrajo el sobrenadante, las proteínas se concentraron en amortiguador Tris-HCl (1.875 M, pH 8) usando centricones Biomax 5K (Millipore, EUA). La concentración proteica se determinó por el método del ácido bicinconínico, midiendo la absorbancia a 562 nm y utilizando albúmina bovina (BSA) como estándar [288]. La curva de calibración se realizó

dentro de un rango lineal de concentraciones entre 0.2 y 1 mg.mL⁻¹ de BSA y en simultáneo con la determinación de las muestras.

4.6.3 ZIMOGRAFÍA

Las muestras se prepararon en amortiguador de carga no reductor (2 mM EDTA, 2 % SDS, 20 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol, 20 mM Tris/HCl, pH 8.0), se sembraron 10 µg de proteína total en un gel SDS-PAGE (10 %), conteniendo 0.1 % de gelatina. La electroforesis se realizó a 30 mA durante 1 h. Posteriormente el gel se lavó con Triton X-100 (2.5 %) por 30 min, se enjuagó con agua destilada y se incubó en Tris-HCl (50 mM, pH 8.6) conteniendo CaCl₂ (5 mM) durante 24 h a 37 °C. Finalmente se tiñó con Coomassie coloidal G250, para visualizar la actividad proteasa.

4.7 MODELOS BIOLÓGICOS

4.7.1 ANIMALES

Los experimentos en modelos biológicos se realizaron en el Laboratorio de Farmacología e Inmunología (LaFI), de la Universidad Federal de Alagoas (UFAL, Maceió, Brasil). Los animales se manipularon de acuerdo con las normas establecidas por la Comisión de Ética de UFAL para el manejo de animales de experimentación de acuerdo con el protocolo N° 006443/2005-78 y se obtuvieron en la Unidad de Cría del Bioterio de UFAL. Para los experimentos de nocicepción e inflamación se utilizaron ratones machos Swiss de 6 semanas de vida y un peso entre 20 y 30 g cada uno. Para el experimento de artritis inducida con adyuvante completo de Freund (ACF) se utilizaron ratas Wistar machos y hembras adultos con 6 a 8 semanas de vida y un peso entre 130 y 200 g. En todos los casos, los animales se distribuyeron en grupos de 6 individuos por condición, se pesaron e identificaron en forma individual. El agua y la comida se les proporcionó a voluntad y se mantuvieron en un ambiente a 28 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Para minimizar cambios por variabilidad circadiana y en la sensibilidad al dolor por factores rítmicos endógenos, se trabajó siempre en la misma franja horaria. La administración de las sustancias se realizó en ayuno de 6 a 8 h. En todos los casos, para la administración por vía oral (VO) se preparó una suspensión en carboximetilcelulosa (CMC) y 0.3 % (v/v) de Tween 80, mientras que para la administración vía intraperitoneal (IP) la suspensión se realizó en PBS con 0.3 % (v/v) de Tween 80.

4.7.2 MODELO DE CONTORSIONES ABDOMINALES

La inyección intraperitoneal de ácido acético (HAc) es un estímulo nociceptivo inespecífico que induce contorsiones abdominales inhibibles por sustancias analgésicas [289]. Se

ensayó el efecto analgésico de los nitroalquenos administrados por VO mediante sonda orogástrica de los compuestos, 40 min antes de la inyección IP de ácido acético (HAc, 0.1 M o 0.06 % v/v) en dosis de 30 $\mu\text{moles.kg}^{-1}$ de peso. Como control positivo en ambos casos se utilizó el analgésico metamizol sódico (dipirona, 30 $\mu\text{moles.kg}^{-1}$). Las contorsiones tanto en el grupo control como en los grupos tratados, se registraron luego de transcurridos 5 min de la inyección de HAc y durante un período de 20 min.

4.7.3 MODELO DE PERITONITIS INDUCIDA POR CARRAGENINA

La inflamación peritoneal se indujo mediante la inyección IP de carragenina de acuerdo con el método descrito por Griswold y col. [290] y se estudió el efecto antiinflamatorio de los compuestos administrados por VO. Tanto los compuestos como el fármaco de referencia indometacina (Merck), utilizado como control positivo, se administraron en dosis de 30 $\mu\text{moles.kg}^{-1}$, con una diferencia de 15 min entre grupos. Transcurridos 30 min se inyectaron en el peritoneo 250 μL de carragenina (1 %) en PBS estéril, independientemente del peso del ratón. Luego de 4 h los animales se sacrificaron. La cavidad peritoneal de cada animal se lavó con 2 mL de PBS estéril y después de aplicar masaje manual en la zona, se recogió 1 mL de fluido peritoneal con jeringa que se colocó en tubos plásticos tipo eppendorf a 4 °C.

Recuento de leucocitos: Se añadieron 10 μL de muestra homogeneizada a 190 μL de azul tripán, la solución obtenida se homogeneizó y se realizó el recuento de leucocitos (LC) en cámara de Neubauer con microscopio *Olympus*. A partir del recuento celular en 4 cuadrantes, el número de LC / mL se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\text{LC/mL} = \text{LC} \times (\text{FD} \times 1 \times 10^{+4})}{4}$$

Donde LC = leucocitos totales en cuadrantes contados; FD = factor de dilución (20 en este caso); 4 = número de cuadrantes observados; 10000 = transformación de $\text{cél}/ 0.1 \mu\text{L}$ a cél.mL^{-1} .

4.7.4 MODELO DE ARTRITIS REUMATOIDEA INDUCIDA POR ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND

El síndrome artrítico en ratas fue generado mediante una inyección sub-plantal de adyuvante completo de Freund (ACF, 0.1 mL) en la pata derecha, de acuerdo con el método propuesto por Newbould [291] con algunas modificaciones. Los animales fueron marcados, pesados y se les midió el grosor de la pata a nivel de la articulación utilizando un calibre digital (0-150 mm, caliper King.Tools, King city, CA) en los días 1, 7 y 14 previos al inicio del tratamiento. Debido a que no se contaba con el número suficiente de animales de un mismo sexo se trabajó con machos y hembras. Los grupos formados con machos fueron control positivo con el fármaco metotrexato (MTX) VO, MTX vía IP y control negativo (-ACF). De esta manera se

minimizaron los cambios que pudieran existir por efectos hormonales en el ensayo con los nitroalquenos. Además se generó un grupo control de AR sin tratamiento y un grupo control de vehiculo para la administración vía IP. A partir del día 14 posterior a la inmunización y diariamente hasta el día 21, tanto los nitroalquenos como el control MTX se administraron en dosis de $100 \mu\text{moles.kg}^{-1}$, por VO e IP. El MTX por VO e IP se aplicó en dos únicas dosis de 0.3 mg.kg^{-1} en los días 14 y 17. Durante ese período los animales se pesaron y midieron diariamente. El volumen de articulación promedio obtenido cada día se calculó y comparó con los grupos control positivo y negativo. Al final del tratamiento los animales se anestesiaron con 2 mg.kg^{-1} de clorhidrato de ketamina (50 mg.mL^{-1}) para extraer muestras de sangre de la vena del seno retro-orbital. Para cada condición se analizó el suero de 3 animales para funcionalidad hepática y renal mediante dosificación de las enzimas glutámico-pirúvica (TGP), glutámico-oxalacética (TGO), creatinina y urea, además de proteína C reactiva (PCR) utilizando kits comerciales (Doles™ reagents, Brasil). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

4.8 NITROALQUENOS COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE COX 1 Y COX 2

El estudio de los nitroalquenos como inhibidores de las isoformas ciclooxigenasa 1 (COX 1) y ciclooxigenasa 2 (COX 2) se realizó utilizando un kit comercial (N° 560131, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Las ciclooxigenasas provistas por el kit fueron COX-1 ovina y COX-2 recombinante humana. Brevemente la reacción se realizó en ausencia y en presencia de 10 y $30 \mu\text{M}$ de los compuestos **B1**, **B2**, **G1** y **G2**, para ambas enzimas. La reacción comenzó con el agregado de ácido araquidónico como sustrato y luego de 2 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, se detuvo con HCl (1M). Luego se agregó una solución saturada de cloruro de estaño en HCl para reducir el producto de la reacción protaglandina H_2 (PGH_2) a un derivado más estable, $\text{PGF}_{2\alpha}$. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ producida se cuantificó mediante un ensayo ELISA de competencia con PG conjugada a acetilcolinesterasa (PG-ACh) por la unión al anticuerpo anti-PG. La placa se reveló con ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB o reactivo de Ellman) en presencia de acetilcolina y se determinó la absorbancia a 412 nm.

4.9 ESTUDIOS EN PACIENTES PORTADORES DE ARTRITIS REUMATOIDEA

4.9.1 RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los pacientes que asistieron a la policlínica del Instituto Nacional de Reumatología (INRU) entre enero de 2008 y mayo de 2010, cursando AR fueron invitados a participar previa

firma del correspondiente consentimiento informado. El estudio estuvo sujeto a las normas internacionales (Declaración de Helsinki) y su diseño fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas, (Facultad de Medicina, Universidad de la República). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa sobre tubos con acelerador (FL Medical, Italy) para obtener suero y tubos con anticoagulante EDTA para eritrosedimentación y hemograma. A los 30 min, las muestras fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. durante 5 min. El suero se alicuotó y congeló a -20 °C por un plazo de hasta 7 días. Las muestras con EDTA fueron procesadas dentro de los 30 min inmediatos a la extracción de sangre.

4.9.2 ESTUDIOS PARACLÍNICOS

Los estudios paraclínicos que incluyeron determinación de factor reumatoideo (FR) por inmunoturbidimetría (Turbitest Wiener, en equipo BT 3000), velocidad de eritrosedimentación (VES) en equipo microcapilar ALIFAX, hemograma (equipo Beckman Coulter) y PCR por inmunoturbidimetría (Turbitest Wiener, en equipo BT 3000) se realizaron en el Laboratorio Clínico del INRU por el personal a cargo.

4.9.3 EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

La evaluación clínica se realizó por especialistas en reumatología utilizando como índice de la actividad de la enfermedad el DAS28 [292]. Este índice combina información relacionada con el número de articulaciones dolorosas (NAD28) y tumefactas (NAT28) [293, 294] junto con una medida del estado de salud general del paciente (EGP) y la VES (**Ecuación 4.6**)

$$\text{DAS28} = 0.56\sqrt{\text{NAT28} + 0.70(\ln\text{VES}) + 0.014(\text{EGP})} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

$$\text{DAS28} = 0.56*\sqrt{\text{NAD}} + 0.28*\sqrt{\text{NAT}} + 0.70(\ln\text{VES}) + 0.014\text{EGP}$$

Además se empleó el índice de actividad de la enfermedad simplificado y el índice de actividad clínica de la enfermedad (SDAI y CDAI, por sus siglas en inglés), que incluyen la valoración de las mismas 28 articulaciones. El SDAI adiciona la concentración de proteína C reactiva en sangre como marcador de inflamación [295], mientras que el CDAI no incluye ningún valor de laboratorio clínico. Estos índices se calcularon mediante la suma del número de articulaciones dolorosas (NAD28) y tumefactas (NAT28), valoración de la enfermedad por paciente (EGP) y médico (EGM) (medidos de 0 a 10) y la concentración de PCR, en el caso del SDAI, como se muestra en la **Ecuación 4.7**.

$$\text{SDAI} = \text{NAD28} + \text{NAT28} + \text{EGP} + \text{EGM} + \text{PCR} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

4.9.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN SUERO

La capacidad antioxidante en suero se determinó mediante la técnica FRAP (del inglés Ferric Reducing Antioxidant Power assay), que se basa en la capacidad de la muestra de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , en medio ácido y en presencia de 2,4,6-tripiridiltriazina (TPTZ), formando un complejo azul que absorbe a 593 nm [296]. El reactivo FRAP está formado por una mezcla de relación 10:1:1 de amortiguador acetato (HAc/NaAc, 300 mM, pH 3.6), cloruro férrico (20 mM) y TPTZ (10 mM) preparada en HCl 40 mM. Para la curva de calibración se utilizó Trolox (2 mM preparado en NaOH 50 mM) como antioxidante de referencia en rangos de concentración entre 0.1-2 mM. Los puntos de la curva de calibración y las muestras de suero (diluidas 1/10 en agua destilada) se sembraron por triplicado en una misma placa de 96 pocillos. Luego de 4 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 593 nm en lector de placas.

4.9.5 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-NITROTIROSINA EN SUERO

4.9.5.1 ELISA de competencia

La detección de anticuerpos anti-nitrotirosina (anti- $\text{NO}_2\text{-Y}$) en el suero de pacientes portadores de AR, se realizó mediante ELISA de competencia utilizando el antígeno nitrotirosina ($\text{NO}_2\text{-Y}$) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), preparado como se indica más adelante. Se sembraron 2 placas de ELISA (Maxisorp™ Nunc-Immuno MicroWell, Thermo Scientific) con idéntico diseño, con 50 μL de diluciones seriadas o una única dilución (1/6) de cada suero ($\sim 10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), asumiendo una concentración proteica en plasma de $60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. En las placas se sembraron además 11 diluciones seriadas, a partir de una concentración inicial de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina de conejo. Dicho anticuerpo se produjo de acuerdo con Brito *et al.* [297] y fue provisto gentilmente por la Dra. Mercedes Naviliat (CEINBIO-Facultad de Medicina). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y se lavaron con amortiguador Tris salino (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2) con 0.05 % Tween-20 (TBS-T). Luego se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA, 3 %) e incubaron 2 h a 37°C . En una de las placas, se agregó a cada pocillo $\text{NO}_2\text{-Y}$ conjugada a HRP (1/2000, $\sim 0.18 \mu\text{M}$), preparada como se indica más adelante. La segunda placa se incubó con $\text{NO}_2\text{-Y}$ conjugada a HRP en presencia de competidor $\text{NO}_2\text{-Y}$ (2.5 mM) como control de especificidad del anticuerpo. Luego de tres lavados con TBS-T, se añadieron los sustratos H_2O_2 (0.01 %) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en acetato de sodio 0.1M, pH 6) (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., IL), que en presencia de HRP es oxidada a un producto de color azul. La reacción enzimática se detuvo con H_2SO_4 (2N) transformando el producto azul en amarillo cuya absorbancia se midió a 450 nm en lector de placas. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la

absorbancia del producto de la reacción [298]. Las absorbancias obtenidas se graficaron en función del logaritmo de la concentración de anticuerpo generando una curva de calibración de tipo sigmoide, que se ajustó a la función logística, a partir de la cual se determinó el título de anticuerpo en las muestras de suero. Las placas en presencia y ausencia de competidor fueron reveladas de la misma forma.

Conjugación de HRP a NO₂Y.

La conjugación de NO₂-Y a HRP se realizó en un procedimiento de un paso de acuerdo con [299]. Para ello se mezcló e incubó 1 h a temperatura ambiente 4 μ L de benzoquinona (10 mg.mL⁻¹ en etanol) con 40 μ L de NO₂-Y (1 mg.mL⁻¹ en amortiguador fosfato, pH 4.5, 75 mM). Luego se agregaron 200 μ L de HRP (20 mg.mL⁻¹ en Na₂B₄O₇·10H₂O, 50 mM, pH 9) se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se dializó tres veces contra PBS.

4.9.5.2 ELISA de captura con Keyhole Limpet (KLH) nitrada

La KLH es una proteína aislada de la hemolinfa del molusco *Megathura crenulata* y pertenece a una familia de proteínas respiratorias llamadas hemocianinas que se encuentran en moluscos y artrópodos. Debido a su alto peso molecular (400-3000 kDa) la KLH es un importante inmunógeno por lo que frecuentemente es utilizado como transportador de haptenos y además, para nuestro interés, es rico en tirosinas. La KLH se solubilizó en amortiguador fosfato (100 mM, pH 7.4, con 25 mM NaHCO₃) y su concentración se determinó por el método del ácido bicinconínico. La proteína se nitró por agregado de 4 bolos de peroxinitrito (500 μ M) y la magnitud de la nitración se determinó por absorbancia de la NO₂-Y a 425 nm y pH=7.5 (ϵ_{425} =3150 M⁻¹cm⁻¹). Una vez nitrada la proteína, la placa de ELISA se sensibilizó sembrando 100 μ L de una solución de 10 μ g/mL de KLH por pocillo. Se sembró una mitad de la placa con KLH nitrada y la otra mitad con KLH no nitrada como control negativo). La placa se incubó toda la noche a 4 °C y al día siguiente se lavó con PBS-0.05 % T. Luego se bloqueó 2 h con BSA 3 % en PBS-T y se incubó durante 1 h con las muestras de suero diluidas 1/10. Posteriormente la placa se incubó 1 h a 37 °C con anticuerpo anti-IgG conjugado a HRP (Sigma, St. Louis, MO). En forma análoga al ELISA de competencia, la placa se reveló con H₂O₂ (0.01 %) y TMB (0.4 g.L⁻¹), la reacción se detuvo a los 15 min con H₂SO₄ (2N) y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación estadística se realizó empleando OriginPro 8 SRO (OriginLabCorporation, Northampton, MA, EUA). Los datos experimentales fueron expresados como la media \pm la desviación estándar de por lo menos tres experimentos representativos. Las diferencias entre

condiciones y controles fueron analizadas utilizando test ANOVA de una vía o test T de Student no paramétrico. Las diferencias se consideraron significativas para un valor $p < 0.05$ entre los distintos grupos. El análisis estadístico de los datos en los modelos animales se realizó mediante el test de T de Mann Whitney en el programa Prisma 5 GraphPad.

Para la evaluación estadística de los parámetros clínicos de pacientes se utilizó OriginPro 8 SRO (OriginLabCorporation, Northampton, MA, EUA). El test de Shapiro-Wilk se utilizó para evaluar la normalidad de las variables. Los datos paramétricos se expresaron como medias \pm el desvío estándar (SD), y los datos no paramétricos como medianas y rango (mínimo-máximo), o rango intercuartiles (IQR). Los valores se compararon mediante el test para variables no paramétricas de Kruskal-Wallis, considerándose que existían diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Los estudios de correlación se realizaron calculando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman, considerando correlaciones buenas cuando $r \geq 0,5$ y $p < 0.01$.

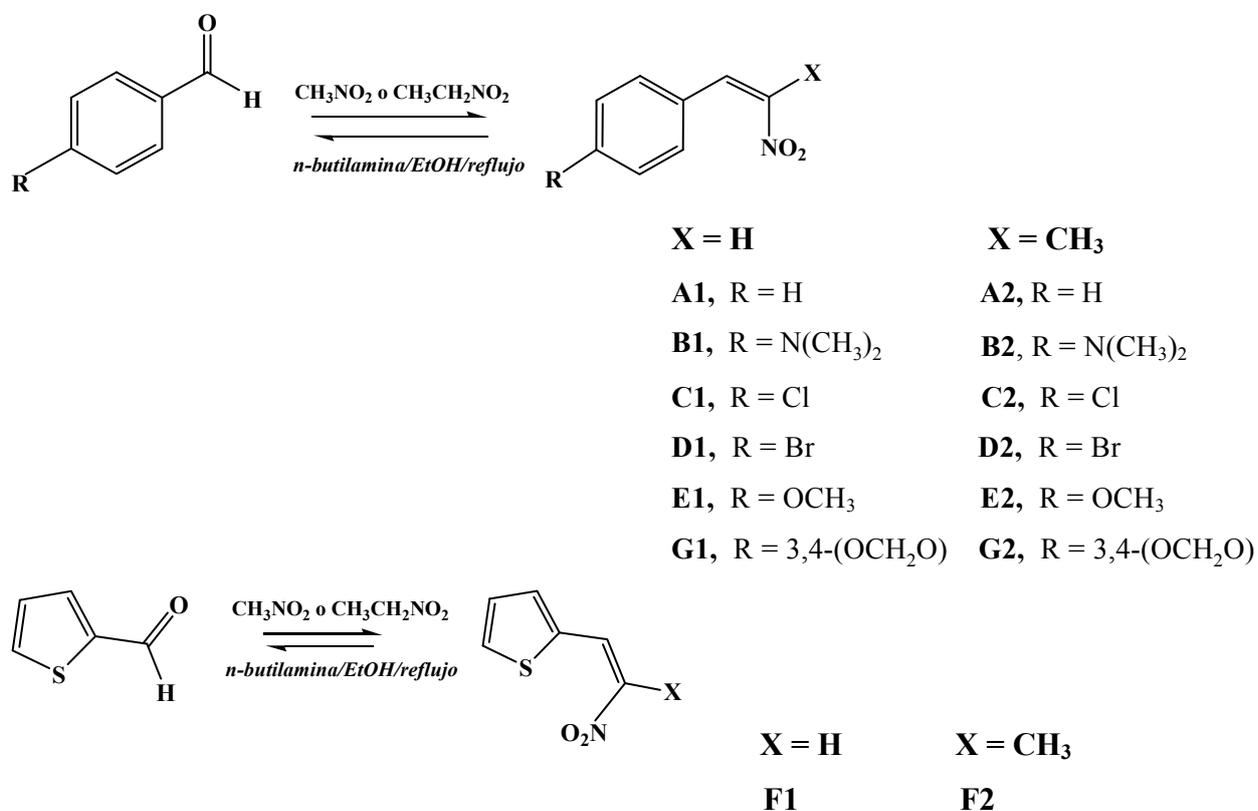
4.11 MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

A menos que se especifique, los reactivos utilizados fueron de la compañía Sigma, Aldrich, MO, USA y se utilizaron en grado puro para análisis.

- Espectrofómetro Varian Cary 50.
- Lector de placas Varioskan Flash (Thermo Electron Corp., Finlandia) para fluorescencia y espectrofotometría.
- Estufa de cultivo celular Smartcell, Heal Force.
- Centrífuga Sigma modelo 3K, 18 refrigerada.
- Microscopio invertido Nikon, modelo XDS-1B.

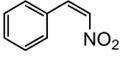
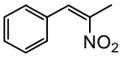
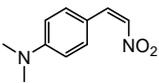
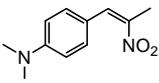
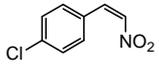
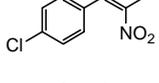
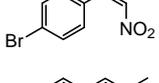
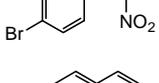
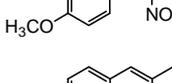
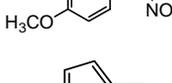
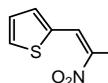
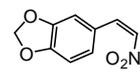
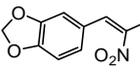
5.1 DISEÑO Y SÍNTESIS DE NITROALQUENOS

La búsqueda de nuevos fármacos tiene como objetivo lograr una síntesis sencilla, de bajo costo y buenos rendimientos para obtener un producto accesible a nivel de la población. Para el diseño de las estructuras a sintetizar en este trabajo se utilizó el criterio de accesibilidad química para lo cual se proyectaron nitroalquenos derivados de benzaldehídos sustituidos con grupos con variedad de propiedades estereo-electrónicas como metoxilo, dimetilamino y halógenos, y un bioisótero de benzaldehído, el tiofencarbaldehído, disponibles todos en forma comercial. Asimismo se varió la cadena lateral nitroalquénica obteniéndose dos series de compuestos: la serie 1 conteniendo un grupo 2-nitroetenilo y la serie 2 conteniendo un grupo 2-nitropropenilo. Para la síntesis se utilizaron procedimientos convencionales ya descritos en el punto 4.1 y puestos a punto por el grupo de Química Medicinal (Facultad de Ciencias) [300]. Se sintetizaron 12 nitroalquenos aromáticos a partir del (Z)-1-(2-nitroprop-1-enil) benceno (**A1-E1**, **A2-E2**, **G1** y **G2**) y 2 a partir del 2-tiofeno carbaldehído (**F1** y **F2**) que se muestran en la **Tabla 5.1**. En el **Esquema 5.1** se muestra el proceso sintético utilizado para la obtención de los 14 nitroalquenos.



Esquema 5.1- Ruta de síntesis empleada para la obtención de los 14 compuestos

Tabla 5.1. Características estructurales y espectroscópicas de los nitroalquenos estudiados

Estructura química	Nombre		λ máx	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹) ^a
	Trivial	IUPAC		
	A1	(Z)-1-(2-nitroetenil)benzeno	sin máximo	NA
	A2	(Z)-1-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	316	27.7
	B1	(Z)-N,N-dimetil-4-(2-nitroetenil)anilina	362 461	3.9 4.9
	B2	(Z)-N,N-dimetil-4-(2-nitroprop-1-enil)anilina	365 (h) ^b 446	2.0 3.1
	C1	(Z)-1-cloro-4-(2-nitroetenil)benzeno	sin máximo	NA
	C2	(Z)-1-cloro-4-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	320	6.0
	D1	(Z)-1-bromo-4-(2-nitroetenil)benzeno	sin máximo	NA
	D2	(Z)-1-bromo-4-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	324	21.4
	E1	(Z)-1-metoxi-4-(2-nitroetenil)benzeno	359	3.9
	E2	(Z)-1-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)benzeno	347	ND
	F1	(Z)-2-(2-nitroetenil)tiofeno	356 (h)	1.1
	F2	(Z)-2-(2-nitroprop-1-enil)tiofeno	363	10.5
	G1	(Z)-5-(2-nitroetenil)benzo[d][1,3]dioxol	375 291	3.2 3.4
	G2	(Z)-5-(2-nitroprop-1-enil)benzo[d][1,3]dioxol	366	9.5

^a El coeficiente de absortividad se estimó a partir de triplicados de espectros para tres concentraciones de nitroalquenos (50, 100 y 200 μ M).

^b (h), hombro

NA- No aplicable

ND – No determinado

5.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTRAL DE LOS COMPUESTOS

Con el propósito de conocer los máximos de absorción de los compuestos y estimar su coeficiente de absorptividad, se realizaron espectros para las concentraciones 50, 100 y 200 μM en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0,1 mM DTPA) y los resultados se muestran en la **Tabla 5.1**. La mayoría de los compuestos mostró un máximo de absorbancia en el UV, con la excepción de **A1**, **D1** y **C1** pertenecientes a la serie 1, que no presentaron ningún máximo. Por su parte los compuestos **B1** y **B2**, que poseen como grupo sustituyente de anillo *N,N*-dimetilamino mostraron un segundo máximo en el visible (461 y 446 nm respectivamente).

5.2.1 NITROALQUENOS COMO ATRAPADORES DE RADICALES PEROXILO

Los 14 nitroalquenos sintetizados se estudiaron como atrapadores de radicales ROO^{\bullet} mediante la técnica ORAC. Esta técnica permite conocer la capacidad de los compuestos para ceder el protón lábil presente en su estructura, siendo un mecanismo basado en la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) [301]. Es ampliamente utilizada en muestras biológicas, tanto en alimentos como en fluidos corporales y evalúa la capacidad de una muestra de reaccionar con radicales ROO^{\bullet} generados por la descomposición térmica del azocompuesto ABAP utilizando FL como sonda fluorescente [302, 303].

La **Figura 5.1** muestra una curva de calibración típica con la molécula de referencia Trolox y en la **Figura 5.2** se muestran como ejemplo curvas típicas de fluorescencia obtenidas para el compuesto **B2**.

La **Tabla 5.2** resume los valores ORAC para los 14 nitroalquenos a partir del cálculo de área bajo la curva (ABC) obtenido para las concentraciones ensayadas. El valor ORAC de los derivados **B1** y **B2** (4.21 ± 0.08 y 5.4 ± 0.1 Eq. Trolox/ μmol , respectivamente), fue mayor al de la molécula de referencia Trolox (1.00 ± 0.02 Eq. Trolox/ μmol), mientras que **G1** y **G2** mostraron una eficacia similar a Trolox (0.72 ± 0.01 y 1.6 ± 0.2 Eq. Trolox/ μmol , respectivamente). Para el resto de los compuestos se obtuvieron valores menores a 0.55 Eq. Trolox/ μmol .

El hecho de que los derivados **B1** y **B2** con grupo electrón dador *N,N*-dimetilamino y en menor medida el grupo dioxol presente en **G1** y **G2** muestren una mejor respuesta podría deberse a la mayor estabilización de cargas que posee este tipo de grupos [304]. Los valores menores obtenidos fueron para los compuestos sin sustituyentes en *para* (**A1** y **A2**). En la mayoría de los casos, el valor ORAC se incrementó por la presencia del correspondiente grupo metilo en el $\text{C}\beta$ alifático, cuya presencia aporta estabilidad extra al radical formado.

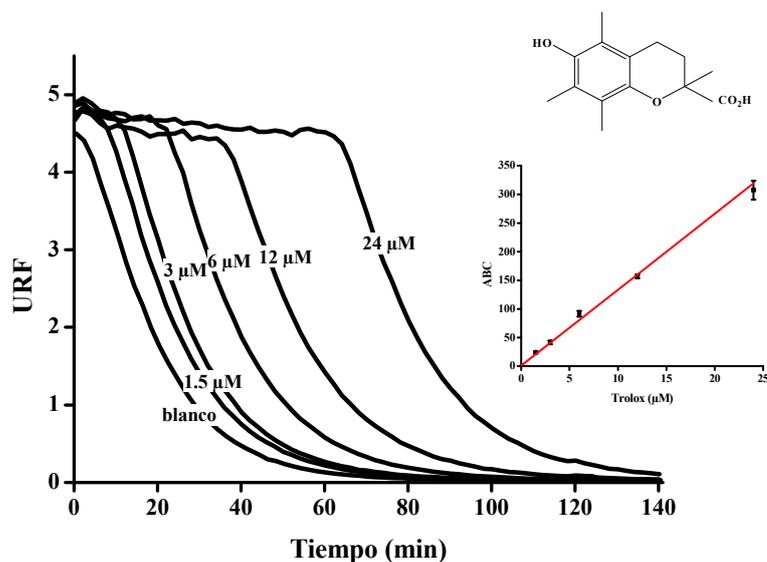


Figura 5.1. Curva de calibración con Trolox. El decaimiento de FL (7.5 nM) frente a ABAP (30 μM), en ausencia (blanco) y en presencia del agente antioxidante de referencia Trolox (1.5 a 24 μM), se siguió por fluorescencia (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 512 nm) a 37 °C en un lector de placas. **Inserto:** Gráfico de área bajo la curva (ABC) en función de la concentración de Trolox ($y = 1.0968 + 13.2465x$, $r^2 = 0.9998$).

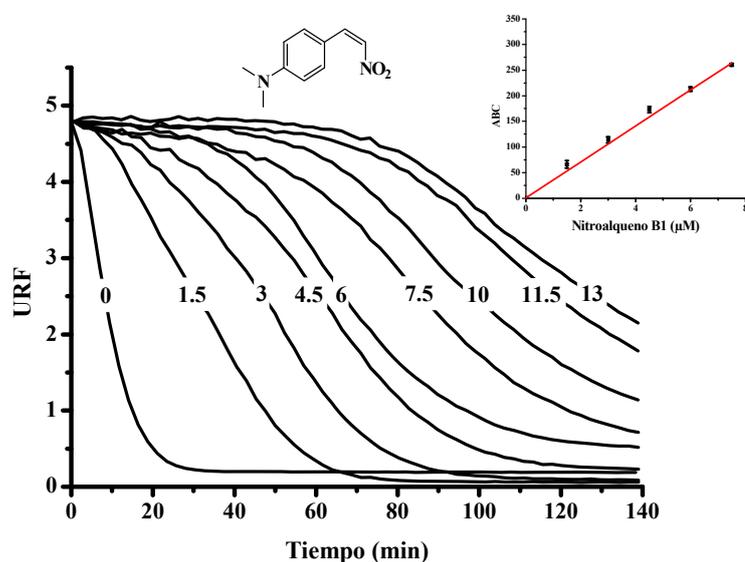


Figura 5.2. Determinación del valor ORAC para B1. La oxidación de FL (7.5 nM) por ABAP (30 μM), en ausencia y presencia del compuesto B1 (1.5 a 13 μM) se siguió por fluorescencia (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 512 nm) a 37 °C en un lector de placas. El valor ORAC se calculó considerando sólo el ABC de las curvas cuyos valores de fluorescencia se aproximaron a 0 luego de 140 minutos. **Inserto.** Gráfico de área bajo curva (ABC) en función de la concentración de B1 ($y = 0.4641 + 35.1354x$, $r^2 = 0.9985$).

Tabla 5.2. Valor ORAC de los nitroalquenos sintetizados

Compuesto	Valor ORAC (Eq. Trolox, μmol^{-1}) ^{a,b}
A1	0.29 ± 0.01
A2	0.37 ± 0.06
B1	4.21 ± 0.08
B2	5.40 ± 0.10
C1	0.44 ± 0.01
C2	0.39 ± 0.02
D1	0.44 ± 0.04
D2	0.45 ± 0.06
E1	0.46 ± 0.03
E2	0.46 ± 0.02
F1	0.43 ± 0.07
F2	0.54 ± 0.01
G1	0.72 ± 0.01
G2	1.60 ± 0.20

^a Los datos se expresan en equivalente de Trolox/ mol^{-1} de compuesto y son el promedio de tres experimentos \pm DE, siendo el valor ORAC para Trolox igual a 1.

^b Los nitroalquenos se ensayaron en un rango de concentraciones entre 1.5 y 13 μM .

5.3 ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CON PEROXINITRITO

Debido a que el peroxinitrito es un oxidante biológico muy importante que puede reaccionar tanto en su forma aniónica (ONOO^-) como protonada (ONOOH , $\text{pka} = 6.8$) en forma directa mediante la oxidación de biomoléculas por uno o dos electrones [46], se estudió su reactividad con los nitroalquenos.

5.3.1 EFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS NITROALQUENOS

Para estudiar el efecto del peroxinitrito sobre la estructura química de los nitroalquenos se analizaron sus características espectrales. Para ello los nitroalquenos (200 μM) fueron tratados con diferentes concentraciones de peroxinitrito (50 a 200 μM).

La exposición a peroxinitrito modificó el espectro de la mayoría de los compuestos, disminuyendo la absorbancia de sus máximos para **B1**, **F1**, **G1**, **G2**, **C2** y **D2**, y aumentándola para **A2**, **B2**, **F2** y **E1**. La **Figura 5.3** muestra como ejemplo el espectro obtenido para el compuesto **G2**. Empleando los coeficientes de absorptividad molar determinados previamente (**Tabla 5.1**) se calculó la estequiometría de la reacción. Algunos compuestos mostraron una gran capacidad para atrapar al oxidante, siendo **F1** capaz de atrapar el 100 %, mientras que **B1** y **B2** atraparon el 50 % y el 10 % del peroxinitrito adicionado, respectivamente. Por su parte **G2** atrapó el 20 % del oxidante (**Tabla 5.3**). El elevado valor obtenido para la relación entre moles de peroxinitrito agregado y moles de NA consumido, en particular para **F1** y **B1** permite suponer una reactividad directa con el oxidante para alguna de estas moléculas, por lo que se determinaron las constantes de reacción.

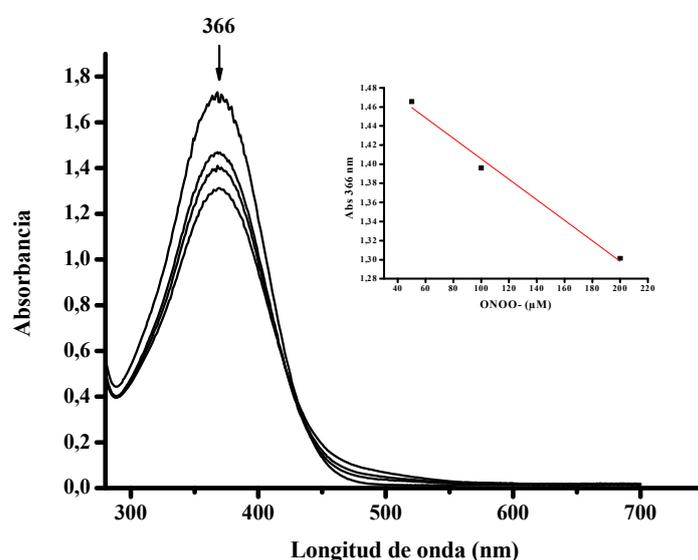


Figura 5.3. Espectro de G2 modificado por exposición a peroxinitrito. Los nitroalquenos (200 μM) se expusieron a peroxinitrito agregado en bolos consecutivos de 50 μM (c.f), bajo agitación continua y termostatación previa de la muestra a 37 °C, en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, DTPA 0.1 mM). Los espectros se registraron entre 280 y 700 nm luego del agregado de 0, 50, 100 y 200 μM de ONOO⁻. **Inserto:** Se muestra el cambio proporcional en la absorbancia del máximo por el agregado de peroxinitrito. Los valores obtenidos para **G2** a 366 nm fueron $y = -0.00107x + 1.513$, $r^2=0.979$

5.3.2 ESTUDIO CINÉTICO DE LA REACCIÓN ENTRE NITROALQUENOS Y PEROXINITRITO

5.3.2.1 Determinación de la constante de velocidad de la reacción directa

Las modificaciones observadas en los distintos espectros UV-Vis por exposición al peroxinitrito sugieren una reacción entre ambas moléculas. Debido a que la vida media del peroxinitrito a pH fisiológico es menor a 1 s, su velocidad de reacción con cualquier blanco se

debe determinar mediante técnicas de cinética rápida como la espectrofotometría de flujo detenido en este caso.

Tabla 5.3. Reactividad de los nitroalquenos con peroxinitrito

Nitroalquenos	Reactividad ^a (mol/mol de ONOO ⁻)	Constante de velocidad ($\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^{b,c}	
		Velocidad inicial ^b	Competencia ^c
A1	ND*	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.6
A2	0.06	3.2 ± 0.2	2.4 ± 0.8
B1	0.5	ND**	6.2 ± 0.3
B2	0.1	4.6 ± 0.3	5.2 ± 0.9
C1	ND*	6.6 ± 0.2	4.5 ± 0.9
C2	0.015	ND**	2.5 ± 0.3
D1	ND*	ND**	5.9 ± 1.0
D2	0.004	ND**	5.4 ± 0.5
E1	0.1	ND**	5.6 ± 0.7
E2	ND	ND	4.5 ± 0.9
F1	1.04	5.3 ± 0.6	4.9 ± 0.3
F2	0.02	1.0 ± 0.1	2.6 ± 0.5
G1	0.03	1.7 ± 0.8	2.4 ± 0.6
G2	0.2	ND**	5.4 ± 0.9

^aLa reactividad se determinó a partir de las modificaciones espectrales empleando las absorbancias máximas de las moléculas y los coeficientes de absortividad molar determinados en la Tabla 5.1, y se expresan como moles de NA consumido/mol de peroxinitrito adicionado.

^bDeterminada por método directo mediante espectrofotometría de flujo detenido a 302 nm.

^cDeterminada por método indirecto de competencia con Fe²⁺-Cyt c. Los nitroalquenos (360 µM) fueron expuestos a peroxinitrito (100 µM) en presencia de Fe²⁺-Cyt c (360 µM), en amortiguador fosfato (0.1M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 °C.

Los datos son el promedio de 3 experimentos ± DE

ND no determinado por ausencia de variaciones en el espectro.

ND* no determinado por falta de un máximo definido

ND** no determinado por interferencia en el cambio de absorbancia del peroxinitrito generado por cambios a nivel del nitroalquenos.

Primero se determinó la constante cinética de descomposición para el peroxinitrito en ausencia de molécula blanco en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M con DTPA, 0.1 mM) y su cinética se registró a 302 nm y 37 °C, sabiendo que se descompone siguiendo una función exponencial con el tiempo (**Figura 5.4**) [305]. El valor determinado experimentalmente fue $1.02 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$, del orden del reportado en la bibliografía (0.9 s^{-1} , [47]).

En este caso las concentraciones de peroxinitrito (200 µM) y nitroalquenos (20-100 µM) estuvieron en el mismo orden, por lo que correspondería un análisis cinético por el método de velocidades iniciales, considerando la porción lineal del registro donde el peroxinitrito se descompone hasta un 10 %. Sin embargo, debido a que el software utilizado no brindaba el suficiente número de datos para este tipo de ajuste y en los casos en que los ajustes

exponenciales son buenos, el método integral puede utilizarse indistintamente al de las velocidades iniciales [306].

Las curvas obtenidas mostraron un buen ajuste a una caída exponencial (método integral), por lo que la k_{obs} para cada concentración de compuesto se obtuvo a partir de los mismos (Figura 5.5 A y B).

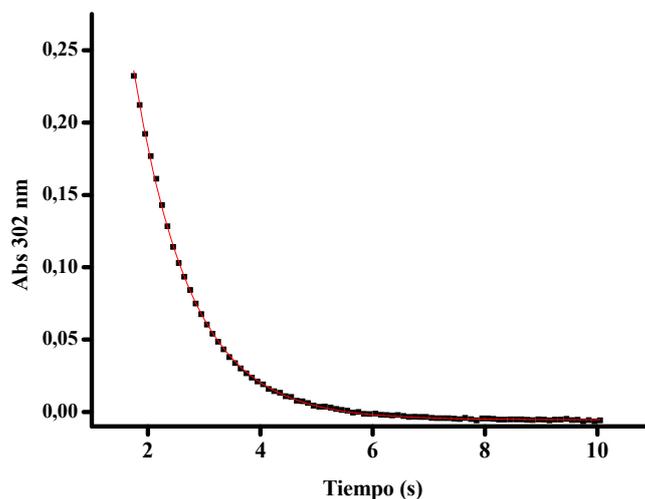
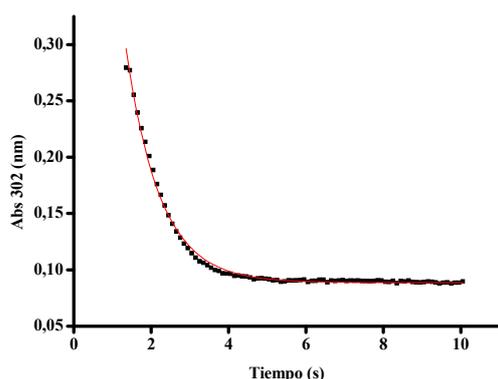


Figura 5.4. Descomposición de peroxinitrito en ausencia de molécula blanco. El peroxinitrito (200 μM) en NaOH (0.5 mM) se mezcló con amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM) y la cinética se siguió a 302 nm y 37 °C. Se muestra un registro típico y su ajuste a una función de caída exponencial simple: $y = A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + y_0$. Los valores en este caso fueron $r^2 = 0,9997$, $y_0 = -0,00542$, $A_1 = 1,37272$, $t_1 = 1,00648$

A



B

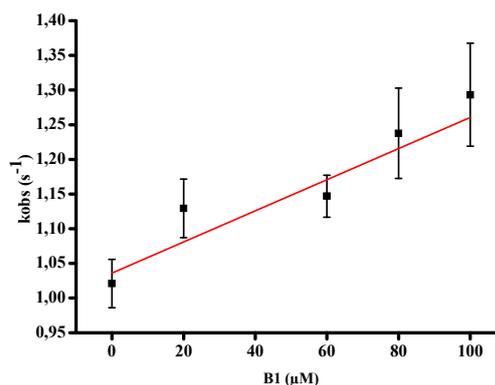


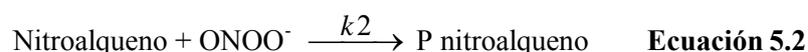
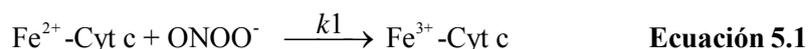
Figura 5.5. Determinación de k_{obs} . **A. Registro cinético de la descomposición de peroxinitrito.** El peroxinitrito (200 μM) se mezcló con diferentes concentraciones de nitroalquenos (20 a 100 μM) en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM) y su cinética de descomposición se registró a 302 nm y 37 °C. Se muestra un registro cinético típico en presencia de **B1** (20 μM) y su ajuste a una función de caída exponencial simple: $y = A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + y_0$, ($r^2 = 0,99534$, $y_0 = 0,08864$, $A_1 = 0,96231$, $t_1 = 0,88057$). **B. Determinación de la constante cinética para la reacción entre nitroalquenos y ONOO^- por el método integral.** Para la determinación de k_{obs} se consideraron 10 ajustes exponenciales para cada concentración de compuesto. Se muestra como ejemplo el nitroalquenos **B1**.

En la **Tabla 5.3** se muestran las constantes cinéticas con peroxinitrito obtenidas para cada nitroalqueno de modo análogo a lo mostrado para **B1** en la **Figura 5.5 B**.

Los compuestos **B1**, **C2**, **D1** y **D2**, **E1** y **E2**, y **G2** mostraron interferencias en el registro mediante esta técnica y por lo tanto no se pudo considerar para la totalidad de los compuestos. Es por eso que se procedió a realizar estudios de competencia para obtener los datos cinéticos para la totalidad de las moléculas.

5.3.2.2 *Determinación indirecta de la velocidad de reacción por competencia con citocromo c reducido*

El Fe^{2+} -Cyt c es capaz de oxidarse a Fe^{3+} -Cyt c en presencia de peroxinitrito [277] con una $k = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) [305] y la magnitud de esta oxidación puede ser determinada por la desaparición del pico a 550 nm característico del Fe^{2+} -Cyt c. Conociendo esta reactividad, la competencia entre cada nitroalqueno y el Fe^{2+} -Cyt c por el peroxinitrito permite una aproximación al valor de la constante cinética de segundo orden entre el nitroalqueno y el peroxinitrito [307]. Las reacciones que participan se muestran a continuación.



Dado que la relación de concentraciones de producto generado por ambas reacciones es proporcional a la relación entre las constantes cinéticas, se puede determinar la constante cinética deseada. En el diseño de un experimento de competencia se debe considerar que el producto de la constante cinética por la concentración de cada una de las moléculas participantes sea 10 veces superior a la constante de descomposición de peroxinitrito en ausencia de moléculas blanco (0.9 s^{-1}). Debido a problemas relacionados a la solubilidad de los compuestos a altas concentraciones no se trabajó en condiciones de pseudo-primer orden por lo tanto para el cálculo de la constante cinética se utilizó la siguiente relación [307]:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\ln \frac{[\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt c}]_0}{[\text{Fe}^{2+}\text{-Cyt c}]_0 - [\text{Fe}^{3+}\text{-Cyt c}]_\infty}}{\ln \frac{[\text{Nitroalqueno}]_0}{[\text{Nitroalqueno}]_0 - [\text{P nitroalqueno}]_\infty}} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

Donde la concentración de $\text{P}_{\text{nitroalqueno}}$ se calculó como la diferencia entre la concentración de Fe^{3+} -Cyt c luego de la exposición a peroxinitrito en ausencia y en presencia de nitroalquenos. Los valores obtenidos fueron de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (**Tabla 5.3**), un orden de magnitud menor al reportado para la reacción entre peroxinitrito y Fe^{2+} -Cyt c.

Las constantes cinéticas con peroxinitrito a pH 7.4 y 37 °C que pudieron ser efectivamente determinadas por ambos métodos fueron del mismo orden de magnitud ($\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), similares al de la reacción entre peroxinitrito y glutatión ($k = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [15] y menores a la reacción entre peroxinitrito y oxihemoglobina ($k = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [49]).

En base a los valores obtenidos por el método de competencia, se observa que los sustituyentes en la posición *para* incrementaron en diferente magnitud la reactividad de los compuestos con el peroxinitrito. El derivado **B1** reaccionó 2.5 veces más rápido que el derivado no sustituido **A1** y las constantes cinéticas obtenidas para los derivados metilados en el C β , excepto en el caso de **G2**, fueron iguales o menores a las de los respectivos derivados no metilados. Esto indica que la ausencia del metilo le confiere a la mayoría de los compuestos una reactividad aumentada para reaccionar con el peroxinitrito.

El grupo electrón-dador *N,N*-dimetilamino presente en **B1** y **B2**, y el bioisómero del fenilo **F1** mostraron los mayores valores de constante cinética determinada por el método de competencia para su reacción directa con el anión (6.2 , 5.2 y $4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente),

5.3.2.3 *Captura de radicales libres derivados de peroxinitrito in vitro*

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran que todos los nitroalquenos son capaces de reaccionar en forma directa con el peroxinitrito, pero éstos también podrían interactuar en forma indirecta con los radicales de su descomposición homolítica, $\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$. La dihidrorodamina (DHR) es oxidada por estos radicales formando rodamina, un derivado cromógeno y fluorescente [308]. En este caso la oxidación se siguió espectrofotométricamente a 500 nm. La concentración de rodamina en presencia de peroxinitrito ($50 \mu\text{M}$) y en ausencia de nitroalquenos fue de $23.5 \mu\text{M}$.

La mayoría de los nitroalquenos con excepción del (*Z*)-1-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil) benceno (**E2**), fueron capaces de proteger de la oxidación a la DHR con eficacia variada (**Figura 5.6**). Al igual que lo observado para la reactividad directa, los derivados etenilos (serie 1) mostraron una protección igual o mayor que sus derivados propenilos (serie 2), siendo los nitroalquenos **B1**, **B2** y **F1** los más efectivos con valores de protección por encima del 50 % (58, 59 y 52 %, respectivamente). Los siguen los derivados de la serie 1, el dioxol **G1** (44 %), el bromo **D1** (44 %) y el cloro **C1** (42 %) con valores superiores a 40 %..

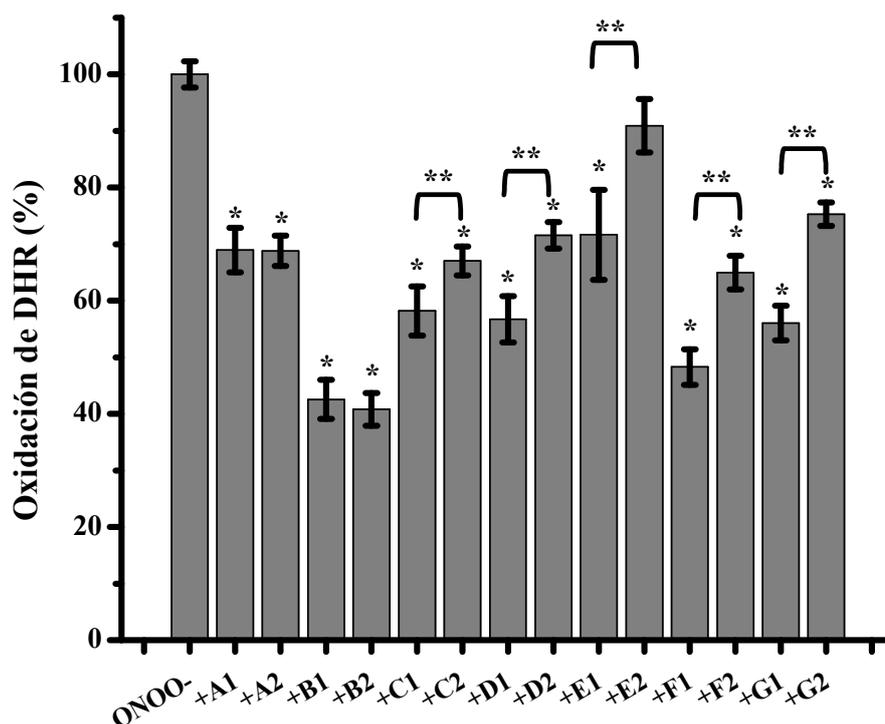


Figura 5.6. Reacción con radicales derivados de peroxinitrito. La DHR123 (50 μM) se expuso a peroxinitrito (50 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 37 $^{\circ}\text{C}$ en ausencia y en presencia de nitroalquenos (400 μM). La concentración de rodamina se determinó espectrofotométricamente a 500 nm ($\epsilon_{500\text{ nm}}=78.8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un lector de placas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas entre los tratamientos en presencia *vs* en ausencia de nitroalquenos (*= $p < 0.05$), y entre los nitroalquenos de la serie 1 *vs* la serie 2 (**= $p < 0.05$).

La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) relativa se determinó para aquellos compuestos que protegieron a la DHR de su oxidación en más del 50 % en las condiciones ensayadas. Por definición la CI_{50} es la concentración de compuesto capaz de reducir al 50 % un efecto determinado. La CI_{50} relativa se define como la concentración de compuesto requerida para alcanzar el punto de inflexión en una curva entre su plateau superior e inferior. En este caso los valores de CI_{50} hallados son relativos ya que en ninguno de los casos se alcanzó un efecto del 100 % para la mayor concentración ensayada (300 μM) y por lo tanto no se puede definir una CI_{50} absoluta.

Debido a los problemas de solubilidad en amortiguador fosfato a pH 7.4 que presentan estos compuestos no fue posible ensayar concentraciones mayores para obtener mayor protección. De todos modos, en general los compuestos alcanzaron su máxima protección a 100 μM , siendo del 60 % para los derivados **B1** y **B2** y del 40 % para **F1** (Figura 5.7).

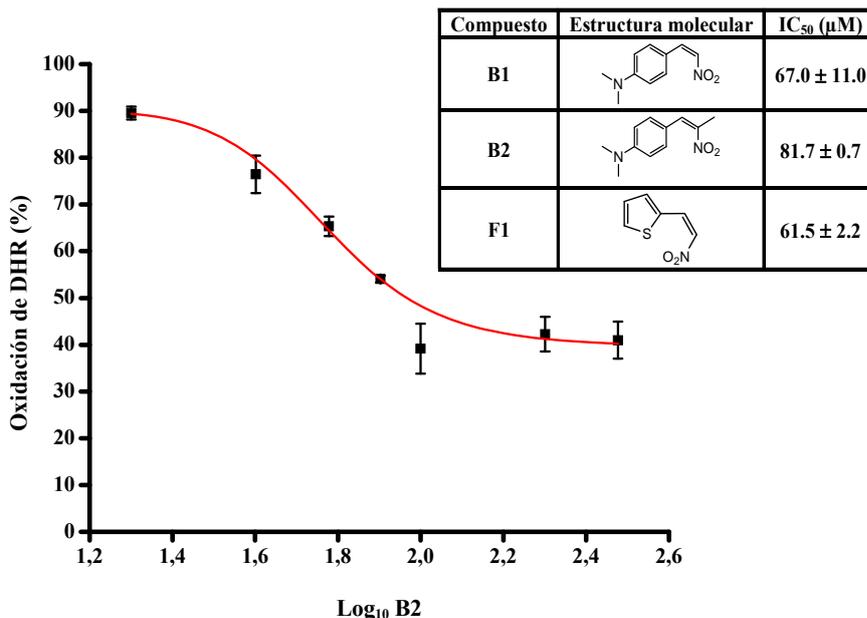
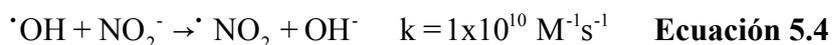


Figura 5.7. Determinación de la concentración inhibitoria 50 relativa. La oxidación de DHR (50 μM) a rodamina por los radicales derivados de la descomposición de peroxinitrito (50 μM) se siguió por absorbancia ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 78,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en ausencia y en presencia de los nitroalquenos (20 a 300 μM), en un lector de placa. El gráfico muestra como ejemplo el ajuste a una función logística ($y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$) para la oxidación de DHR en presencia de diferentes concentraciones de nitroalqueno **B2** y los valores obtenidos fueron $A_1 = 90,27291$, $A_2 = 39,608643$, $x_0 = 1,77301$, $p = 13,05905$, $r^2 = 0,98739$. **Inserto.** Se muestran los valores de CI_{50} obtenidos para los nitroalquenos luego del ajuste a la función.

Este efecto podría tener dos posibles causas. Por un lado podría existir un atrapamiento selectivo de uno de los radicales de descomposición de peroxinitrito y no del otro, de forma tal que siempre existe un porcentaje que escapa al nitroalqueno y oxida la DHR, por otro lado podría deberse a la existencia de una concentración máxima activa por encima de la cual el efecto es independiente de la concentración de compuesto.

Para estudiar el atrapamiento selectivo de radicales, el experimento se realizó en presencia de NaNO_2 (30 μM) conocido reductor capaz de reaccionar con el radical $\cdot\text{OH}$, transformándose en radical $\cdot\text{NO}_2$ de acuerdo a la **Ecuación 5.4**. De este modo el único radical presente en la mezcla de reacción debería ser el $\cdot\text{NO}_2$, proveniente tanto de la descomposición homolítica del peroxinitrito como de la transformación del anión nitrito por reacción con el radical $\cdot\text{OH}$ [309].



Entonces, en caso de que el efecto protector de los nitroalquenos se deba a su reacción con el radical $\cdot\text{NO}_2$, se observaría una disminución en la oxidación de DHR cercana a 0 en presencia del reductor (NaNO_2), ya que todo el radical $\cdot\text{OH}$ se habrá transformado en $\cdot\text{NO}_2$ mientras que si los nitroalquenos reaccionan con el radical $\cdot\text{OH}$ se observaría un aumento en la

magnitud de la oxidación, cercana a 100 %. Se probaron dos concentraciones para los tres nitroalquenos ensayados, una concentración menor a la de inactivación total (60 μM) y la mayor concentración ensayada (300 μM).

Se preincubó la mezcla conteniendo DHR (50 μM), nitroalquenos (60 ó 300 μM) y NaNO_2 (30 μM), a 37 $^\circ\text{C}$ y luego se agregó el peroxinitrito (50 μM) en agitación continua.

En ninguno de los casos se observaron cambios en la magnitud de la oxidación de DHR debidos a la presencia de NaNO_2 . En la **Figura 5.8** se muestra como ejemplo los resultados obtenidos para el derivado tiofeno **F1**. Entonces se puede establecer que el efecto observado es más bien debido a una concentración efectiva máxima en el entorno de 100 μM que no logra proteger en su totalidad de la oxidación por peroxinitrito a la DHR.

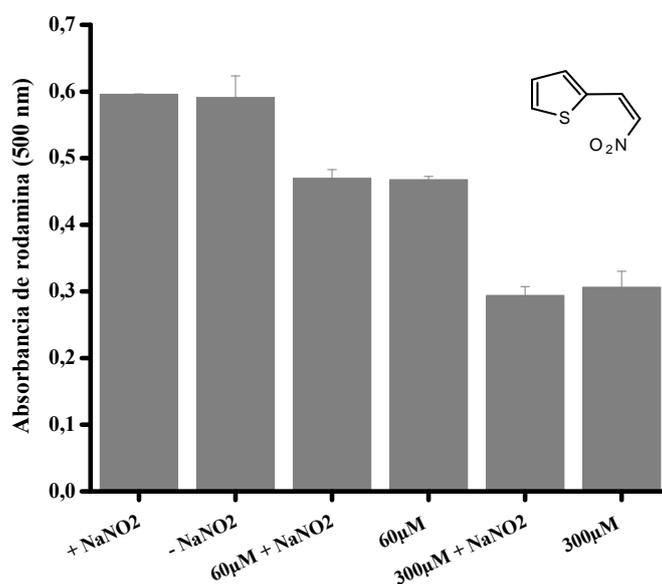


Figura 5.8. Oxidación de DHR por peroxinitrito en presencia de NaNO_2 . La DHR (50 μM) fue expuesta a peroxinitrito (50 μM) en presencia del nitroalqueno **F1** (60 y 300 μM) y en ausencia o presencia de NaNO_2 (30 μM) y se midió su absorbancia ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 78.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un lector de placas.

5.3.3 ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE LOS NITROALQUENOS CON ESPECIES REACTIVAS GENERADAS POR MACRÓFAGOS ACTIVADOS J774

5.3.3.1 Captura de radicales libres derivados de peroxinitrito

Los resultados obtenidos hasta el momento son producto de la adición en bolo de peroxinitrito, donde los efectos se deben a un agregado único, del orden micromolar, con una vida media de 0.9 s^{-1} a pH 7.4 y 37 $^\circ\text{C}$, siendo sólo una aproximación de lo que se espera que ocurra en condiciones biológicas. En un medio biológico, la formación de peroxinitrito se da en flujos a partir de la producción simultánea de sus moléculas precursoras $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ y en concentraciones del orden nanomolar. En ese entorno tanto los radicales precursores como el

propio peroxinitrito compiten por diferentes moléculas blanco con las que puede reaccionar, limitando su rendimiento y efecto [86]. Es por este motivo que los nitroalquenos con sustituyentes *N,N*-dimetilamino (**B1** y **B2**) y con anillo dioxol (**G1** y **G2**) que mostraron ser más efectivos como antioxidantes en los experimentos *in vitro*, fueron seleccionados para estudiar su capacidad de atrapar peroxinitrito generado por macrófagos activados. Si bien el nitroalqueno **F1** fue un buen atrapador tanto de peroxinitrito anión como de sus radicales de descomposición homolítica, no mostró ser un buen atrapador de radicales peroxilo y no fue considerado en esta primera etapa de cultivo celular. En un cultivo celular de macrófagos murinos J774 activados para la producción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, el peroxinitrito es generado como un flujo continuo estableciendo condiciones inflamatorias. La producción biológica de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ está distante de cumplir con la estequiometría 1:1 requerida para la formación de peroxinitrito, y el exceso de uno de ellos afecta a las oxidaciones dependientes de peroxinitrito [310, 311]. Además se debe considerar que ambos precursores poseen distintas propiedades para difundir a partir del sitio de generación, haciendo que la formación y el rendimiento del peroxinitrito en células o tejidos se vean afectados por la compartimentalización. Para minimizar estos efectos, los macrófagos J774 fueron activados para la producción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ como se detalló en las secciones 4.4.2 y 4.4.3 acorde con lo previamente descrito por Alvarez y col. [86].

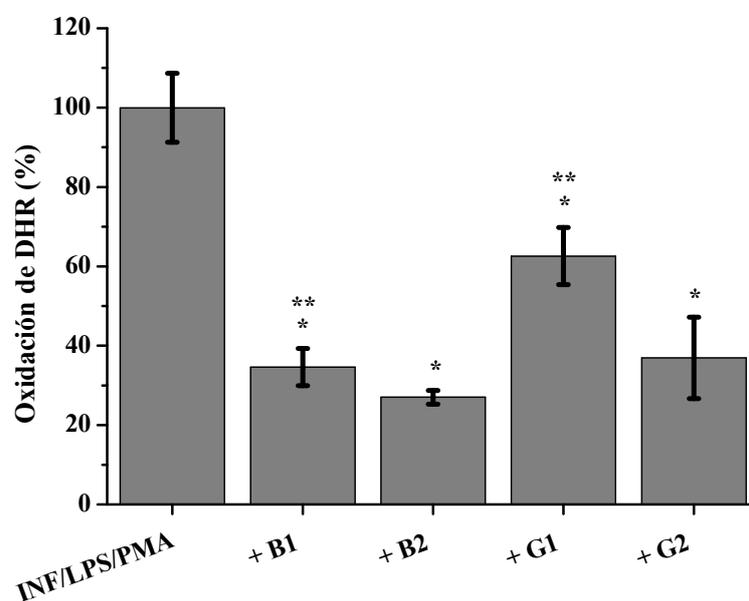


Figura 5.9. Oxidación de DHR por peroxinitrito producido en macrófagos J774 activados. La producción simultánea de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ se indujo con $\text{INF}\gamma$ (400U/mL) y LPS (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido de PMA (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) agregado 5 h después. La oxidación de DHR (15 μM) se siguió por fluorescencia a 520 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 485$ nm) durante 2 h. Los nitroalquenos (10 μM) se agregaron junto con la DHR. Los valores son el promedio \pm DE de triplicados de un experimento representativo. Se observaron diferencias significativas entre las condiciones en presencia y en ausencia de nitroalquenos ($*=p < 0.05$), y entre **B1** y **G1** ($**=p < 0.05$)

La oxidación de DHR (15 μM) se siguió por fluorescencia de la rodamina ($\lambda_{\text{exc}}=485$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm) durante 2 h en ausencia y en presencia de nitroalquenos (10 μM). El 100 % de oxidación de DHR en ausencia de nitroalquenos fue 0.07 ± 0.01 UFR/min. De los cuatro compuestos ensayados, los derivados **B1**, **B2** y **G2** mostraron una protección superior al 60 % previniendo la oxidación de la DHR en un 65.4, 73 y 63 %, respectivamente. Por su parte, **G1** mostró una protección menor, cercana al 37 %. (**Figura 5.9**).

El nivel de protección ($\geq 60\%$) observado en cultivo para una concentración de 10 μM de compuesto fue similar al del experimento *in vitro* donde se requería una concentración de 100 μM para alcanzar este porcentaje. Esto podría deberse en parte a la diferencia entre concentraciones en cada situación ya que mientras *in vitro* se agregaba un bolo de 50 μM de peroxinitrito a una concentración máxima de 400 μM de nitroalqueno, en cultivo se generan flujos de peroxinitrito en concentración. Por otro lado el agregado de bolos genera gran cantidad de radicales que reaccionan entre sí antes que con los compuestos disminuyendo su protección *in vitro*, en cambio en un flujo la formación de radicales es más controlada y favorece la reacción directa con los compuestos, aumentando su eficacia. Se observan entonces efectos similares con magnitudes diferentes debido a la relación diferente entre concentraciones y radicales planteada en ambas situaciones.

5.3.3.2 *Reactividad de los nitroalquenos con los radicales precursores del peroxinitrito*

Debido a que en los macrófagos J774 activados la producción de peroxinitrito ocurre a partir de la generación de sus precursores $\cdot\text{NO}$ and $\text{O}_2\cdot^-$, se investigó la reactividad de los nitroalquenos con cada radical, mediante la inducción de la NOS2 o el ensamblaje de la NADPH oxidasa en forma independiente. La capacidad de los compuestos (10 μM) de actuar como atrapadores de $\cdot\text{NO}$ se siguió por oxidación de la sonda fluorescente DAF-FM (5 μM) (**Figura 5.10 A**). Todos los nitroalquenos fueron capaces de atrapar N_2O_3 , molécula derivada de la oxidación de $\cdot\text{NO}$ en presencia de O_2 , en forma significativa con respecto al control.

Los compuestos **B1** y **B2** mostraron importantes diferencias entre sí inhibiendo 28 % y 74 % la oxidación de DHR, respectivamente, mientras que ambos derivados dioxol, **G1** y **G2**, tuvieron un efecto similar, inhibiendo la oxidación en 51.9 % y 51.6 %, respectivamente. En el entorno celular, sin embargo, los compuestos podrían reaccionar tanto con $\cdot\text{NO}$ como con N_2O_3 , produciendo similar efecto sobre la protección de DAF-FM. Para aclarar este punto, se expusieron eritrocitos (en cantidad equivalente a 50 μM de HbO_2) a macrófagos activados con $\text{INF-}\gamma/\text{LPS}$ en ausencia y en presencia de nitroalquenos (50 μM) (**Figura 5.10 B**).

La producción basal de $\cdot\text{NO}$ (2.21 ± 0.01 μM) se triplicó luego de la activación de los macrófagos (6.1 ± 1.1 μM). Para confirmar que la formación de MetHb observada se debió a la

presencia de $\cdot\text{NO}$, se realizó un control en presencia del inhibidor de la NOS2, 1400W (100 μM) que previno dicho aumento. Los compuestos **B2**, **G1** y **G2** evitaron la formación de MetHb en $\sim 70\%$, mientras que el compuesto **B1** no mostró efecto en tal sentido. Se concluyó además que ambas técnicas midieron el mismo efecto ya que los resultados fueron totalmente superponibles.

En términos de reactividad, la falta del grupo metilo en el C β que diferencia a **B1** de **B2**, transformó al primero en un mal atrapador de $\cdot\text{NO}$.

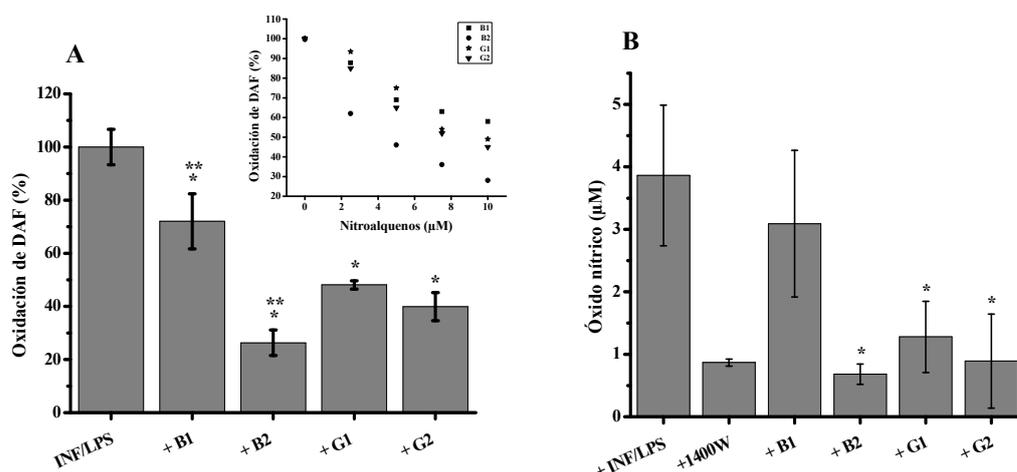


Figura 5.10. Captura de óxido nítrico. La NOS2 se indujo en las células J774 por exposición a IFN γ (400 U/mL) y LPS 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 5 h. **A.** La oxidación de DAF-FM diacetato (5 μM) por N_2O_3 se siguió en ausencia (+INF γ /LPS) y en presencia de nitroalquenos (10 μM) por fluorescencia (λ_{exc} 485 nm/ λ_{em} 520 nm). Se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con nitroalquenos ($*=p < 0.05$), y entre los nitroalquenos **B1** y **B2** ($**=p < 0.05$, $n=4$). **Inserto.** Todos los compuestos mostraron una respuesta dependiente de la dosis (entre 2.5 y 10 μM) para la protección de la oxidación de DAF. **B.** La oxidación de hemoglobina intracelular por $\cdot\text{NO}$ se estudió exponiendo eritrocitos enteros (oxihemoglobina 50 μM) a macrófagos J774 preactivados (+ IFN γ /LPS) en ausencia y en presencia de nitroalquenos (50 μM). Se observaron diferencias significativas entre las condiciones con y sin nitroalquenos ($*=p < 0.05$) para los compuestos **B2**, **G1** y **G2**. Los datos son expresados como el promedio \pm DE de triplicados para un experimento representativo.

Como control de ambos experimentos, los compuestos se evaluaron *in vitro* en las mismas condiciones experimentales utilizadas durante el cultivo de macrófagos (10 y 20 μM), como liberadores de $\cdot\text{NO}$ siguiendo en este caso la oxidación de DAF-2 (5 μM , $\lambda_{\text{exc}}=485$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm) a 37 $^\circ\text{C}$, durante 60 min en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) en lector de placas. No se observó oxidación de DAF-2 en las condiciones ensayadas.

Los compuestos **B2** y **G1** mostraron una respuesta similar para los ensayos de oxidación de DHR y DAF-FM, lo cual sugiere que la baja producción de $\cdot\text{NO}$ alcanzada en presencia de aquellos es lo que en definitiva se traduce en una menor producción de ONOO $^-$ y en un aparente efecto protector frente a la oxidación de DHR.

Para estudiar la reactividad con $\text{O}_2^{\cdot-}$, los macrófagos fueron activados con PMA (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego de 30 min se agregaron los compuestos y se determinó su capacidad de

reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ siguiendo la reducción de Fe^{3+} -Cyt c inhibible por SOD a 550 nm (**Figura 5.11**).

Los derivados de la serie 2, mostraron una protección significativamente mayor respecto al control en ausencia de nitroalqueno ($*=p<0.05$), en particular **G2** (45.1 ± 2.8 %). No se observaron diferencias entre los otros dos compuestos y el control.

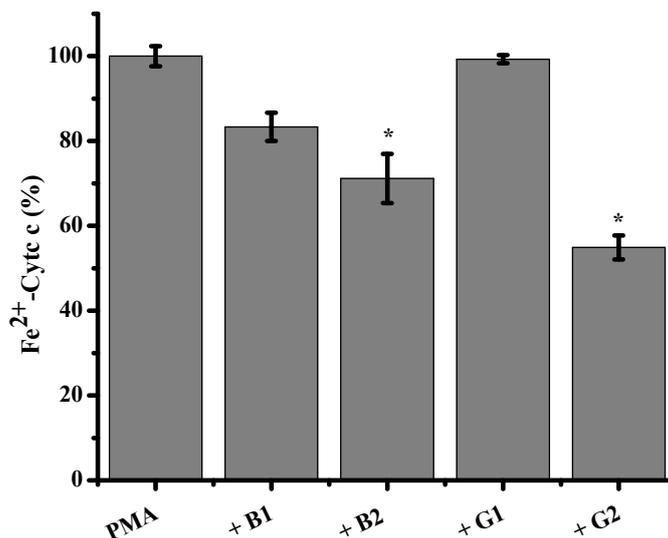


Figura 5.11. Reactividad con radical anión superóxido. El ensamblaje de NADPH oxidasa se indujo en macrófagos J774 cercanos a confluencia por adición de PMA (4 μ g/mL). Luego de 30 min se determinó la capacidad de los nitroalquenos (10 μ M) para atrapar $O_2^{\cdot-}$ siguiendo la reducción de Fe^{3+} -Cyt c (50 μ M) a 550 nm. La producción de $O_2^{\cdot-}$ en ausencia de compuestos (PMA) fue 9.7 ± 0.2 μ M/min y en presencia de SOD ($600U \cdot mL^{-1}$) fue 0.3 ± 0.02 μ M/min. Se observaron diferencias significativas entre PMA y PMA en presencia de **B2** y **G2** ($* = p < 0.05$, $n=6$). Los valores se expresaron como el promedio \pm DE de triplicados de un experimento representativo.

Resumiendo, **B1** fue un mal protector de la oxidación de DAF y de la reducción de Fe^{3+} -Cyt c, sin embargo fue muy efectivo previniendo la oxidación de DHR, por lo que es probable que su reactividad se relacione directamente al peroxinitrito o sus radicales de descomposición $\cdot NO_2$ y $\cdot OH$ de acuerdo con la constante cinética hallada ($6.1 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$) y los datos obtenidos tanto *in vitro* como en cultivo celular. Por su parte, **B2** y **G1** fueron capaces de reaccionar con peroxinitrito y sus radicales $\cdot NO_2$ y $\cdot OH$ tanto *in vitro* como en cultivo de macrófagos, siendo ambos también capaces de proteger de la oxidación a DAF y en el caso de **B2**, además previno de la reducción al Fe^{3+} -Cyt c. El compuesto **G2** inhibió la oxidación de DAF y la reducción de Fe^{3+} -Cyt c y además mostró una buena protección de la oxidación de DHR en cultivo, que sin embargo no fue observada en los experimentos *in vitro*, por lo que se concluye que no es buen atrapador de peroxinitrito o sus radicales de descomposición.

5.3.3.3 Estudio de la reactividad con H_2O_2

La dismutación espontánea o enzimática del $O_2^{\cdot-}$ conduce a la formación de H_2O_2 , molécula muy estable en condiciones fisiológicas que puede ser completamente reducida a H_2O o parcialmente reducida a $\cdot OH$. El radical $\cdot OH$ como ya se mencionó, es un poderoso oxidante biológico, que actúa mediante las reacciones de Fenton o Haber-Weiss [312], y es por ello que determinar la reactividad de H_2O_2 con los nitroalquenos se vuelve importante.

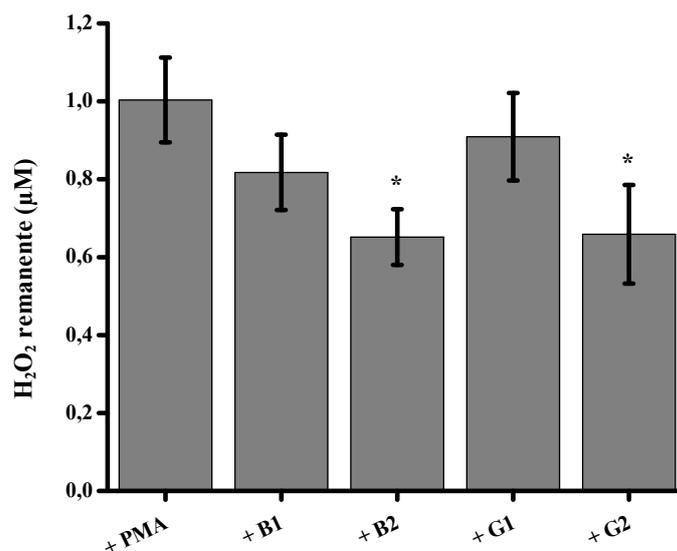


Figura 5.12. Reactividad con peróxido de hidrógeno. El ensamblaje de la NADPH oxidasa se indujo por adición de PMA (4 $\mu g/mL$) a células J774 cercanas a la confluencia. Luego de 30 min el sobrenadante de los macrófagos activados (15 μL) se incubó durante 30 min en ausencia y en presencia de nitroalquenos (50 μM) y el H_2O_2 se cuantificó mediante el ensayo de FOX a 560 nm. La producción de H_2O_2 fue $1.0 \pm 0.1 \mu M$ en ausencia de compuestos (PMA). Se observaron diferencias significativas entre el control con PMA solo y en presencia de **B2** y **G2** (* = $p < 0.05$, $n=6$). Los datos se expresaron como el promedio \pm DE de triplicados de un experimento representativo.

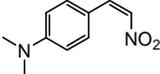
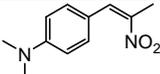
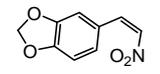
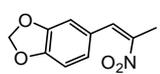
Para determinar la concentración de H_2O_2 en el sobrenadante de los cultivos se utilizó el ensayo de FOX [284]. En la condición control (+ PMA), la máxima concentración de H_2O_2 detectada fue 1 μM , en el orden de lo descrito previamente [313]. La concentración de H_2O_2 generado fue reducida en forma significativa con respecto al control (PMA) en presencia de **B2** y **G2** (50 μM) a 0.65 y 0.66 μM respectivamente (~35 %), mientras que el resto de los nitroalquenos no mostró diferencias significativas con respecto al control (**Figura 5.12**).

Los resultados obtenidos coinciden con los registrados para la protección de la reducción de Fe^{3+} -Cyt c, por lo que es probable que la reactividad observada se deba a una disminución en la concentración de $O_2^{\cdot-}$, más que a un atrapamiento efectivo de H_2O_2 .

5.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de los nitroalquenos se estudió por el ensayo de MTT con el fin de descartar cualquier efecto de los mismos sobre la viabilidad celular, que pudiera sobreestimar los efectos observados con respecto a la producción de especies reactivas. Este ensayo determina la funcionalidad mitocondrial de la célula mediante la reducción de MTT a formazán, existiendo una relación proporcional entre la cantidad de células vivas y el formazán formado y determinado a 560 nm. Por un lado se evaluó la toxicidad de los compuestos (10 y 20 μM) durante el tiempo máximo en el cual estuvieron en contacto con las células durante los experimentos (2 h).

Tabla 5.5. Citotoxicidad en 2 h

Compuesto	Estructura	Concentración (μM)	Viabilidad ^a (%)
B1		10	98 \pm 9
		20	86 \pm 5
B2		10	101 \pm 11
		20	94 \pm 10
G1		10	94 \pm 11
		20	87 \pm 11
G2		10	97 \pm 7
		20	89 \pm 7

^a Los macrófagos murinos J774 fueron expuestos a los nitroalquenos (10 y 20 μM) durante 2 horas. El formazán generado se determinó a 560 nm en lector de placas. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables con respecto al control en ausencia de compuestos (100 %).

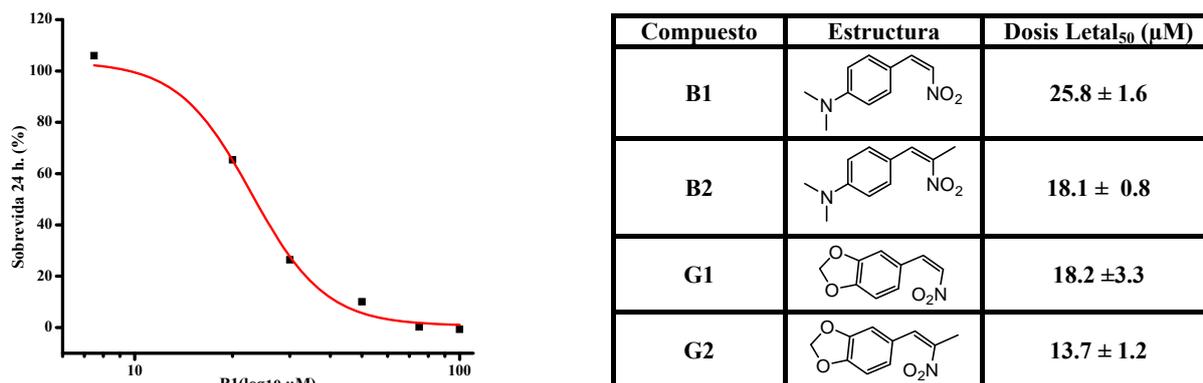


Figura 5.13. Determinación de dosis letal₅₀ en 24 h. Los macrófagos J774 en confluencia se incubaron 24 h, en ausencia y en presencia de nitroalquenos (5 a 100 μM). Luego, el medio de cultivo se sustituyó por MTT (0.1 mg.mL⁻¹) y se incubó 3 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. La producción de formazán a 560 nm en presencia de la solución reveladora (DMSO, glicina 90:10) se midió en lector de placas. **Panel izquierdo:** Registro típico obtenido para **B1** mediante ajuste a una función logística ($y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$). **Panel derecho:** Tabla con valores de DL₅₀, promedio de 3 experimentos representativos ± DE.

En todos los casos las células mostraron una supervivencia mayor al 94 % y al 86 % para 10 y 20 μM respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre concentraciones sólo para los compuestos **B1** y **G2** ($p < 0,05$). Por su parte, la presencia del grupo metilo en el Cβ (**B2** y **G2**) no influyó en la supervivencia con respecto a los compuestos sin él (**Tabla 5.5**).

La citotoxicidad de los compuestos a largo plazo (24 h) se estudió en forma análoga y en un rango de concentraciones entre 5 y 100 μM, determinándose una dosis letal 50 (DL₅₀) en cada caso (**Figura 5.13**). Los derivados *N,N*-dimetilamino fueron menos tóxicos que sus pares dioxol, siendo el compuesto **B1** el menos tóxico (DL₅₀ = 25.8 ± 1.6 μM).

5.5 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MACRÓFAGOS ACTIVADOS Y CONDROCITOS EN PRESENCIA DE NITROALQUENOS

Frente a las señales producidas por macrófagos o monocitos activados, los condrocitos responden aumentando la actividad catabólica en el cartílago que termina estableciendo una inflamación crónica a nivel articular y reducción en la síntesis de los principales componentes de la matriz, agregán y colágeno tipo II [314]. Con respecto a las señales emitidas desde los condrocitos hacia los macrófagos, Dreier y col. [286] lograron establecer la existencia de un diálogo parácrino que posibilita la supervivencia de macrófagos en cultivos de agarosa libre de SFB en presencia de condrocitos. En el co-cultivo condrocitos/macrófagos, los primeros son capaces de activar el zimógeno pro-MMP-9 (gelatinasa B) liberado por los macrófagos, proceso que no ocurre en ausencia de condrocitos, por lo que éstos proveen de factores o proteinasas necesarias

para su activación. En particular, las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, son clave en la degeneración de las articulaciones [315, 316]. Ambas poseen baja especificidad de sustrato contribuyendo a la degradación de colágeno y otras macromoléculas de la matriz extracelular, destruyendo su estructura [316, 317]. El modelo desarrollado por Dreier y col. [286] es un modelo *in vitro* de inflamación patológica articular útil para estudiar las interacciones entre ambos tipos celulares

Se estudió la interacción entre macrófagos activados y condrocitos en presencia del compuesto **B1**. Los condrocitos (4×10^4 células) fueron cultivados en un cubreobjeto con el fin de observar su aspecto al microscopio a los 5 días (**Figura 5.14 A y B**).

Para el co-cultivo de condrocitos y macrófagos se procedió de acuerdo a lo detallado en el punto 4.6.2 en presencia o ausencia del compuesto **B1** (20 μ M). En la **Figura 5.15**, se observa la presencia de los dos tipos celulares en diferente plano.

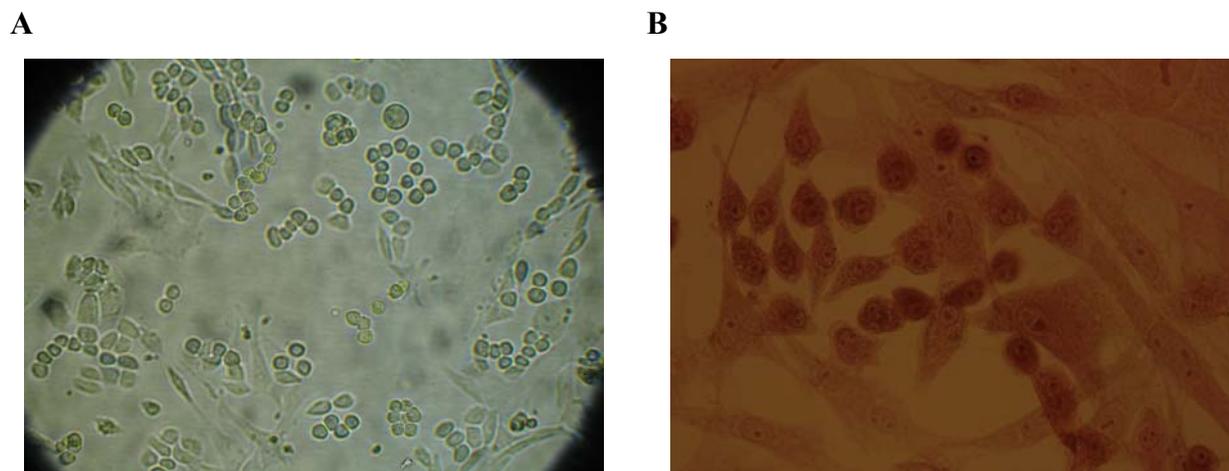


Figura 5.14. Cultivo primario de condrocitos. **A.** Condrocitos vistos al microscopio invertido (Nikon, modelo XDS-1B) con aumento de 1200X. **B.** Condrocitos teñidos con hematoxilina/eosina en microscopio óptico (Nikon Microphot-FXA) con aumento de aumento 2000X.

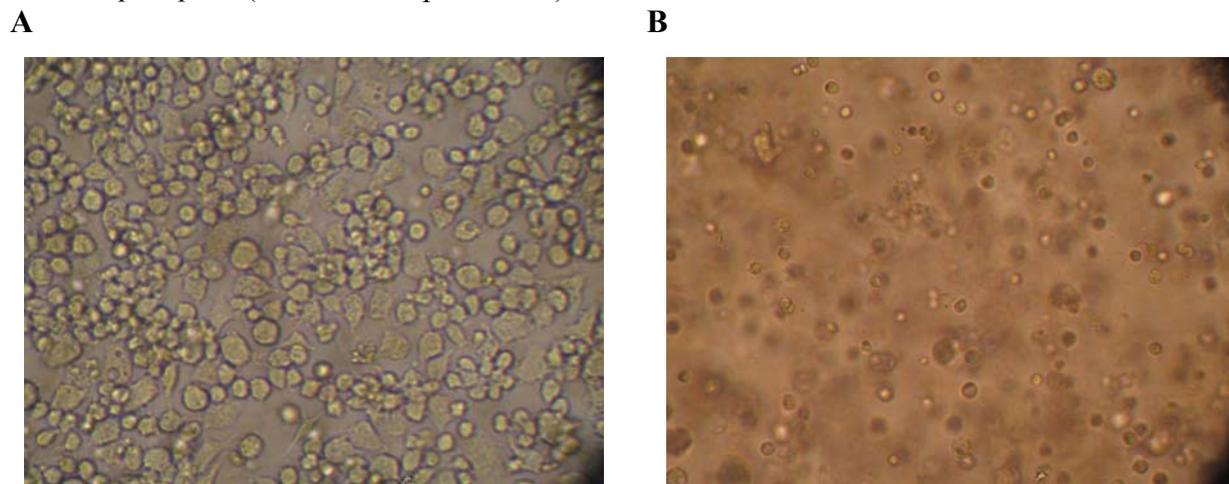


Figura 5.15. Co-cultivo de macrófagos J774 y condrocitos de pollo. **A.** Se observan en foco los macrófagos presentes en la capa inferior de la placa y en refringencia los condrocitos. **B.** Se observan en foco los condrocitos de pollo en la capa superior y en capa inferior los macrófagos fuera de foco. Ambas imágenes se registraron en un microscopio invertido con un aumento de 1200X en ausencia de tinción.

Para las diferentes condiciones ensayadas se determinó la concentración proteica luego de 24 h obteniéndose valores en el entorno de los 0.65 mg.mL^{-1} .

La determinación de actividad gelatinasa debida a la presencia de MMPs (principalmente MMP-2 y MMP-9) activadas en presencia de condrocitos, se realizó mediante zimografía. Esta técnica electroforética cualitativa permite observar la actividad proteolítica gelatinasa en un gel SDS-PAGE conteniendo gelatina, que se evidencia por la ausencia de tinción en el revelado [286, 318]. Las enzimas y pro-enzimas se separaron en condiciones no reductoras y desnaturizantes (SDS). Para la renaturalización se utilizó detergente (TritonX-100) para remover el SDS y amortiguador Tris-HCl con CaCl_2 posibilitando que las pro-enzimas o zimógenos, se activen.

Luego de 24 h de incubación, la actividad enzimática se evidenció en los geles por la falta de tinción [318].

En este resultado preliminar se muestra que las únicas condiciones con actividad gelatinasa fueron aquellas donde se co-cultivaron macrófagos activados y condrocitos (**Figura 5.16**). En estas condiciones aparecieron las bandas típicas de complejos macromoleculares (130-240 kDa) de las enzimas previamente reportados [319], además de bandas relativamente definidas de las enzimas individuales.

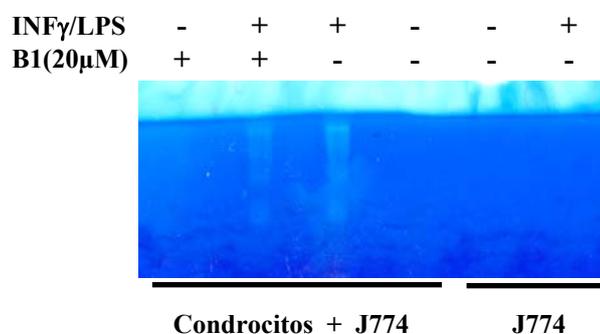


Figura 5.16. Actividad gelatinasa en co-cultivos. Los condrocitos (1×10^5 células. mL^{-1}) se incubaron sobre un cultivo de macrófagos confluentes, no activados (-) o activados por la incubación durante 4 h con INF γ /LPS (+) en ausencia (-) y en presencia de **B1** (20 μ M) (+). El gel de poliacrilamida (10%) contenía gelatina (0.1%). Como control se corrieron macrófagos activados y no activados en ausencia de condrocitos.

Se confirma así la existencia de una comunicación de tipo parácrino entre ambos tipos celulares que posibilita la activación por parte de los condrocitos, de pro-enzimas generadas por los macrófagos, de acuerdo a lo previamente descrito [286]. Sin olvidar que este gel sólo se puede analizar en forma cualitativa, se observó una disminución en la actividad gelatinasa en la condición de co-cultivo entre macrófagos activados y condrocitos en presencia del nitroalqueno **B1**, mostrando cierto rol protector frente a la actividad gelatinasa de algunas metaloproteinasas

y/o la prevención de la activación de estas enzimas por los sistemas de señalización intercelular. Las MMP-2 (~72 kDA) y MMP-9 (~ 92 kDA) (gelatinasas A y B, respectivamente) poseen actividad gelatinasa específica y son mayoritariamente expresadas en el cartílago de pacientes con AR y osteoartritis [180].

Los zimógenos (ej. pro-MMP9) son liberados por los macrófagos aún en condiciones normales (no activados), por lo que deberían haberse activado en presencia de condrocitos. Sin embargo esto no se observó (**Figura 5.16**, condición condrocitos/J774 – INF γ /LPS), debido probablemente a que se generaron en menor cantidad con respecto a los macrófagos activados y a que la sensibilidad de la técnica, si bien está en el orden de los picogramos, no permitió su visualización. Por otro lado y como se esperaba, no se observó actividad gelatinasa en aquellos sobrenadantes de macrófagos, activados o no, en ausencia de condrocitos (**Figura 5.16**, condición J774 +/- INF γ /LPS y J774+/+INF γ /LPS).

5.6 PROPIEDADES ANALGÉSICAS Y ANTIINFLAMATORIAS DE LOS NITROALQUENOS

5.6.1 NITROALQUENOS COMO ANALGÉSICOS

El modelo de contorsiones abdominales en ratones es un modelo de dolor agudo donde el estímulo físico o químico tiene como objetivo determinar una latencia de respuesta del animal ante dicho estímulo y tiene un desarrollo temporal breve [320]. Fue desarrollado por Siegmund y col. [321] y mejorado por Collier y col. en 1968 [289]. Se basa en la aplicación de un estímulo nociceptivo inespecífico, en nuestro caso ácido acético (HAc), que induce contorsiones abdominales inhibibles por sustancias analgésicas. En este modelo la transmisión nociceptiva se da a través de la liberación de prostaglandinas, principalmente PGE₂ [322], en el sitio de inyección a partir de la estimulación de la COX-1 y COX-2. En este caso se utilizó como fármaco analgésico de referencia dipirona (metamizol) que actúa mediante la inhibición de las isoformas 1 y 2 de la enzima ciclooxigenasa (COX), disminuyendo así la síntesis de prostaglandinas asociadas a la generación de dolor. Este fármaco se administra por vía oral, su eliminación es renal y posee un poder analgésico mayor al del ácido acetilsalicílico.

Los nitroalquenos **B1**, **B2**, **G1** y **G2** mostraron un efecto analgésico similar a la dipirona y significativamente superior a la situación control en ausencia de tratamiento (**Figura 5.17**).

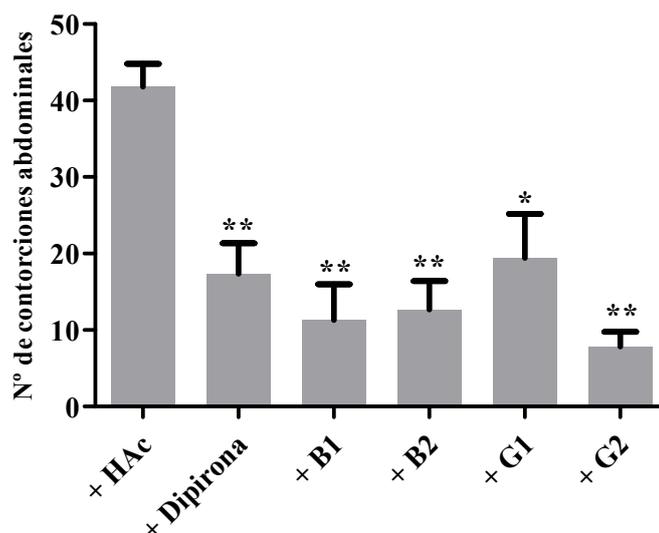


Figura 5.17. Efecto analgésico de los nitroalquenos en un modelo de dolor agudo Los nitroalquenos y la dipirona se administraron en dosis de 30 μ moles/kg de peso por vía oral 40 min antes de la inyección intraperitoneal de HAc (0.1M). Las contorsiones se registraron luego de 5 min de la inyección de HAc y durante un período de 20 min. Los compuestos **B1**, **B2** y **G2**, mostraron un efecto significativamente diferente al control (**, $p < 0.01$) y similar al fármaco dipirona. El compuesto **G1** mostró un efecto analgésico menor a la dipirona, pero diferente al control en ausencia de tratamiento (*, $p < 0.05$).

Tabla 5.6. Nitroalquenos como inhibidores de COX-1 y COX-2

Nitroalquenos	Inhibición ^a COX-1 (%)	Inhibición ^a COX-2 (%)
G1 (10 μM)	26 \pm 4	41
G1 (30 μM)	33	53
B1 (10 μM)	24 \pm 2	43 \pm 8
B1 (30 μM)	44 \pm 8	55
B2 (10 μM)	23	72 \pm 3
B2 (30 μM)	42 \pm 7	88 \pm 1
G2 (10 μM)	21 \pm 6	53 \pm 5
G2 (30 μM)	41 \pm 6	55 \pm 9

^aLa inhibición de las isoformas COX-1 y COX-2 por los compuestos se ensayó mediante un kit de búsqueda de inhibidores como se describió en el punto 4.8. Como control se utilizaron los resultados obtenidos previamente para indometacina como inhibidor de referencia. Control indometacina (0.1 μ M) = 49.7 \pm 0.7 % COX-1, e indometacina (6 μ M) = 53.4 \pm 9.8 % COX-2 [325]

Debido a que en este modelo la actividad analgésica se ejerce mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa COX, los compuestos se ensayaron como inhibidores de COX-1 y COX-2, tanto para la concentración utilizada en el modelo (30 μ M) como para la utilizada en los experimentos en células (10 μ M) realizados previamente.

Todos los compuestos en las concentraciones ensayadas inhibieron en un porcentaje similar a la COX-1, situándose en ~20 % para 10 μ M y ~40 % para 30 μ M (**Tabla 5.6**). La isoforma COX-2 también fue inhibida por todos los compuestos en un porcentaje aún mayor (~50 %) al de COX-1. Sin embargo, el compuesto **B2** se destacó como un potente inhibidor de COX-2, disminuyendo su actividad en un 72 % y 88 % para las concentraciones 10 y 30 μ M, respectivamente.

La mayoría de los analgésicos presentes en el mercado son inhibidores tanto de COX-1 como de COX-2, sin embargo poseen diferencias en su respuesta, siendo en algunos casos más eficientes contra una de las isoforma. Por ejemplo, el ácido acetilsalicílico (aspirina) es un inhibidor 10 a 100 veces mas potente de la isoforma COX-1 [323, 324].

La diversidad en los mecanismos de unión de los inhibidores a COX-1 y COX-2 es enorme, debido a la habilidad que poseen estas enzimas de acomodarse estructuralmente a diferentes moléculas sin un evidente cambio conformacional [323]. Mientras que uno de los principales productos de la actividad COX-1 en condiciones normales son los tromboxanos (TXA₂), la estimulación de la COX-2 en presencia de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β no altera su producción, pero incrementa en forma importante la síntesis de prostaglandinas PGI₂ y PGE₂ que poseen un rol importante en la vasodilatación y en la mediación de mecanismos de dolor e inflamación, respectivamente. Debido entonces a que la expresión de COX-2 juega un rol importante en la patogénesis de múltiples enfermedades [326], el resultado obtenido para el compuesto **B2** es destacable en términos de su potencial uso como fármaco.

5.6.2 NITROALQUENOS COMO ANTIINFLAMATORIOS

Para probar el efecto antiinflamatorio de nuestros compuestos, se probó el modelo de peritonitis inducida por carragenina en ratón de acuerdo con el método descrito por Griswold y col.[290], utilizando la indometacina como fármaco de referencia.

La carragenina es un polisacárido de alto peso molecular de origen vegetal (algas) que se utiliza como agente irritante provocando una rápida infiltración de leucocitos polimorfonucleares en el tejido dañado. Durante la fase subaguda de la inflamación los leucocitos y monocitos se adhieren a las células endoteliales y cruzan la pared de los capilares sanguíneos como consecuencia del poder atrayente de las citoquinas, por ejemplo IL-6 [327].

La indometacina (ácido 2-[1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-il] acético), que empleamos como fármaco de referencia, es un antiinflamatorio no esteroideo, perteneciente a la familia de derivados del ácido indolacético. Su efecto como antiinflamatorio se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por inhibición selectiva de COX-1 y a la inhibición de la migración leucocitaria a las áreas inflamadas. Otros mecanismos que contribuyen a su

actividad antiinflamatoria son la inhibición de las fosfodiesterasas que producen aumento de las concentraciones intracelulares de ADP e interfieren con la producción de anticuerpos. Estos efectos antiinflamatorios contribuyen al efecto analgésico y antipirético que posee, por lo que es utilizada en el tratamiento de la artritis reumatoide [328]. La indometacina se absorbe de manera rápida por vía oral y sufre el efecto de primer paso a nivel hepático modificándose mediante *O*-desmetilación (50 %), *N*-desacilación (10 %) y glucuronidación (10 %), mientras que un 10-20 % se elimina sin metabolizar por excreción tubular activa a nivel renal [329].

Los nitroalquenos y la indometacina se administraron VO en dosis de $30 \mu\text{moles.kg}^{-1}$, y luego de 30 min se inyectó carragenina (1 %) en el peritoneo. Luego de 4 h los animales se sacrificaron, se lavó el peritoneo y se extrajeron los macrófagos para su recuento.

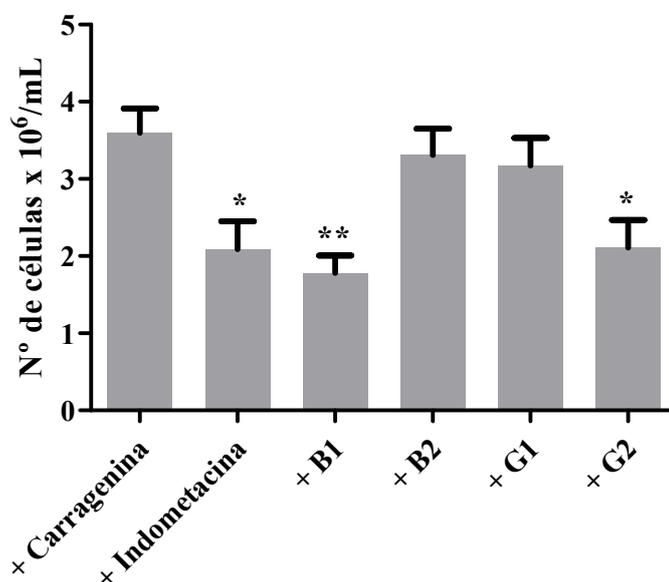


Figura 5.18. Efecto antiinflamatorio de los nitroalquenos en un modelo de peritonitis inducida por carragenina. Los compuestos se administraron por VO ($30 \mu\text{moles.kg}^{-1}$ en CMC 0.3 %, Tween 80). Luego de 30 min se inyectó carragenina ($250 \mu\text{L}$, 1 %) en la cavidad intraperitoneal. A las 4 h los animales se sacrificaron, se lavó la cavidad peritoneal con PBS estéril y se recogió el fluido para la cuantificación de macrófagos viables por tinción con azul de tripán (0.4 %). Los nitroalquenos **B1** ($p < 0.01$), **G2** y la indometacina ($p < 0.05$) mostraron un efecto significativo con respecto al control en ausencia de fármaco.

La **Figura 5.18** muestra los resultados obtenidos. En ausencia de tratamiento se obtuvo un recuento de $4 \pm 1 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$, mientras que el número de células que infiltraron el peritoneo se redujo $\geq 50 \%$, tanto en presencia de los nitroalquenos **B1** ($1.8 \pm 0.7 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$) y **G2** ($1.7 \pm 0.8 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$) como en presencia de indometacina ($2.1 \pm 0.8 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$). Los compuestos **B2** y **G1** no mostraron efecto antiinflamatorio.

5.6.3 NITROALQUENOS COMO ANTIARTRÍTICOS

Los nitroalquenos **B1**, **B2**, **G1** y **G2**, fueron evaluados en el modelo de AR inducida por ACF en ratas Wistar, por inyección sub-plantal en pata derecha de ACF (0.1 mL).

Las ratas en grupos de 6 fueron identificadas, pesadas y medido el grosor de la pata a nivel de la articulación mediante calibre digital los días 1, 7 y 14. Los nitroalquenos se administraron diariamente desde el día 14 hasta el 21 por VO (en CMC y 0.3 % Tween 80) e IP (en PBS estéril y 0.3 % Tween 80) en dosis de $100 \mu\text{moles.kg}^{-1}$. El MTX en bajas dosis es un efectivo agente antireumático ($DE_{50} = 0.06 - 0.075 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{día}^{-1}$) y una dosis de $0.1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{día}^{-1}$ administrada durante 14 días en este modelo es capaz de suprimir la enfermedad [330].

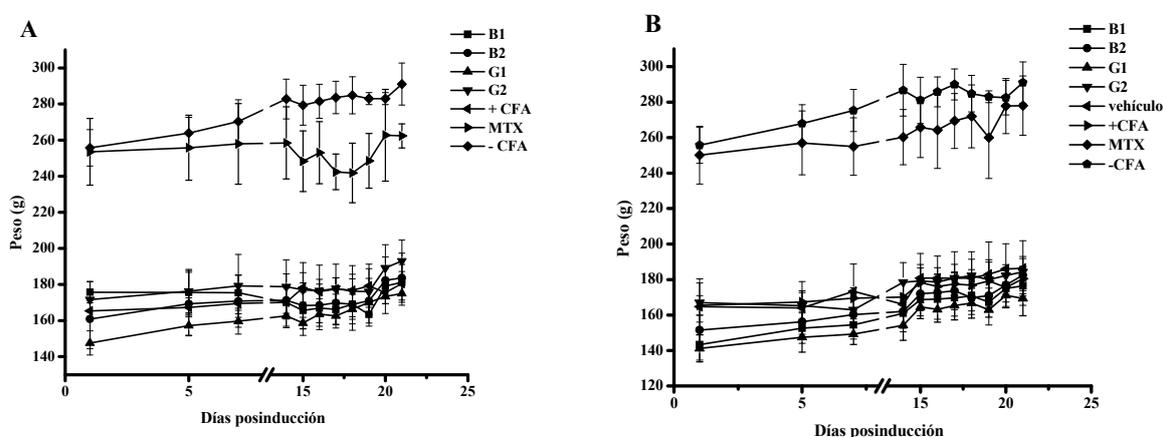


Figura 5.19. Evolución del peso en el modelo de AR. A. Vía oral. **B.** Vía intraperitoneal. El peso de los animales se registró en los días 1, 5, 7 y diariamente entre los días 14 y 21. Los valores de peso superiores corresponden a los grupos formados por machos (-ACF, MTX VO y MTX vía IP).

En este caso se administró en dos únicas dosis de 0.3 mg.kg^{-1} (día 14 y 17), que corresponden a dosis diarias de $0.085 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{día}^{-1}$, en el orden de lo reportado previamente [330, 331]. Durante este período los animales se pesaron y se midió su articulación diariamente.

En el día 21, se extrajeron muestras de suero para la dosificación de actividad TGO, TGP, creatinina y urea. La **Figura 5.19** muestra la evolución del peso (**a**: vía oral; **b**: vía IP) durante los 21 días de duración del tratamiento.

Durante el avance de la enfermedad se esperaba observar una pérdida de peso, ya sea por falta de apetito o por dolor al moverse a obtener el alimento, que se registró en los grupos control en ausencia de tratamiento (+ACF) y tratados por VO. Sin embargo, los animales tratados por vía IP no fueron afectados en esta variable por la patología.

Las articulaciones en el día 1 para todos los animales tenían un diámetro promedio de 3.4 ± 0.4 mm, mientras que en el día 14 éste había aumentado a 6.6 ± 0.8 mm en toda la población inyectada con ACF. La administración VO de los compuestos durante 7 días no mostró diferencias significativas respecto al control positivo (+ACF). El único efecto significativo ($p < 0.01$) observado y esperable fue entre el fármaco de referencia MTX y el control en ausencia de tratamiento (Figura 5.20).

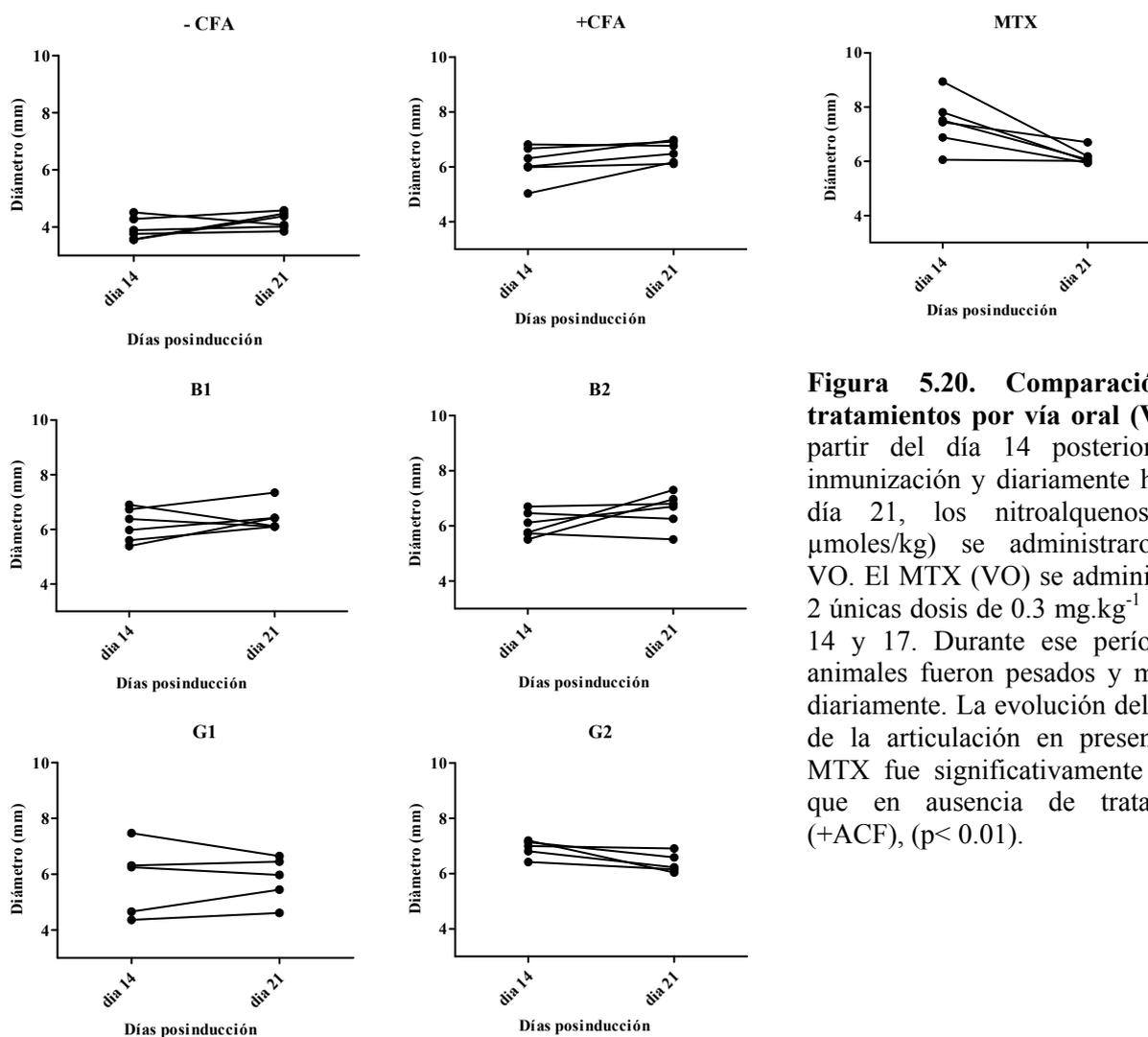


Figura 5.20. Comparación de tratamientos por vía oral (VO). A partir del día 14 posterior a la inmunización y diariamente hasta el día 21, los nitroalquenos ($100 \mu\text{moles/kg}$) se administraron por VO. El MTX (VO) se administró en 2 únicas dosis de 0.3 mg.kg^{-1} en días 14 y 17. Durante ese período los animales fueron pesados y medidos diariamente. La evolución del grosor de la articulación en presencia de MTX fue significativamente menor que en ausencia de tratamiento (+ACF), ($p < 0.01$).

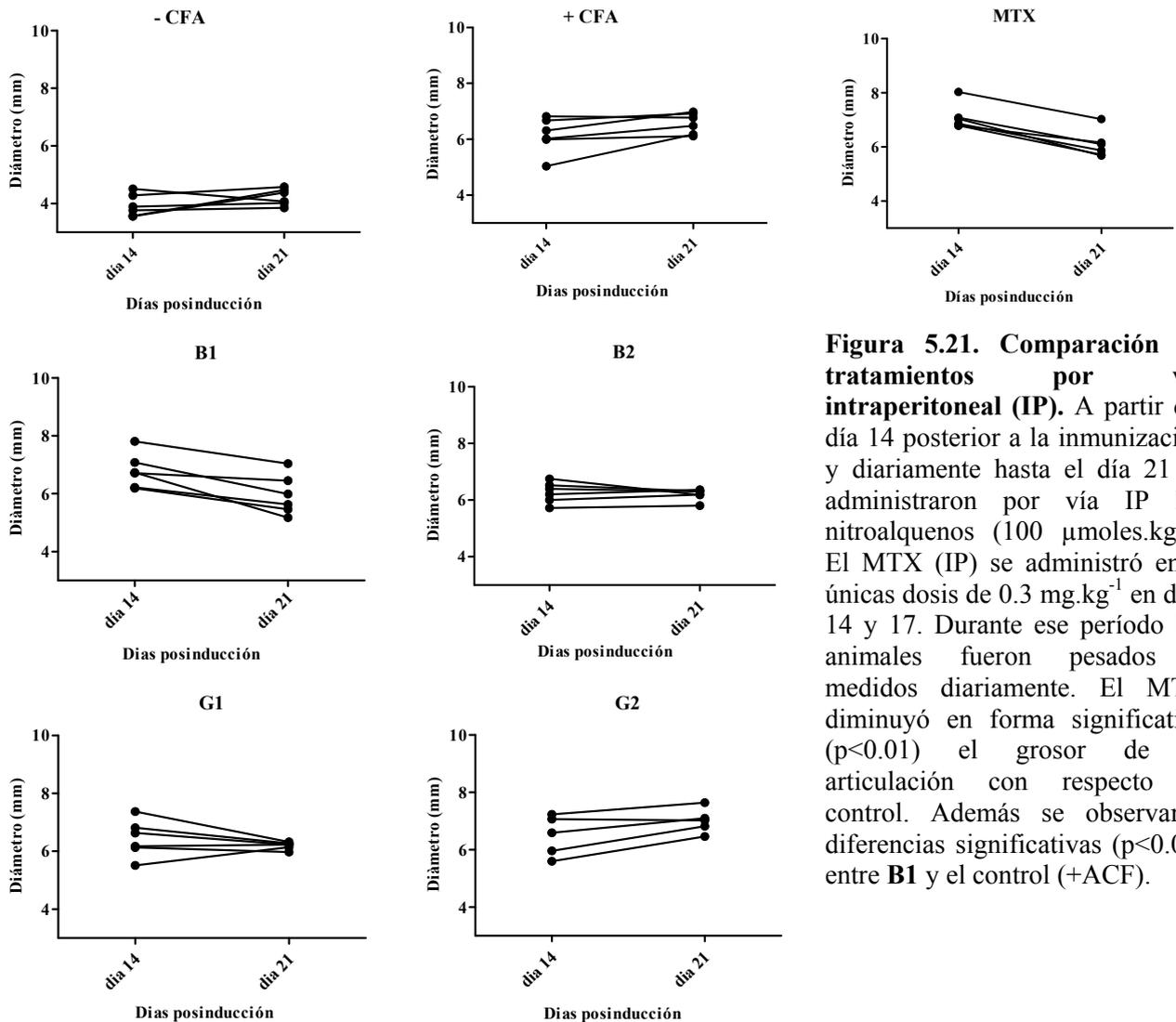


Figura 5.21. Comparación de tratamientos por vía intraperitoneal (IP). A partir del día 14 posterior a la inmunización y diariamente hasta el día 21 se administraron por vía IP los nitroalquenos ($100 \mu\text{moles.kg}^{-1}$). El MTX (IP) se administró en 2 únicas dosis de 0.3 mg.kg^{-1} en días 14 y 17. Durante ese período los animales fueron pesados y medidos diariamente. El MTX disminuyó en forma significativa ($p < 0.01$) el grosor de la articulación con respecto al control. Además se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre **B1** y el control (+ACF).

Cuando los compuestos se administraron por vía IP, se observó efecto sólo para el compuesto **B1** que disminuyó el grosor de la articulación en forma significativa ($p < 0.05$) con respecto al control en ausencia de tratamiento (**Figura 5.21**).

5.6.3.1 Pruebas bioquímicas de toxicidad

Evaluación de daño hepático

La actividad de las enzimas glutámico- pirúvica (TGP) y glutámico-oxalacética (TGO) se evaluó mediante kits comerciales que acoplan una reacción de consumo de NADH a la producción de los respectivos productos, mediante la lectura de la absorbancia a 340 nm. Para el caso de la TGO, se acopló la reacción que cataliza la malato deshidrogenasa y transforma el oxalacetato (producto de reacción de la TGO) a malato a expensas de NADH y para el caso de TGP, fue la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa que consume piruvato (producto de la TGP) a expensas de NADH. La técnica utilizada para la determinación de TGO presentó márgenes de error muy alto, que no se observaron en general para el resto de las técnicas

utilizadas. Ningún nitroalquenos mostró valores aumentados de TGO y TGP, en las vías de administración y concentración ensayadas, con respecto a los individuos en ausencia de tratamiento (+ACF) (**Tabla 5.7**).

El grupo tratado con MTX mostró los mayores valores tanto por VO como IP (116 ± 39 y 117 ± 48 U.I./L, respectivamente), acorde a lo esperable por su conocida hepatotoxicidad [332] (**Tabla 5.7**).

Tabla 5.7. Evaluación bioquímica en suero de ratas

Vía oral (*)	-ACF	+ACF	B1	B2	G1	G2	MTX
TGO (U.I./L)	71 ± 33	91 ± 39	77 ± 27	83 ± 35	89 ± 35	86 ± 36	116 ± 39
TGP (U.I./L)	41 ± 1	58 ± 4	25 ± 2	34 ± 4	28 ± 3	38 ± 2	72 ± 8
Urea (mg/dL)	51 ± 7	51 ± 3	55 ± 1	55 ± 7	57 ± 1	52 ± 4	63 ± 11
Creatinina (mg/dL)	0.79 ± 0.02	0.73 ± 0.07	0.80 ± 0.07	0.78 ± 0.03	0.88 ± 0.06	0.75 ± 0.04	0.67 ± 0.09
PCR (mg/L)	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6
Vía IP (*)	-ACF	+ACF	B1	B2	G1	G2	MTX
TGO (U.I./L)	64 ± 21	91 ± 39	113 ± 50	112 ± 37	90 ± 38	86 ± 28	117 ± 48
TGP (U.I./L)	41 ± 1	58 ± 4	60 ± 7	41 ± 1	40 ± 1	41.6 ± 0.4	59 ± 10
Urea (mg/dL)	51 ± 7	51 ± 3	50 ± 10	45 ± 4	53 ± 5	51 ± 5	52 ± 4
Creatinina (mg/dL)	0.79 ± 0.02	0.73 ± 0.07	0.77 ± 0.01	0.75 ± 0.03	0.78 ± 0.06	0.72 ± 0.03	0.76 ± 0.02
PCR (mg/L)	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6

(*) Para cada condición se analizó el suero de tres animales y su dosificación se realizó mediante kits comerciales (Doles™ reagents, Brasil)

Evaluación de la funcionalidad renal

La urea en suero se cuantificó mediante la acción enzimática de la ureasa, que libera amonio (NH_3) y en presencia de salicilato y nitroprusiato de sodio en medio alcalino, genera un cromógeno que absorbe a 600 nm en forma proporcional a la urea presente. La creatinina por su parte se cuantificó mediante su reacción con picrato alcalino formando un complejo rojo anaranjado que absorbe a 505 nm. No se observaron diferencias en la concentración de urea y creatinina entre los tratamientos, ni entre las vías de administración (**Tabla 5.7**).

Determinación de proteína C reactiva (PCR)

La proteína C reactiva es producida por el hígado y aumenta sus niveles circulantes en respuesta a un proceso inflamatorio, por lo que se la denomina como proteína de fase aguda. En este caso se determinó mediante un método cualitativo determinando la presencia o no de aglutinación como producto de la reacción entre la PCR y una suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR, visible en forma macroscópica. La no aglutinación ($\text{PCR} \leq 6$ mg/L) en el suero fue observada en todas las condiciones (**Tabla 5.7**), independientemente de la vía de administración utilizada, incluso en la condición de AR en ausencia de tratamiento (+ACF) donde debería observarse aumentada.

En suma, los resultados obtenidos muestran que tanto por vía IP como VO, el MTX logró disminuir el diámetro de la articulación afectada en forma eficiente, como era de esperar. Un efecto similar se observó para el nitroalquenos **B1** administrado por vía IP. La falta de efecto en la administración por VO estaría indicando cierta metabolización a nivel gastrointestinal que disminuye la dosis del fármaco en sangre, volviéndolo inactivo en la dosis ensayada. La ausencia de efecto en el resto de los compuestos pudo deberse a una concentración no adecuada o ineficiente en el modelo ensayado.

Todos los nitroalquenos administrados por VO, mostraron un efecto analgésico en el modelo de nocicepción, que procede mediante la inhibición de la ciclooxigenasa y la posterior producción de prostaglandinas, principalmente la PGE₂ involucrada en la reacción de hiperalgesia. Sólo dos de ellos (**B1** y **G2**) fueron capaces de actuar también como antiinflamatorios, inhibiendo la migración celular hacia el sitio del estímulo inflamatorio.

En el modelo de artritis inducida por ACF, únicamente el derivado *N,N*-dimetil amino **B1** fue capaz de disminuir el grado de lesión a nivel articular cuando fue administrado por vía IP. El compuesto **B1** entonces fue el único que mostró un efecto antiartrítico además de antiinflamatorio y analgésico.

Por último, ninguna de las sustancias probadas afectó la funcionalidad hepática ni renal y la proteína C reactiva se mantuvo en niveles por debajo de lo detectable por el método para todas las condiciones.

Catorce nitroalquenos aromáticos de síntesis sencilla, bajo costo y alto rendimiento se caracterizaron espectrofotométricamente, determinándose su coeficiente de absorptividad a pH 7.4. Los compuestos fueron inicialmente evaluados como agentes antioxidantes frente al radical peroxilo (ROO^\bullet), siendo los compuestos **B1**, **B2** y **G1** los más eficientes.

Todos los nitroalquenos reaccionaron en forma directa con el peroxinitrito anión, modificando su espectro en la mayoría de los casos. Las constantes cinéticas determinadas tanto por un método directo como indirecto, a pH 7.4 y 37 °C fueron del orden de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La estequiometría de la reacción entre los compuestos y el ONOO^- mostró una gran capacidad de los nitroalquenos **F1**, **B1**, **B2** y **G2** para atrapar al oxidante. Todos los derivados de la serie 1 (excepto **G1**) presentaron mayores valores para las constantes cinéticas con respecto a la serie 2, indicando que la ausencia del grupo metilo confiere una reactividad aumentada e independiente al grupo sustituyente en la posición *para*.

La mayoría de los nitroalquenos fueron capaces de proteger a la sonda fluorescente DHR de la oxidación por radicales $^\bullet\text{OH}$ y $^\bullet\text{NO}_2$ derivados del peroxinitrito, siendo los derivados 2-nitroetenilos de la serie 1, los más eficientes.

En resumen, el grupo dador de electrones *N,N*-dimetilamino presente en los compuestos **B1** y **B2**, así como el bioisómero del fenilo **F1** mostraron los valores absolutos más elevados de constante cinética en su reacción con peroxinitrito (6.2 , 5.2 y $4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente) y una mayor capacidad para atrapar los radicales $^\bullet\text{OH}$ y $^\bullet\text{NO}_2$ (58, 59 y 52 %, respectivamente) con respecto al resto de los compuestos.

Los compuestos **B1** y **B2** fueron capaces de reaccionar tanto con el peroxinitrito como con los radicales producto de su descomposición homolítica, $^\bullet\text{NO}_2$ y $^\bullet\text{OH}$, de acuerdo con la constante cinética hallada (6.1 y $5.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente) y los datos obtenidos *in vitro* y en cultivo celular. El compuesto **B2** además reaccionó con los radicales precursores del peroxinitrito $^\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Tanto **B2** como **G2** fueron buenos atrapadores de los radicales precursores del peroxinitrito $^\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Ningun compuesto reaccionó con H_2O_2 en las condiciones ensayadas, siendo el efecto observado en el caso de **B2** y **G2** debido a su capacidad de atrapar la molécula precursora $\text{O}_2^{\bullet-}$.

En presencia del nitroalqueno **B1** se observó una disminución cualitativa de la actividad gelatinasa asociada a la presencia de MMPs para la condición de macrófagos activados y condrocitos en un sistema de co-cultivo. Este efecto sugiere una función protectora del nitroalqueno **B1** frente a un posible daño articular en presencia de un estado proinflamatorio

como el que ocurre durante la artritis reumatoidea. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, este rol protector podría estar relacionado con la captura de alguna de las especies reactivas con las que reacciona **B1**.

Entonces, las características electrón-dador de los grupos sustituyentes en *para N,N*-dimetilamino y dioxol, destacan a los nitroalquenos **B** y **G** como moléculas antioxidantes

Los nitroalquenos **B1**, **B2**, **G1** y **G2** mostraron un efecto analgésico similar a la dipirona y significativamente superior a la situación control en ausencia de tratamiento, cuando fueron probados en un modelo de dolor agudo. Sin embargo, sólo **B1** y **G2** mostraron un efecto antiinflamatorio similar al fármaco de referencia indometacina en un modelo de inflamación aguda.

Los derivados **B** y **G** también fueron buenos inhibidores de COX-1 y COX-2. La COX-1 fue inhibida en un porcentaje menor y similar para todos los compuestos (~20 % para 10 µM y 40 % para 30 µM) en relación a COX-2 (> 50 %). En ésta última se observaron diferencias entre los compuestos, destacándose **B2** con una inhibición del 72 % y 88 % para 10 y 30 µM, respectivamente.

En términos generales el compuesto **B1** fue un buen atrapador de peroxinitrito y sus radicales pero no reaccionó con $\cdot\text{NO}$, efecto deseable pensando en un fármaco de aplicación sistémica. Asimismo por su comportamiento como analgésico, antiinflamatorio y antiartrítico es un buen candidato para otros estudios como candidato a su aplicación como potencial fármaco.

:

7.1 INDICADORES DE ARTRITIS REUMATOIDEA EN PACIENTES

La relación entre los datos clínicos y paraclínicos en individuos afectados con artritis reumatoidea e índices de estrés oxidativo tales como antioxidantes plasmáticos y presencia de anticuerpos contra proteínas modificadas por nitración, se estudió con el fin de desarrollar nuevos estudios paraclínicos capaces de predecir la evolución de la enfermedad.

7.1.1 ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICOS Y PARACLÍNICOS EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA

Se reclutaron un total de 53 pacientes diagnosticados como portadores de AR con una edad promedio de 54.5 años (rango 16.0-79.0 años) al momento de la consulta.

Del total de pacientes, 46 (87 %) pertenecían al sexo femenino, con una mediana para la edad de 55.0 años (rango 20.0-76.0 años), y una mediana de la evolución desde el diagnóstico inicial de 5.0 años (rango 0.1-19.0 años). Los pacientes del sexo masculino fueron 7 (13 %), con una mediana para la edad de 39 años (rango 16-79 años), y para el tiempo de evolución desde el diagnóstico de 3.5 años (rango 0.5-5.5) (**Tabla 5.8**).

Tabla 5.8. Características de la población

Parámetros	Total	Pacientes de Sexo	
		Femenino	Masculino
Casos	53	46	7
Edad (años)	54.5(16.5)	55.0 (15)	39.0 (49.0)
Edad de comienzo (años)	48.7 (17.2)	49.5 (12.0)	35.0 (46.0)
Evolución (años)	5.0 (4.5)	5.0 (3.5)	3.5 (4.5)
DAS28 (*)	3.5 (1.5)	3.2 (1.6)	3.9 (0.5)

(*) Dado que los indicadores analizados no mostraron una distribución normal en el test de Shapiro-Wilk los datos se presentan como medianas y rango intercuartiles (IQR). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres para las variables empleando el test de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas

Si bien en los pacientes de sexo masculino la edad de comienzo fue más temprana (mediana 35.0 años, rango 15.0-73.5 vs. 49.5 años, rango 19.0-71.0), y el índice DAS28 fue mayor, con una mediana de 3.9 (rango 3.7-6.3) vs 3.2 (rango 1.8-6.9) en las pacientes de sexo femenino, no se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas, lo que se podría explicar por el escaso número de pacientes en el grupo del sexo masculino.

Para un análisis más exhaustivo de los parámetros, los pacientes se dividieron en tres categorías de acuerdo al índice DAS28: en remisión (DAS28 <3.2), actividad media (DAS28 3.2-5.1) y actividad alta (DAS28 >5.1) [293].

En el grupo en remisión se encontraron 24 pacientes (mediana de DAS28 2.7, rango 1.8-3.2), en el grupo con actividad media se incluyeron también 24 pacientes (mediana de DAS28 4.0, rango 3.2-5) y 5 con actividad alta (mediana de DAS28 6.5, rango 5.9-6.9) (**Tabla 5.9**). Los otros índices clínicos calculados, CDAI (mediana 16.0, rango 0.0-48.3) y SDAI (mediana 17.7, rango 0.0-92.2), aumentaron con el nivel de actividad de la enfermedad, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas respecto al mismo índice en el estado de remisión de la enfermedad cuando se empleó el test de Kruskal-Wallis (**Tabla 5.9**).

Tabla 5.9. Variación de los parámetros clínicos y paraclínicos según la actividad de la enfermedad calculada como DAS28

Parámetros	En Remisión	Actividad Media	Actividad Alta
Casos	24	24	5
Mujeres	100 %	75 %	80 %
Edad (años)	53.0 (± 16.0)	55.5 (± 20.5)	49.0 (± 12.0)
Evolución (años)	3.5 (± 4.0)	5.8 (± 6.0)	7.5 (± 6.5)
Edad de comienzo (años)	49.0 (± 12.5)	50.8 (± 21.3)	44.0 (± 4.0)
CDAI	10.0 (± 9.0)	19.0 (± 9.5)	41.0 (± 8.0)
SDAI	11.4 (± 10.3)	19.0 (± 9.6)	46.0 (± 2.0)
VES (mm/h)	16.0 (± 9.0)	34.0 (± 27.0)	38.0 (± 15.0)
PCR (mg/L)	6.8 (± 10.3)	9.6 (± 11.6)	11.3 (± 13.3)
FR (UI)	174.4 (± 261.1)	75.7 (± 192.2)	983.0 (± 568.0)
FRAP (mM)	1.0 (± 0.7)	1.3 (± 0.9)	1.2 (± 1.1)
Acido úrico (mg/dL)	3.4 (± 1.5)	3.6 (± 1.8)	4.3 (± 2.8)

(*) Los pacientes se dividieron de acuerdo al índice DAS28 en tres grupos: en remisión (DAS28<3.2), actividad media (DAS28 3.2-5.1) y actividad alta (DAS28>5.1). Los valores se expresan como medianas (IQR).El test de Kruskal-Wallis no arrojó diferencias estadísticamente significativas en el valor de las variables analizadas entre los diferentes estadios de la enfermedad

Estos índices mostraron además una evolución análoga al DAS28 mostrando una importante correlación con éste ($r = 0.65$ y 0.60 , para CDAI y SDAI respectivamente, $p < 0.0001$ en ambos casos) de acuerdo a lo esperable (**Tabla 5.10**).

Por su parte la VES, cuyo valor forma parte del cálculo del DAS 28, se encontró aumentada con respecto al valor de referencia para mujeres (20 mm/h) en los grupos de actividad media y alta de la enfermedad. Mientras que en la fase de remisión se obtuvieron valores de mediana de 16 mm/h (rango 2-40), en la fase de actividad media y alta éstos aumentaron a 34 mm/h (rango 3-79) y 38 mm/h (26-61), respectivamente (**Tabla 5.9**). La contribución de la VES

al valor de DAS28 se apreció también mediante el coeficiente de Spearman $r \sim 0.5$ ($p < 0.001$) (**Tabla 5.10**).

La PCR es un importante índice de inflamación que se mantuvo dentro del rango normal (10-40 mg/L) para toda la población estudiada con una mediana de 8.7 mg/L (rango 0.76-65.7) en los tres grupos analizados.

El FR mostró un importante incremento en el grupo en actividad alta (**Tabla 5.9**), sin embargo su correlación con el DAS28 fue escasa ($r = 0.32$, $p < 0.02$) (**Tabla 5.10**).

Tabla 5.10. Dependencia de DAS28 con las variables evaluadas (*)

Parámetros	r	P
Edad (años)	-0.03	0.81
Evolución (años)	0.32	<0.02
Edad de comienzo (años)	-0.17	0.23
CDAI	0.65	<0.0001
SDAI	0.60	<0.0001
VES	0.48	<0.001
PCR	0.22	0.14
FR	0.32	<0.03
FRAP	0.31	<0.03
Ácido úrico	0.28	0.08

(*) La dependencia de DAS28 con otros índices de artritis se estudió mediante el test de correlación para variables no paramétricas de Spearman

7.1.2 INDICES DE ESTRÉS OXIDATIVO

7.1.2.1 *Determinación de la capacidad antioxidante plasmática*

La generación de especies reactivas a nivel articular es un hecho relevante en la patogénesis de la artritis y su evaluación podría significar una herramienta útil en la valoración de la progresión de la enfermedad. La capacidad antioxidante de una muestra, se emplea habitualmente como medida indirecta de la generación de especies reactivas y como herramienta para evaluar el estado del paciente y/o la muestra. En este caso se determinó utilizando la técnica de FRAP descrita previamente en el punto 4.9.4. La mediana del valor FRAP obtenida para el suero de los pacientes fue 1.1 mM (rango 0.2-4.2). La capacidad antioxidante plasmática fue significativamente diferente entre los pacientes sanos y los pacientes cursando diferentes estadios de la enfermedad (**Figura 5.22**). Sin embargo y a pesar de que ese valor tendió a aumentar con la gravedad de la enfermedad, no se observaron diferencias entre los distintos estadios (**Tabla 5.9**).

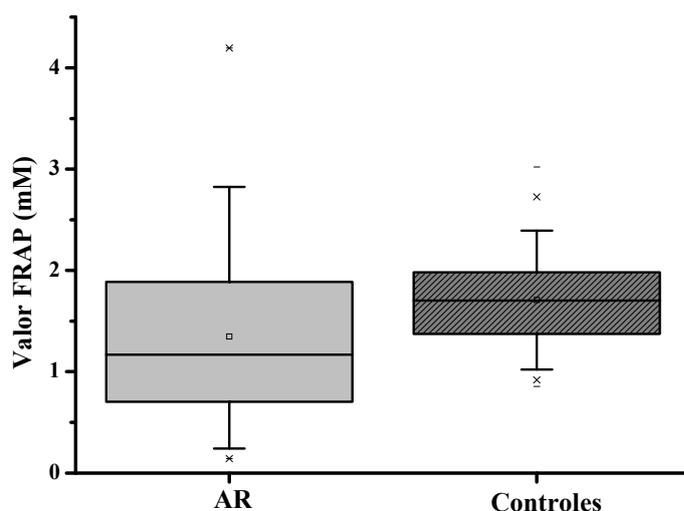


Figura 5.22. Determinación de la capacidad antioxidante de muestras de suero. Se analizaron 116 sueros de pacientes sanos y 82 sueros de pacientes portadores de la enfermedad. Los percentiles 25 y 75 están representados por los bordes inferior y superior de los rectángulos, respectivamente. Las medias están representadas por la línea horizontal que cruza ambos rectángulos, mientras que los percentiles 5 y 95 están representados por los segmentos inferior y superior respectivamente

7.1.2.2 *Determinación del título de anticuerpos anti-NO₂Y en pacientes con AR*

Para la titulación de los anticuerpos anti-NO₂Y en suero se empleó el ELISA de competencia descrito en [333, 334] y se puso a punto un sándwich ELISA empleando KLH nitrada como blanco, como se describió en los puntos 4.9.5.1 y 4.9.5.2, respectivamente. A pesar de ello, no se detectaron niveles significativos de anticuerpos en ninguna de las muestras ensayadas.

Los diferentes índices empleados para valorar la evolución clínica de la AR se correlacionaron significativamente entre sí, lo que resalta la utilidad de índices sencillos como el SDAI y en particular el CDAI, para valorar el nivel de actividad de la enfermedad en el paciente artrítico. Este último es índice rápido, económico y fiable ya que requiere únicamente una correcta evaluación clínica sin la necesidad de instrumental especializado o análisis clínicos costosos tanto para el paciente como para el sistema de salud. Además, la VES, un estudio económico y sencillo de realizar, correlacionó con el grado de severidad de la enfermedad, apoyando la utilidad de este parámetro como indicador del grado evolutivo y por ende de la severidad de la enfermedad.

La PCR se mantuvo dentro de valores normales en la mayoría de los pacientes y no correlacionó con el índice DAS28. Por su lado, el FR y el nivel de antioxidantes en suero tampoco mostraron correlación con el grado de actividad de la enfermedad. Si bien existen múltiples evidencias sobre rol de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la

patogénesis del proceso inflamatorio articular [154], esto no se vió reflejando en los valores de capacidad antioxidante plasmática determinados. Se requiere de un estudio más exhaustivo, que incluya más muestras y otras técnicas asociadas.

8 OBJETIVO 2 – CONCLUSIONES

El estudio de los parámetros clínicos y paraclínicos confirmó que los índices DAS28, SDAI, CDAI y VES empleados actualmente para valorar la evolución clínica de la AR se correlacionaron significativamente entre sí, mientras que tanto la PCR y el FR no mostraron ninguna relación en ese sentido.

Los parámetros de estrés oxidativo planteados aquí como posibles nuevos biomarcadores para su aplicación en la clínica no mostraron resultados positivos. La capacidad antioxidante plasmática discriminó entre pacientes sanos y enfermos pero su sensibilidad no fue suficiente para diferenciar estadios de la enfermedad y tampoco se logró la detección de anticuerpos anti-nitrotirosina en el suero de los pacientes afectados.

9 PERSPECTIVAS

- Evaluar los nitroalquenos como inhibidores de NOS2, ya que sería deseable un efecto sobre la liberación de óxido nítrico en los macrófagos activados más que un atrapamiento a nivel sistémico del NO .
- Evaluar la mutagenicidad de los compuestos mediante test de Ames pensando en su potencial uso como fármaco.
- Estudiar el efecto del agregado conjunto de nitroalquenos con MTX en un modelo de artritis y sus posibles vías de metabolización.
- Estudiar el efecto de estos compuestos sobre las distintas vías de señalización mediadas por los factores NF- κ B, PPAR γ y Nrf2.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Lane, N., *Oxygen. The molecule that made the world*. 2002: Oxford University Press.
2. Niki, E., *Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(4): p. 503-15.
3. Sies, H. and E. Cadenas, *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1985. **311**(1152): p. 617-31.
4. Jones, D.P., *Redefining oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1865-79.
5. Inoue, M., et al., *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life*. Curr Med Chem, 2003. **10**(23): p. 2495-505.
6. Koppula, S., et al., *Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 823902.
7. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
8. Muir Wood, P., *The redox potential of the system oxygen--superoxide*. FEBS Lett, 1974. **44**(1): p. 22-4.
9. Boveris, A., *Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 429-35.
10. Fridovich, I., *Overview: biological sources of O₂*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 59-61.
11. Gonzalez, F.J., *Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1*. Mutat Res, 2005. **569**(1-2): p. 101-10.
12. Harrison, R., *Physiological roles of xanthine oxidoreductase*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 363-75.
13. Schrader, M. and H.D. Fahimi, *Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(4): p. 383-93.
14. Manea, A., *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology*. Cell and Tissue Research, 2010. **342**: p. 325-339.
15. Koppenol, W.H., et al., *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(6): p. 834-42.
16. Rees, D.D., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(9): p. 3375-8.
17. Marletta, M.A., et al., *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry, 1988. **27**(24): p. 8706-11.
18. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
19. Alvarez, M.N., et al., *Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys, 2004. **432**(2): p. 222-32.
20. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
21. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
22. Radi, R., et al., *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(5): p. 463-88.
23. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2003. **1**(1): p. 91-106.
24. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures*. Physiol Rev, 1998. **78**(2): p. 547-81.

25. Winterbourn, C.C., et al., *Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39860-9.
26. Liu, Q. and S.S. Gross, *Binding sites of nitric oxide synthases*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 311-24.
27. Beckman, J.S., *The physiological and pathological chemistry of nitric oxide*, in *Nitric Oxide: Principles and actions*, J.R.J. Lancaster, Editor. 1996, Academic Press: San Diego. p. 1-82.
28. Porterfield, D.M., et al., *Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(4): p. L904-12.
29. Bellamy, T.C., C. Griffiths, and J. Garthwaite, *Differential sensitivity of guanylyl cyclase and mitochondrial respiration to nitric oxide measured using clamped concentrations*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31801-7.
30. Villanueva, C. and C. Giulivi, *Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(3): p. 307-16.
31. Moncada, S., *Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine*. J R Soc Med, 1999. **92**(4): p. 164-9.
32. Chambliss, K.L. and P.W. Shaul, *Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 665-86.
33. Harris, M.B., et al., *Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(1): p. H333-40.
34. Buchwalow, I.B., et al., *Compartmentalization of NO signaling cascade in skeletal muscles*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **330**(2): p. 615-21.
35. Ricciardolo, F.L., et al., *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 731-65.
36. Roman, L.J., P. Martasek, and B.S. Masters, *Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity*. Chem Rev, 2002. **102**(4): p. 1179-90.
37. Ogawa, T., M. Kimoto, and K. Sasaoka, *Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney*. J Biol Chem, 1989. **264**(17): p. 10205-9.
38. Tsikas, D., et al., *Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox*. FEBS Lett, 2000. **478**(1-2): p. 1-3.
39. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
40. Radi, R., et al., *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4244-50.
41. Lancaster, J.R., Jr., *Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8137-41.
42. Denicola, A., et al., *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*. Arch Biochem Biophys, 1996. **333**(1): p. 49-58.
43. Goldstein, S. and G. Czapski, *The reaction of NO. with O2.- and HO2.: a pulse radiolysis study*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(4): p. 505-10.
44. Kissner, R., et al., *Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(11): p. 1285-92.
45. Huie, R.E. and S. Padmaja, *The reaction of no with superoxide*. Free Radic Res Commun, 1993. **18**(4): p. 195-9.

46. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 662-80.
47. Loegager, T.a.S., K., *Formation and decay of peroxynitrous acid: a pulse radiolysis study*. J. Phys. Chem., 1993. **97**(25): p. 6664-6669.
48. Alvarez, B., G. Ferrer-Sueta, and R. Radi, *Slowing of peroxynitrite decomposition in the presence of mannitol and ethanol*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(7-8): p. 1331-7.
49. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi, *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3566-71.
50. Ferrer-Sueta, G., et al., *Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27432-8.
51. Castro, L., M. Rodriguez, and R. Radi, *Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29409-15.
52. Floris, R., et al., *Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase*. Eur J Biochem, 1993. **215**(3): p. 767-75.
53. Trujillo, M., et al., *Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite*. Subcell Biochem, 2007. **44**: p. 83-113.
54. Trujillo, M., et al., *Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34175-82.
55. Quijano, C., et al., *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups*. Biochem J, 1997. **322 (Pt 1)**: p. 167-73.
56. Masumoto, H., et al., *Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite*. FEBS Lett, 1996. **398**(2-3): p. 179-82.
57. Padmaja, S., G.L. Squadrito, and W.A. Pryor, *Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 1998. **349**(1): p. 1-6.
58. Briviba, K., et al., *Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(12): p. 1398-401.
59. Uppu, R.M. and W.A. Pryor, *Carbon dioxide catalysis of the reaction of peroxynitrite with ethyl acetoacetate: an example of aliphatic nitration by peroxynitrite*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(3): p. 764-9.
60. Bonini, M.G., et al., *Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10802-6.
61. Merenyi, G. and J. Lind, *Free radical formation in the peroxynitrous acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO-) system*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(4): p. 243-6.
62. Lemercier, J.N., et al., *Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 1997. **345**(1): p. 160-70.
63. Pryor, W.A., et al., *The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxynitrite*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(2): p. 331-8.
64. Rudolph, V., et al., *Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1461-73.
65. 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*. Radiat Res, 1973. **56**(1): p. 40-7.
66. Lyman, S.V. and J.K. Hurst, *Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants*. Chem Res Toxicol, 1995. **8**(6): p. 833-40.
67. Pryor, W.A., X. Jin, and G.L. Squadrito, *One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11173-7.
68. Radi, R., *Peroxynitrite reactions and diffusion in biology*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(7): p. 720-1.
69. Ferrer-Sueta, G. and R. Radi, *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals*. ACS Chem Biol, 2009. **4**(3): p. 161-77.

70. Ischiropoulos, H., et al., *Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 431-7.
71. Ramezani, M.S., S. Padmaja, and W.H. Koppenol, *Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite*. Methods Enzymol, 1996. **269**: p. 195-201.
72. van der Vliet, A., et al., *Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look*. Arch Biochem Biophys, 1995. **319**(2): p. 341-9.
73. Prutz, W.A., et al., *Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins*. Arch Biochem Biophys, 1985. **243**(1): p. 125-34.
74. Hunter, E.P., M.F. Desrosiers, and M.G. Simic, *The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization*. Free Radic Biol Med, 1989. **6**(6): p. 581-5.
75. Ischiropoulos, H., *Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species*. Arch Biochem Biophys, 1998. **356**(1): p. 1-11.
76. van der Vliet, A., et al., *Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7617-25.
77. Estevez, A.G., et al., *Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture*. Prog Brain Res, 1998. **118**: p. 269-80.
78. Trostchansky, A., et al., *Nitro-Fatty Acids: Formation, Redox Signaling, and Therapeutic Potential*. Antioxid Redox Signal, 2012.
79. Gallon, A.A. and W.A. Pryor, *The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen*. Lipids, 1994. **29**(3): p. 171-6.
80. O'Donnell, V.B. and B.A. Freeman, *Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease*. Circ Res, 2001. **88**(1): p. 12-21.
81. Radi, R.D., A.; Alvarez, B.; Ferrer, G.; Rubbo, H., *The biological chemistry of peroxynitrite*. , ed. A. Press. 2000, San Diego. 57-82.
82. Cui, T., et al., *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
83. Ferreira, A.M., et al., *Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrooleate*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 223-34.
84. Hickman-Davis, J.M., et al., *Killing of Klebsiella pneumoniae by human alveolar macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(5): p. L944-56.
85. De Groote, M.A., et al., *Periplasmic superoxide dismutase protects Salmonella from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13997-4001.
86. Alvarez, M.N., M. Trujillo, and R. Radi, *Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide*. Methods Enzymol, 2002. **359**: p. 353-66.
87. Cassatella, M.A., et al., *Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20241-6.
88. Dewas, C., et al., *TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4392-8.
89. Vodovotz, Y., et al., *Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2914-25.
90. Marla, S.S., J. Lee, and J.T. Groves, *Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14243-8.
91. Romero, N., et al., *Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(1): p. 23-30.

92. Crow, J.P., *Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species*. Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 145-57.
93. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(1): p. 125-6.
94. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
95. Petersen, S.V., et al., *Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13705-10.
96. Fridovich, I., *Antioxidant enzymes*, in *Redox biochemistry*, R. Banerjee, Editor. 2007, Wiley-Interscience: Michigan. p. 49-131.
97. Sies, H., *Glutathione and its role in cellular functions*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 916-21.
98. Poole, L.T.C.M.o.P.I.F., L.; Harris, JR., editors. and S.N.Y.p. 61-81., *The Catalytic Mechanism of Peroxiredoxins*, in *Peroxiredoxin Systems*, L.H. Flohé, JR., , Editor. 2007: New York. p. 61-81.
99. Hall, A., P.A. Karplus, and L.B. Poole, *Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions*. Febs J, 2009. **276**(9): p. 2469-77.
100. Barycki, J.J., *Antioxidant molecules and redox cofactors*, in *Redox biochemistry*, R. Banerjee, Editor. 2007, Wiley Interscience: Michigan. p. 11-21.
101. Asard, H., *Antioxidant molecules and redox cofactors*, in *Redox Biochemistry*, R. Banerjee, Editor. 2007, Wiley- Interscience: Michigan. p. 22-26.
102. Frei, B., et al., *Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma*. Adv Exp Med Biol, 1990. **264**: p. 155-63.
103. Stone, J.M.a.W., M.A., *Antioxidants molecules and redox cofactors*, in *Redox biochemistry*, R. Banerjee, Editor. 2007, Wiley-Interscience: Michigan. p. 27-34.
104. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell Signal, 2012. **24**(5): p. 981-90.
105. Rovira, I.I.a.F., T., *Reactive oxygen, nitrogen and thiol-based signal transduction*, in *Redox Biochemistry*, R. Banerjee, Editor. 2007, Wiley- Interscience: Michigan. p. 136-148.
106. Roos, G. and J. Messens, *Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 314-26.
107. Bult, H., et al., *Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter*. Nature, 1990. **345**(6273): p. 346-7.
108. Tonks, N.K., *Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling*. Cell, 2005. **121**(5): p. 667-70.
109. Pastore, A. and F. Piemonte, *S-Glutathionylation signaling in cell biology: progress and prospects*. Eur J Pharm Sci, 2012. **46**(5): p. 279-92.
110. Yoon, J.H. and S.J. Baek, *Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties*. Yonsei Med J, 2005. **46**(5): p. 585-96.
111. Costa, G., et al., *Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery*. Curr Med Chem, 2012. **19**(18): p. 2876-900.
112. Santangelo, C., et al., *Polyphenols, intracellular signalling and inflammation*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 394-405.
113. Kabe, Y., et al., *Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(3-4): p. 395-403.
114. Manna, S.K., A. Mukhopadhyay, and B.B. Aggarwal, *Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and*

- apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation.* J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6509-19.
115. Huxford, T. and G. Ghosh, *A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(3): p. a000075.
 116. Barkett, M. and T.D. Gilmore, *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6910-24.
 117. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.* Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
 118. Shishodia, S. and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer?* Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 1071-80.
 119. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling.* Cell Res, 2011. **21**(1): p. 103-15.
 120. Wang, T., X. Zhang, and J.J. Li, *The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses.* Int Immunopharmacol, 2002. **2**(11): p. 1509-20.
 121. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1.* Embo J, 1991. **10**(8): p. 2247-58.
 122. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later.* Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
 123. Jamaluddin, M., et al., *TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway.* Cell Signal, 2007. **19**(7): p. 1419-33.
 124. Siomek, A., *NF-kappaB signaling pathway and free radical impact.* Acta Biochim Pol, 2012. **59**(3): p. 323-31.
 125. Disch, D.L., et al., *Transcriptional control of a nuclear gene encoding a mitochondrial fatty acid oxidation enzyme in transgenic mice: role for nuclear receptors in cardiac and brown adipose expression.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4043-51.
 126. Fatehi-Hassanabad, Z. and C.B. Chan, *Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic beta-cell function.* Nutr Metab (Lond), 2005. **2**(1): p. 1.
 127. Becker, J., et al., *Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases?* Fundam Clin Pharmacol, 2006. **20**(5): p. 429-47.
 128. Li, A.C. and W. Palinski, *Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 1-39.
 129. Duval, C., J.C. Fruchart, and B. Staels, *PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation.* Arch Mal Coeur Vaiss, 2004. **97**(6): p. 665-72.
 130. Favreau, L.V. and C.B. Pickett, *The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines.* J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 24468-74.
 131. Rushmore, T.H. and C.B. Pickett, *Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants.* J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14648-53.
 132. Chan, K. and Y.W. Kan, *Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12731-6.
 133. Kim, Y.C., et al., *Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors.* J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18399-406.
 134. Inamdar, N.M., Y.I. Ahn, and J. Alam, *The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition*

- sequences for MAF and NF-E2 transcription factors.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(3): p. 570-6.
135. Hail, N., Jr., et al., *Cancer chemoprevention: a radical perspective.* Free Radic Biol Med, 2008. **45**(2): p. 97-110.
 136. Schonhaler, H.B., J. Guinea-Viniegra, and E.F. Wagner, *Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway.* Ann Rheum Dis, 2011. **70 Suppl 1**: p. i109-12.
 137. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16483-6.
 138. Erdelyi, K., et al., *Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells.* Mol Pharmacol, 2005. **68**(3): p. 895-904.
 139. Guzik, T.J., R. Korbout, and T. Adamek-Guzik, *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.* J Physiol Pharmacol, 2003. **54**(4): p. 469-87.
 140. Zamora, R., Y. Vodovotz, and T.R. Billiar, *Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases.* Mol Med, 2000. **6**(5): p. 347-73.
 141. Robinson, D., et al., *IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB.* Immunity, 1997. **7**(4): p. 571-81.
 142. Lafalle, J.J., *The role of helper T-cell subset in autoimmune diseases.* Cytokine and Growth Factor Reviews, 1998. **9**(2): p. 139-151.
 143. Moudgil, K.D. and D. Choubey, *Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment.* J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(10): p. 695-703.
 144. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.* Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
 145. Lubberts, E., *Th17 cytokines and arthritis.* Semin Immunopathol, 2010. **32**(1): p. 43-53.
 146. Afzali, B., et al., *The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease.* Clin Exp Immunol, 2007. **148**(1): p. 32-46.
 147. Szekanecz, Z. and A.E. Koch, *Macrophages and their products in rheumatoid arthritis.* Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(3): p. 289-95.
 148. Wadsworth, T.L. and D.R. Koop, *Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide.* Chem Biol Interact, 2001. **137**(1): p. 43-58.
 149. Moon, M.K., et al., *Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells.* Biol Pharm Bull, 2009. **32**(8): p. 1371-7.
 150. Donnelly, L.E., et al., *Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(4): p. L774-83.
 151. Morikawa, K., et al., *Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats.* Life Sci, 2003. **74**(6): p. 709-21.
 152. Kim, H.Y., et al., *Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia.* J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6072-9.
 153. Carluccio, M.A., et al., *Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 622-9.
 154. McInnes, I., B. and Schett, G., *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.* The New England Journal of Medicine, 2011. **365**(23): p. 2205-2219.
 155. Aletaha, D., et al., *2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(9): p. 1580-8.

156. Stanich, J.A.C., J.D.; Whittum-Hudson, J. and Hudson, A.P., *Rheumatoid arthritis: Disease or syndrome?* Rheumatology Research and Reviews, 2009. **1**: p. 179-192.
157. Ramagli, A.C., F.; Piñeiro, N., *Tratamiento de la artritis reumatoidea con antiTNF. Experiencia en Uruguay.* Archivos de Medicina Interna, 2012. **34**(1): p. 38-41.
158. Myasoedova, E., et al., *Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007.* Arthritis Rheum, 2010. **62**(6): p. 1576-82.
159. Myasoedova, E., et al., *Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality.* Curr Rheumatol Rep, 2011. **12**(5): p. 379-85.
160. Klareskog, L., A.I. Catrina, and S. Paget, *Rheumatoid arthritis.* Lancet, 2009. **373**(9664): p. 659-72.
161. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. 249.
162. Firestein, G.S., *Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis*, in *Kelley's Textbook of Rheumatology*, B.R. Harris ED, Genovese MC, Firestein GS, Sargent JS, Sledge and CB., Editors. 2005, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. Capítulo 65.
163. Scott, D.L., F. Wolfe, and T.W. Huizinga, *Rheumatoid arthritis.* Lancet, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
164. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies.* Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.
165. Murphy, G. and H. Nagase, *Progress in matrix metalloproteinase research.* Mol Aspects Med, 2008. **29**(5): p. 290-308.
166. Isaacs, J.D., *The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all?* Nat Rev Immunol. **10**(8): p. 605-11.
167. Lark, M.W., et al., *Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints.* J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 93-106.
168. Smith, R.L., *Degradative enzymes in osteoarthritis.* Front Biosci, 1999. **4**: p. D704-12.
169. Fosang, A.J., et al., *Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain.* FEBS Lett, 1998. **430**(3): p. 186-90.
170. Andersson, A.K., C. Li, and F.M. Brennan, *Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2008. **10**(2): p. 204.
171. Ohmori, H., et al., *Immunogenicity of autologous IgG bearing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine.* Immunol Lett, 2005. **96**(1): p. 47-54.
172. Abeles, A.M. and M.H. Pillinger, *The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases.* Bull NYU Hosp Jt Dis, 2006. **64**(1-2): p. 20-4.
173. Ospelt, C. and S. Gay, *The role of resident synovial cells in destructive arthritis.* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008. **22**(2): p. 239-52.
174. Aupperle, K.R., et al., *Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene.* Am J Pathol, 1998. **152**(4): p. 1091-8.
175. Mantovani, A., *Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas.* Blood, 2006. **108**(2): p. 408-409.
176. Cascao, R., et al., *Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(8): p. 531-5.
177. Nigrovic, P.A. and D.M. Lee, *Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis.* Immunol Rev, 2007. **217**: p. 19-37.
178. Morko, J., et al., *Overexpression of cathepsin K accelerates the resorption cycle and osteoblast differentiation in vitro.* Bone, 2009. **44**(4): p. 717-28.
179. Sabeh, F., D. Fox, and S.J. Weiss, *Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function.* J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6396-406.

180. Dreier, R., et al., *Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade*. *Exp Cell Res*, 2004. **297**(2): p. 303-12.
181. Gravallese, E.M., et al., *Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(4): p. 943-51.
182. Schett, G. and S.L. Teitelbaum, *Osteoclasts and arthritis*. *J Bone Miner Res*, 2009. **24**(7): p. 1142-6.
183. Lebre, M.C. and P.P. Tak, *Dendritic cell subsets: their roles in rheumatoid arthritis*. *Acta Reumatol Port*, 2008. **33**(1): p. 35-45.
184. de la Fuente, H., D. Cibrian, and F. Sanchez-Madrid, *Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(18): p. 2897-905.
185. Liu, Y. and C.A. Janeway, Jr., *Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(9): p. 3845-9.
186. Dorner, T. and P.E. Lipsky, *B-cell targeting: a novel approach to immune intervention today and tomorrow*. *Expert Opin Biol Ther*, 2007. **7**(9): p. 1287-99.
187. Roll, P., et al., *Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(8): p. 2377-86.
188. Willemze, A., et al., *New biomarkers in rheumatoid arthritis*. *Neth J Med*, 2012. **70**(9): p. 392-9.
189. Nell, V.P., et al., *Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(12): p. 1731-6.
190. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(2): p. 380-6.
191. Wernick, R.M., et al., *IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures*. *Arthritis Rheum*, 1985. **28**(7): p. 742-52.
192. Tighe, H., et al., *Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mice*. *J Exp Med*, 1993. **177**(1): p. 109-18.
193. Schellekens, G.A., et al., *The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 155-63.
194. Forslind, K., et al., *Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP)*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(9): p. 1090-5.
195. van der Helm-van Mil, A.H., et al., *The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(4): p. 1117-21.
196. Kinloch, A., et al., *Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(6): p. R1421-9.
197. Terato, K., et al., *Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(10): p. 1493-500.
198. Dejaco, C., et al., *Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(4): p. R119.
199. Vander Cruyssen, B., et al., *Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(4): p. R122.
200. Gyorgy, B., et al., *Citrullination: a posttranslational modification in health and disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. **38**(10): p. 1662-77.

201. Reparón-Schuijt, C.C., et al., *Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(1): p. 41-7.
202. Vossenaar, E.R., et al., *Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(9): p. 2489-500.
203. Shi, J., et al., *Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(42): p. 17372-7.
204. Jaisson, S., C. Pietrement, and P. Gillery, *Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis*. *Clin Chem*, 2011. **57**(11): p. 1499-505.
205. Wynckel, A., et al., *Kinetics of carbamylated haemoglobin in acute renal failure*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(8): p. 1183-8.
206. Wang, Z., et al., *Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis*. *Nat Med*, 2007. **13**(10): p. 1176-84.
207. Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte, *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(3): p. 741-4.
208. Chiurchiu, V. and M. Maccarrone, *Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **15**(9): p. 2605-41.
209. Paredes, S., et al., *Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers*. *J Rheumatol*, 2002. **29**(11): p. 2271-7.
210. De Pablo, P., T. Dietrich, and E.W. Karlson, *Antioxidants and other novel cardiovascular risk factors in subjects with rheumatoid arthritis in a large population sample*. *Arthritis Rheum*, 2007. **57**(6): p. 953-62.
211. Goldring, S.R., *Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2002. **14**(4): p. 406-10.
212. Afonso, V., et al., *Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases*. *Joint Bone Spine*, 2007. **74**(4): p. 324-9.
213. Yu, D.H., et al., *Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis*. *Exp Mol Med*, 2012. **44**(9): p. 529-35.
214. Baker, M.S., J. Feigan, and D.A. Lowther, *The mechanism of chondrocyte hydrogen peroxide damage. Depletion of intracellular ATP due to suppression of glycolysis caused by oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *J Rheumatol*, 1989. **16**(1): p. 7-14.
215. Filippin, L.I., et al., *Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **152**(3): p. 415-22.
216. Stamp, L.K., et al., *Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2012. **51**(10): p. 1796-803.
217. Green, S.P., M.S. Baker, and D.A. Lowther, *Depolymerization of synovial fluid hyaluronic acid (HA) by the complete myeloperoxidase (MPO) system may involve the formation of a HA-MPO ionic complex*. *J Rheumatol*, 1990. **17**(12): p. 1670-5.
218. Deguchi, H., et al., *Nitroxides prevent exacerbation of indomethacin-induced gastric damage in adjuvant arthritis rats*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(9): p. 1799-805.
219. Cuzzocrea, S., et al., *Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(2): p. 320-8.
220. Cuzzocrea, S., et al., *Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(12): p. 3755-60.

221. Cuzzocrea, S., et al., *Effects of combination M40403 and dexamethasone therapy on joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(6): p. 1929-40.
222. van't Hof, R.J. and S.H. Ralston, *Nitric oxide and bone*. *Immunology*, 2001. **103**(3): p. 255-61.
223. St Clair, E.W., et al., *Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients*. *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 1173-8.
224. Salvemini, D., et al., *Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(15): p. 7240-4.
225. Abramson, S.B., *Osteoarthritis and nitric oxide*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. **16 Suppl 2**: p. S15-20.
226. Stefanovic-Racic, M., et al., *Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis*. *J Rheumatol*, 1995. **22**(10): p. 1922-8.
227. Oh, M., et al., *Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(11): p. 2169-74.
228. Bar-Shai, M. and A.Z. Reznick, *Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappaB-mediated protein degradation in skeletal muscle cells*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(12): p. 2112-25.
229. Henrotin, Y.E., P. Bruckner, and J.P. Pujol, *The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(10): p. 747-55.
230. Yudoh, K., et al., *Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(2): p. R380-91.
231. Gelderman, K.A., et al., *Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(10): p. 1541-67.
232. Salmon, M. and J.S. Gaston, *The role of T-lymphocytes in rheumatoid arthritis*. *Br Med Bull*, 1995. **51**(2): p. 332-45.
233. Wagner, U., et al., *Clonally expanded CD4+CD28null T cells in rheumatoid arthritis use distinct combinations of T cell receptor BV and BJ elements*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(1): p. 79-84.
234. Griffiths, H.R., *Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease?* *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(7): p. 544-9.
235. Uesugi, M., K. Yoshida, and H.E. Jasin, *Inflammatory properties of IgG modified by oxygen radicals and peroxynitrite*. *J Immunol*, 2000. **165**(11): p. 6532-7.
236. Loeser, R.F., et al., *Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(9): p. 2349-57.
237. Nakagawa, T., et al., *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(9): p. 2486-94.
238. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(12): p. 4003-8.
239. Klocke, R., et al., *Inactivation of xanthine oxidoreductase is associated with increased joint swelling and nitrotyrosine formation in acute antigen-induced arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2005. **23**(3): p. 345-50.

240. Nemirovskiy, O.V., et al., *Plasma 3-nitrotyrosine is a biomarker in animal models of arthritis: Pharmacological dissection of iNOS' role in disease*. Nitric Oxide, 2009. **20**(3): p. 150-6.
241. Khan, F. and A.A. Siddiqui, *Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus*. Clin Chim Acta, 2006. **370**(1-2): p. 100-7.
242. Nissim, A., et al., *Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(12): p. 3829-38.
243. Griffiths, H.R., et al., *Homocysteine from endothelial cells promotes LDL nitration and scavenger receptor uptake*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(3): p. 488-500.
244. Funk, C.D. and G.A. FitzGerald, *COX-2 inhibitors and cardiovascular risk*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(5): p. 470-9.
245. Bijlsma, J.W., *Disease control with glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51 Suppl 4**: p. iv9-13.
246. Gispen, J.G., et al., *Toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1987. **14**(1): p. 74-9.
247. Hernandez, A.G., *Tratado de Nutrición: Nutrición clínica*. Segunda Edición ed. Vol. IV. 2012: Editorial Médica Panamericana.
248. Barón, M.G., *Tratado de Medicina Paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cancer*. Segunda Edición ed, ed. J.F. Ed. A. Ordoñez, P.Zamora y E. Espinosa. 2007: Editorial Médica Panamericana.
249. Smolen, J.S., Robert Landewé, Ferdinand C Breedveld, Maxime Dougados, Paul, et al., *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs*. Annals of the rheumatic diseases - The EULAR journal, 2010. **69**: p. 964-975.
250. Klareskog, L., et al., *Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial*. Lancet, 2004. **363**(9410): p. 675-81.
251. Antoni, C. and J. Braun, *Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge*. Clin Exp Rheumatol, 2002. **20**(6 Suppl 28): p. S152-7.
252. Pisetsky, D.S. and M.M. Ward, *Advances in the treatment of inflammatory arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012. **26**(2): p. 251-61.
253. Singh, J.A., et al., *Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(2): p. CD008794.
254. Jackson, J.K., et al., *The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis*. Inflamm Res, 2006. **55**(4): p. 168-75.
255. Fumarulo, R., et al., *Retinoids inhibit the respiratory burst and degranulation of stimulated human polymorphonuclear leukocytes*. Agents Actions, 1991. **34**(3-4): p. 339-44.
256. Nozaki, Y., et al., *Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis*. Clin Immunol, 2006. **119**(3): p. 272-9.
257. Kroger, H., et al., *Suppression of type II collagen-induced arthritis by N-acetyl-L-cysteine in mice*. Gen Pharmacol, 1997. **29**(4): p. 671-4.
258. De Bandt, M., et al., *Vitamin E uncouples joint destruction and clinical inflammation in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(2): p. 522-32.
259. Karlson, E.W., et al., *Vitamin E in the primary prevention of rheumatoid arthritis: the Women's Health Study*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(11): p. 1589-95.
260. Edmonds, S.E., et al., *Putative analgesic activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis. Results of a prospective placebo controlled double blind trial*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(11): p. 649-55.

261. Pattison, D.J., et al., *Vitamin C and the risk of developing inflammatory polyarthritis: prospective nested case-control study*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(7): p. 843-7.
262. Pattison, D.J., et al., *Dietary beta-cryptoxanthin and inflammatory polyarthritis: results from a population-based prospective study*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(2): p. 451-5.
263. Baker, L.M., et al., *Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(42): p. 31085-93.
264. Batthyany, C., et al., *Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20450-63.
265. Schopfer, F.J., et al., *Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(7): p. 2340-5.
266. Trostchansky, A., et al., *Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate*. *Biochemistry*, 2007. **46**(15): p. 4645-53.
267. Villacorta, L., et al., *Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(1): p. H770-6.
268. Aguirre, G., et al., *Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds*. *Bioorg Med Chem*, 2005. **13**(23): p. 6324-35.
269. Gorczynski, M.J., et al., *Evaluation of nitroalkenes as nitric oxide donors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(7): p. 2013-7.
270. Brian, P.W., J.F. Grove, and G.J. Mc, *Fungistatic activity of ethylenic and acetylenic compounds*. *Nature*, 1946. **158**(4024): p. 876.
271. Hoover, F.W. and H.B. Hass, *Synthesis of paredrine and related compounds*. *J Org Chem*, 1947. **12**(4): p. 501-5.
272. Frache, R., *Diseño, síntesis y evaluación biológica de nitroalquenos y nitroalcanos como potenciales agentes antioxidantes*, in *Laboratorio de Química Orgánica - Facultad de Ciencias*. 2011, Universidad de la República: Montevideo-Uruguay. p. 79.
273. Plenevaux, A., et al., *Synthesis of (R)-(-)- and (S)-(+)-4-fluorodeprenyl and (R)-(-)- and (S)-(+)-[N-11C-methyl]-4-fluorodeprenyl and positron emission tomography studies in baboon brain*. *J Med Chem*, 1990. **33**(7): p. 2015-9.
274. Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(10): p. 4619-26.
275. Saha, A., et al., *Determination of optimal conditions for synthesis of peroxyxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(4): p. 653-9.
276. Hughes, M.N.a.N.H.G., *The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical* 1968: p. 450-452.
277. Thomson, L., et al., *Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxyxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **319**(2): p. 491-7.
278. Schellenberg, K.A. and L. Hellerman, *Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide*. *J Biol Chem*, 1958. **231**(1): p. 547-56.
279. Massey, V., *The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c*. *Biochim Biophys Acta*, 1959. **34**: p. 255-6.
280. Kooy, N.W., et al., *Peroxyxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123*. *Free Radic Biol Med*, 1994. **16**(2): p. 149-56.
281. Kojima, H., et al., *Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1999. **38**(21): p. 3209-3212.

282. Winterbourn, C.C., *Oxidative reactions of hemoglobin*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 265-72.
283. Nishizuka, Y., *Studies and perspectives of protein kinase C*. Science, 1986. **233**(4761): p. 305-12.
284. Jiang, Z.Y., J.V. Hunt, and S.P. Wolff, *Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein*. Anal Biochem, 1992. **202**(2): p. 384-9.
285. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
286. Dreier, R., et al., *Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9)*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 21): p. 3813-22.
287. Dehm, P.a.P., D.J., *Synthesis and extrusion of collagen by freshly isolated cells from chick embryo tendon*. Biochimica et Biophysica Acta, 1971. **240**: p. 358-369.
288. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
289. Collier, H.O., et al., *The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse*. Br J Pharmacol Chemother, 1968. **32**(2): p. 295-310.
290. Griswold, D.E., et al., *SK&F 86002: a structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipoxygenase- and cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid*. Biochem Pharmacol, 1987. **36**(20): p. 3463-70.
291. Newbould, B.B., *Chemotherapy of Arthritis Induced in Rats by Mycobacterial Adjuvant*. Br J Pharmacol Chemother, 1963. **21**: p. 127-36.
292. Leeb, B.F., et al., *Disease activity measurement of rheumatoid arthritis: Comparison of the simplified disease activity index (SDAI) and the disease activity score including 28 joints (DAS28) in daily routine*. Arthritis Rheum, 2005. **53**(1): p. 56-60.
293. Aletaha, D. and J. Smolen, *The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(5 Suppl 39): p. S100-8.
294. Wells, G., et al., *Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(6): p. 954-60.
295. Aletaha, D., et al., *Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2625-36.
296. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
297. Brito, C., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.
298. Butler, J.E., *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, in *Methods in Nonradioactive Detection*, H. GC, Editor. 1993, Appleton & Lange.
299. Wiedermann, F.J., et al., *Prospective observational study of antiphospholipid antibodies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: comparison with catastrophic antiphospholipid syndrome*. Lupus, 2003. **12**(6): p. 462-7.
300. Merlino, A., et al., *2-Benzyl-2-methyl-2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: Spectroscopic and theoretical study*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2007. **67**(2): p. 540-9.
301. Prior, R.L., X. Wu, and K. Schaich, *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(10): p. 4290-302.

302. Prior, R.L. and G. Cao, *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(11-12): p. 1173-81.
303. Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(1): p. 48-54.
304. Morrison, R.T.B., R.N. , *Química Orgánica*. 1998, México D.F: Addison Wesley Longman de México S.A. 898-899.
305. Radi, R., *Kinetic analysis of reactivity of peroxy nitrite with biomolecules*. Methods Enzymol, 1996. **269**: p. 354-66.
306. Alvarez, B., et al., *Kinetics of peroxy nitrite reaction with amino acids and human serum albumin*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 842-8.
307. Espenson, J.H., *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, ed. McGraw-Hill. 1995.
308. Wardman, P., *Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(7): p. 995-1022.
309. Treinin, A.a.H., E., *Absorption Spectra and Reaction Kinetics of NO₂, N₂O₃, and N₂O₄ in Aqueous Solution*. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1970. **92**(20): p. 5821-5828.
310. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxy nitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
311. Miles, A.M., et al., *Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 40-7.
312. Manea, A., *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology*. Cell Tissue Res, 2010. **342**(3): p. 325-39.
313. Slauch, J.M., *How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question*. Mol Microbiol, 2011. **80**(3): p. 580-3.
314. Burmester, G.R., et al., *Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis?* Arthritis Rheum, 1997. **40**(1): p. 5-18.
315. Martel-Pelletier, J., D.J. Welsch, and J.P. Pelletier, *Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. **15**(5): p. 805-29.
316. Murphy, G., et al., *Matrix metalloproteinases in arthritic disease*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S39-49.
317. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
318. Kleiner, D.E. and W.G. Stetler-Stevenson, *Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases*. Anal Biochem, 1994. **218**(2): p. 325-9.
319. Snoek-van Beurden, P.A. and J.W. Von den Hoff, *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Biotechniques, 2005. **38**(1): p. 73-83.
320. Ortega A, R.A.a.M.J., *Animal models of pain. A critical view*. Rev Soc Esp Dolor 2002. **9**: p. 447-453.
321. Siegmund, E., R. Cadmus, and G. Lu, *A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics*. Proc Soc Exp Biol Med, 1957. **95**(4): p. 729-31.
322. Svensson, C.I. and T.L. Yaksh, *The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 553-83.
323. Blobaum, A.L. and L.J. Marnett, *Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition*. J Med Chem, 2007. **50**(7): p. 1425-41.
324. Meade, E.A., W.L. Smith, and D.L. DeWitt, *Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6610-4.

325. Hernandez, P., et al., *Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives*. *Bioorg Med Chem*. **20**(6): p. 2158-71.
326. Caughey, G.E., et al., *Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2*. *J Immunol*, 2001. **167**(5): p. 2831-8.
327. Tateda, K., T. Matsumoto, and K. Yamaguchi, *Acute induction of interleukin-6 and biphasic changes of serum complement C3 by carrageenan in mice*. *Mediators Inflamm*, 1998. **7**(3): p. 221-3.
328. Amin, S.B., R.A. Sinkin, and J.C. Glantz, *Metaanalysis of the effect of antenatal indomethacin on neonatal outcomes*. *Am J Obstet Gynecol*, 2007. **197**(5): p. 486 e1-10.
329. Kenneth L. Melmon, H.F.M., S. George Carruthers. , *Melmon and Morrelli's Clinical Pharmacology*. 2000.
330. Bendele, A.M., *Animal models of rheumatoid arthritis*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001. **1**(4): p. 377-85.
331. Baggott, J.E. and S.L. Morgan, *Methotrexate and erythro-9-(2-hydroxynon-3-yl) adenine therapy for rat adjuvant arthritis and the effect of methotrexate on in vivo purine metabolism*. *Eur J Pharm Sci*, 2007. **31**(2): p. 95-101.
332. Gilani, S.T., et al., *Adverse effects of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients*. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2012. **22**(2): p. 101-4.
333. Thomson, L., et al., *Identification of immunoglobulins that recognize 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. **36**(2): p. 152-7.
334. Thomson, L., et al., *Immunoglobulins against tyrosine-nitrated epitopes in coronary artery disease*. *Circulation*, 2012. **126**(20): p. 2392-401.

AAPC – Anticuerpos anti-péptidos citrulinados
 ABAP - 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)
 ABC – Área bajo la curva
 ACR – del inglés American College of Rheumatology
 ADMA - N^G , N^G dimetil-*L*-arginina
 AP-1 – Activador de proteína 1
 ARE - del inglés Antioxidant Response Element
 BH₄ - Tetrahidrobiopterina
 BHT - *Tert*-butilhidroxitolueno
 BSA - Seroalbúmina bovina
 CAT – Catalasa
 CD – del inglés Cluster of Differentiation
 CDAI – del inglés Clinic Disease Activity Index
 ACF - Adyuvante completo de Freund
 CMC - Carboximetilcelulosa
 COX – Ciclooxygenasa
 CPA- Célula presentadora de antígeno
 DAF-FM-DA - 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
 DAS28 - Índice actividad de enfermedad 28
 DCDHF -2'-7' dicloro dihidrofluoresceína
 DHR - 123 dihidrorodamina
 DMEM – del inglés Dulbecco's modified eagle medium
 DMSO – Dimetilsulfóxido
 dPBS - Amortiguador fosfato salino de Dulbecco
 DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
 DTPA – Ácido dietilen diamino pentacético
 EDTA – Ácido etilen diamino tetracético
 ELISA - del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
 ERN – Especies reactivas del nitrógeno
 ERO- Especies reactivas del oxígeno
 EULAR – del inglés European League Against Rheumatism
 Fe²⁺-Cyt c – Citocromo c reducido
 Fe³⁺-Cyt c – Citocromo c oxidado
 FL – Fluoresceína
 FR- Factor reumatoideo
 FRAP - del inglés Ferric Reducing Antioxidant Power assay
 GDP – Guanosina bifosfato
 GM-CSF- del inglés Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor
 GMP – Guanosina monofosfato
 GMPc- Guanosina monofosfato cíclico
 GPX- Glutación peroxida
 GR – Glutación reductasa
 GSH – Glutación reducido
 GSSG – Glutación oxidado
 GST – Glutación *S*-transferasa
 GTP – Guanosina trifosfato
 HbO₂ - Oxihemoglobina
 HRP – del inglés Horse Radish Peroxidase
 ICAM-1 – Moléculas de adhesión intercelular
 ICOS- del inglés Inducible Coestimulator
 IgG – Inmunoglobulina G
 IgE – Inmunoglobulina E
 IGF-1 – Factor de crecimiento insulínico
 IκB - inhibidor de κB
 IKK - Quinasa de IκB
 IL- Interleucinas
 INFγ - Interferón γ
 INRU - Instituto Nacional de Reumatología
 IP - Intraperitoneal
 JNK – Quinasa c-Jun N-terminal

KLH – del inglés Keyhole Limpet
 LPS - Lipopolisacárido
 LT - Leucotrienos
 MAPK – del inglés Mitogen-Activated Proteína Kinase
 MCP-1- del inglés Monocyte Chemotactic Protein
 MDA – Monodehidroascorbato
 MetHb –Metahemoglobina
 MHC – del inglés Major Histocompatibility Complex
 MIP-1 α – del inglés Macrophage Inflammatory Protein
 MMIF – del inglés Macrophage Migration Inhibitory Factor
 MMP – Metalopeptidasas de la matriz
 MPO - Mieloperoxidasa
 MTT - Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
 MTX - Metotrexato
 NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido
 NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 Naranja de xilenol - 3,3'-bis (N,N-di(carboximetil)-(aminometil-O-cresil)-sulfonaftaleína
 NF- κ B – Factor nuclear kappa B
 NOS – Óxido nítrico sintasa
 3NO₂-Y – 3 nitrotirosina
 NOX – NADPH oxidasa
 Nrf2 – del inglés Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2
 NRL- del inglés NOD-Like Receptors
 ORAC - del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity
 PAD Peptidil arginina deiminasa
 PAGE – del inglés Polyacrilamide Gel Electrophoresis
 PBS – del inglés Phosphate Buffer Saline
 PCR – Proteína C reactiva
 PG - Prostaglandina
 PG-ACh - PG conjugada a acetilcolinesterasa
 PMA - 4 β -forbol 12-miristato 13-acetato
 PPAR – del inglés Peroxisome Proliferator- Activated Receptor
 PPRE – Elemento de respuesta a PPAR
 PRX- Peroxirredoxina
 PTK - del inglés Protein Tirosina Kinase
 PTP – del inglés Protein Tyrosine Phosphatase
 RANK – del inglés Receptor Activator for Nuclear Factor κ B
 RANK-L- del inglés Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
 RXR α - Receptor α de retinoide X
 SDAI - del inglés Simplified Disease Activity Index
 SDS – Dodecil sulfato de sodio
 SFB – Suero fetal bovino
 SOD – Superóxido dismutasa
 TBS-T –Amortiguador Tris salino con 0.05 % Tween-20
 TGO – Transaminasa glutámico-oxalacética
 TGP – Transaminasa glutámico-pirúvica
 TLR- del inglés Toll-like Receptors
 TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
 TNF α – Factor de necrosis tumoral α
 TNF-Rs- Receptores de TNF
 TPTZ - 2,4,6 tripiridiltriazina
 Trolox - Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromanocarboxílico
 UGT – UDP glucuronil transferasa
 VCAM-1 – Moléculas de adhesión a células vasculares
 VES – Velocidad de eritrosedimentación
 VO – Vía oral
 Y \cdot - Radical tirosilo

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ESPECIES REACTIVAS	1
1.2	DEFENSAS ANTIOXIDANTES	11
1.3	ESPECIES REACTIVAS Y SEÑALIZACIÓN REDOX	15
1.4	SEÑALIZACIÓN REDOX Y RESPUESTA INFLAMATORIA.....	17
1.5	ARTRITIS REUMATOIDEA	22
1.6	ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	36
2	HIPÓTESIS	38
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVOS GENERALES	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MÉTODOS.....	39
4.1	SÍNTESIS DE NITROALQUENOS.....	39
4.2	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS NITROALQUENOS	39
4.3	ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CON PEROXINITRTO	40
4.4	ATRAPAMIENTO DE ESPECIES REACTIVAS GENERADAS POR MACRÓFAGOS ACTIVADOS	42
4.5	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN MACROFAGOS J774	45
4.6	EFFECTO DE B1 SOBRE LA COMUNICACIÓN PARÁCRINA ENTRE CONDROCITOS Y MACRÓFAGOS J774	45
4.7	MODELOS BIOLÓGICOS	47
4.8	NITROALQUENOS COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE COX 1 Y COX 2 ..	49
4.9	ESTUDIOS EN PACIENTES PORTADORES DE ARTRITIS REUMATOIDEA....	49
4.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
4.11	MATERIALES Y EQUIPAMIENTO	53
5	OBJETIVO 1 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
5.1	DISEÑO Y SÍNTESIS DE NITROALQUENOS	54
5.2	CARACTERIZACIÓN ESPECTRAL DE LOS COMPUESTOS	56
5.3	ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CON PEROXINITRITO.....	58
5.4	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....	72
5.5	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MACRÓFAGOS ACTIVADOS Y CONDROCITOS EN PRESENCIA DE NITROALQUENOS	73
5.6	PROPIEDADES ANALGÉSICAS Y ANTIINFLAMATORIAS DE LOS NITROALQUENOS	76
6	OBJETIVO 1 – CONCLUSIONES	85
7	OBJETIVO 2 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
7.1	INDICADORES DE ARTRITIS REUMATOIDEA EN PACIENTES	87
8	OBJETIVO 2 – CONCLUSIONES	91
9	PERSPECTIVAS.....	91
10	BIBLIOGRAFÍA	92
11	ABREVIATURAS.....	108

